

Université de Montréal

**Rôle et mécanisme d'action du récepteur B1 des kinines dans la rétinopathie  
diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge**

*Par*

Rahmeh Othman

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

Avril 2020

© Rahmeh Othman, 2020



Université de Montréal

Département de pharmacologie et physiologie, Faculté de Médecine

---

Programme : Physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

*Cette thèse intitulée*

**Rôle et mécanisme d'action du récepteur B1 des kinines dans la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge**

*Présentée par*

**Rahmeh Othman**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Hélène Girouard, Ph. D.**

Président-rapporteur

**Réjean Couture, Ph. D.**

Directeur de recherche

**Elvire Vaucher, Ph. D.**

Codirectrice

**Bruno Larrivée, Ph. D.**

Membre du jury

**Florian Sennlaub, MD, Ph. D.**

Examineur externe

## Résumé

Le système kallibréine-kinines est un système peptidergique complexe impliqué dans les processus inflammatoires, le contrôle du tonus et de la perméabilité vasculaire. Les effets biologiques des kinines sont accomplis par l'intermédiaire de deux types de récepteurs couplés aux protéines G, soit le récepteur B1 (B1R) et le récepteur B2 (B2R). Alors que le B2R est un récepteur constitutif, le B1R est faiblement exprimé en situation physiologique; il est induit par le stress oxydatif, les cytokines pro-inflammatoires (interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) et le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) ou par des endotoxines bactériennes à la fois au niveau systémique et local, notamment dans la rétine. Des études récentes de notre laboratoire ont montré l'implication du B1R dans la pathogenèse et la progression de la rétinopathie diabétique et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Les objectifs des travaux présentés dans cette thèse consistent à déterminer : 1) le mécanisme par lequel le B1R est impliqué dans la rétinopathie diabétique chez le rat; 2) l'implication de la iNOS en aval dans la cascade inflammatoire activée par le B1R; 3) l'expression et la localisation cellulaire du B1R dans les rétines humaines atteintes de DMLA exsudative et atrophique.

Nos résultats ont permis de démontrer une implication du B1R dans la rétinopathie diabétique via l'activation de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote inductible (iNOS) dans un modèle de diabète de type 1 induit par la streptozotocine (STZ) chez le rat. En plus de sa localisation généralisée dans toute la rétine, le B1R est exprimé dans la couche de l'épithélium pigmentaire qui forme la barrière hémato-rétinienne externe. Les taux d'expression (protéique et ARNm) du B1R, de la iNOS, de la carboxypeptidase M (impliquée dans la biosynthèse des agonistes B1R), de l'IL-1 $\beta$ , du TNF- $\alpha$ , du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire A (VEGF-A) et de son récepteur, le VEGF-R2, ainsi que des protéines nitrosylées augmentent à deux semaines dans la rétine diabétique. Ces augmentations ainsi que l'hyperperméabilité vasculaire rétinienne induite par le diabète et par l'injection intravitréenne d'un agoniste du B1R (R-838) sont bloquées par un inhibiteur de la iNOS (1400W) appliqué topiquement à la surface de l'œil pendant 1 semaine (premier article).

Les résultats du deuxième article montrent une augmentation significative de l'immunoréactivité du B1R dans les rétines humaines prélevées de patients atteints de DMLA exsudative. Toutefois, les changements d'immunoexpression du B1R ne sont pas significatifs dans les rétines des patients atteints de DMLA atrophique. La réactivité des cellules gliales est plus marquée dans la forme exsudative que dans la forme atrophique de DMLA. Une colocalisation du B1R est observée avec des marqueurs des cellules de Müller, des astrocytes, de la microglie, de la iNOS et de la fibrose, suggérant une implication du B1R dans le processus inflammatoire et la formation de fibrose dans la DMLA exsudative. En revanche, l'expression du B2R demeure stable dans les rétines de DMLA exsudative et atrophique par rapport aux rétines témoins; ce résultat ne supporte pas la possibilité que ce récepteur puisse être impliqué dans la DMLA chez l'humain.

**Mots-clés :** Système kallibréine-kinines, Récepteur B1 des kinines, Enzyme de synthèse du monoxyde d'azote inductible, Rétinopathie diabétique, Dégénérescence maculaire liée à l'âge

# Abstract

The kallikrein-kinins system is a peptidergic system involved in inflammatory processes, the control of the vascular tone and permeability. These effects are mediated by two G protein-coupled receptors, the Bradykinin type 1 (B1R) and type 2 (B2R) receptors. While the B2R is a constitutive receptor, B1R is almost undetectable in physiological condition; it is, however, induced by oxidative stress, pro-inflammatory cytokines (interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) or by bacterial endotoxins at both systemic and local levels, notably in the retina. Recent studies from our laboratory supported an implication of B1R in the pathogenesis and progression of diabetic retinopathy and age-related macular degeneration (AMD). This thesis aims at unraveling: 1) the mechanism by which B1R is involved in diabetic retinopathy in rats; 2) the involvement of iNOS in the inflammatory cascade downstream to the B1R; and, 3) the expression and cellular localization of B1R in human retinae with exudative and atrophic AMD.

Our results have shown the implication of B1R in diabetic retinopathy via the activation of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) in a type 1 model of diabetes induced by streptozotocin (STZ) in rats. In addition to its generalized localization throughout the retina, B1R is expressed in the retinal pigment epithelium which forms the outer blood-retinal barrier. The protein and transcript expression of inflammatory markers; iNOS, carboxypeptidase M, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , vascular endothelium growth factor A (VEGF-A) and its receptor, VEGF-R2, including B1R as well as nitrosylated proteins are increased in the retina of diabetic rats at 2 weeks post-STZ. These upregulations, as well as the retinal vascular hyperpermeability induced by diabetes and by the intravitreal injection of an B1R agonist (R-838) are blocked by a topical one-week treatment by eye-drop with the selective iNOS inhibitor (1400W) (first manuscript).

The results of the second manuscript show significant increases in the immunoreactivity of B1R in exudative AMD retinae. Despite a slight increase, B1R immunostaining does not reach statistical significance in the retina of donors with atrophic AMD. The reactivity of glial cells is more impressive in the exudative than in the atrophic form of AMD. B1R is co-expressed with markers of Müller cells, astrocytes, microglia, iNOS and fibrosis, suggesting an involvement of B1R in the inflammatory events and the formation of fibrosis in exudative AMD. On the other

hand, the expression of B2R remains stable in the retinae of exudative and atrophic AMD, supporting a secondary role of this receptor in AMD in humans.

**Keywords:** Kallikrein-kinins system, Bradykinin type 1 receptor, Inducible nitric oxide synthase, Diabetic retinopathy, Age-related macular degeneration

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>ix</b>
<b>Préambule .....</b>	<b>1</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>3</b>
<b>Chapitre 1 Introduction .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1. L'œil: anatomie et fonction.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. La rétine .....</b>	<b>7</b>
1.2.1. LES DIFFÉRENTES COUCHES DE LA RÉTINE.....	8
1.2.2. ORGANISATION DE LA RÉTINE AU NIVEAU CELLULAIRE .....	10
1.2.3. LE RÉSEAU VASCULAIRE RÉTINIEN ET CHOROÏDIEN .....	15
1.2.4. LA BARRIÈRE HÉMATO-RÉTINIENNE.....	17
<b>1.3. La rétinopathie diabétique .....</b>	<b>20</b>
1.3.1. LE DIABÈTE MELLITUS.....	20
1.3.2. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	24
1.3.3. LES STADES DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE .....	24
1.3.4. LES VOIES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉES DANS LA PATHOGENÈSE DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE .....	26
1.3.5. LES TRAITEMENTS DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE .....	31
<b>1.4. La dégénérescence maculaire liée à l'âge.....</b>	<b>33</b>
1.4.1. LES STRUCTURES IMPLIQUÉES DANS LA PATHOGENÈSE DE LA DMLA .....	35



1.4.2. LA DMLA ATROPHIQUE.....	36
1.4.3. LA DMLA EXSUDATIVE.....	38
1.4.4. LES FACTEURS IMPLIQUÉS DANS LA DMLA.....	39
<b>1.5. Le stress oxydatif dans les pathologies oculaires.....</b>	<b>43</b>
1.5.1. LES ENZYMES DE SYNTHÈSE DU MONOXYDE D’AZOTE.....	43
<b>1.6. Le système kallibréine-kinines.....</b>	<b>47</b>
1.6.1. BREF APERÇU HISTORIQUE.....	47
1.6.2. LES KININES.....	48
1.6.3. LES RÉCEPTEURS DES KININES.....	50
1.6.4. L’EXPRESSION DES RÉCEPTEURS DES KININES.....	50
1.6.5. LES VOIES DE SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS DES KININES.....	51
1.6.6. LE SYSTÈME KALLIBRÉINE-KININES DANS LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	53
1.6.7. LE SYSTÈME KALLIBRÉINE-KININES DANS LA DMLA.....	55
1.6.8. LE SYSTÈME KALLIBRÉINE-KININES DANS L’INFLAMMATION.....	56
1.6.9. LE SYSTÈME KALLIBRÉINE-KININES ET LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE.....	57
<b>1.7. Rationnel de la thèse et ses objectifs généraux.....</b>	<b>60</b>
<b>Chapitre 2 Premier article.....</b>	<b>62</b>
<b>2.1. Article 1.....</b>	<b>63</b>
2.1.1. PROBLÉMATIQUE.....	63
2.1.2. HYPOTHÈSE.....	63
2.1.3. OBJECTIFS.....	63
2.1.4. MÉTHODE EXPÉRIMENTALE.....	63
2.1.5. CONTRIBUTION.....	64
<b>Chapitre 3 Deuxième article.....</b>	<b>78</b>
<b>3.1. Article 2.....</b>	<b>79</b>
3.1.1. PROBLÉMATIQUE.....	79
3.1.2. HYPOTHÈSE.....	79

3.1.3. OBJECTIFS.....	79
3.1.4. CONTRIBUTION.....	80
<b>Chapitre 4 Discussion et perspectives .....</b>	<b>101</b>
4.1. Faits saillants de la thèse.....	102
4.2. Avantages et limitations du modèle de diabète induit par la STZ.....	102
4.3. Avantages et limitations des coupes de rétines humaines.....	104
4.4. Expression et mécanismes d'action des récepteurs des kinines dans la rétinopathie diabétique.....	105
4.5. Rôle des récepteurs des kinines dans la néovascularisation.....	109
4.6. Rôle du B1R dans l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne dans la DMLA.....	110
4.7. L'axe B1R-iNOS dans la DMLA.....	111
4.8. L'association du B1R avec les cellules gliales dans la DMLA.....	112
4.9. Perspectives.....	113
4.9.1. PROJET DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	113
4.9.2. PROJET DE LA DMLA.....	116
4.10. Dénominateur commun entre la rétinopathie diabétique et la DMLA et innovation du traitement oculaire.....	117
4.11. Conclusion.....	119
<b>Chapitre 5 Références bibliographiques.....</b>	<b>120</b>

# Liste des tableaux

<b>TABLEAU 1: STRUCTURE PRIMAIRE DES KININES</b> .....	48
--	----

# Liste des figures

<b>FIGURE 1: ANATOMIE DE L'ŒIL</b> .....	6
<b>FIGURE 2: LE FOND D'ŒIL</b> .....	7
<b>FIGURE 3: LES DIFFÉRENTES COUCHES DE LA RÉTINE</b> .....	9
<b>FIGURE 4: UNE REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU LIT VASCULAIRE OCULAIRE</b> .....	16
<b>FIGURE 5: LES COMPOSITIONS DE LA BARRIÈRE HÉMATO-RÉTINIENNE</b> .....	18
<b>FIGURE 6 : LA BARRIÈRE HÉMATO-RÉTINIENNE INTERNE</b> .....	19
<b>FIGURE 7: RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE NON-PROLIFÉRATIVE</b> .....	25
<b>FIGURE 8: LES DIFFÉRENTES VOIES IMPLIQUÉES DANS LA PATHOGENÈSE DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE</b> .....	26
<b>FIGURE 9: RÉTINE HUMAINE SAINNE</b> .....	34
<b>FIGURE 10: STADE PRÉCOCE DE LA DMLA</b> .....	35
<b>FIGURE 11: LES TROIS STRUCTURES RÉTINIENNES IMPLIQUÉES DANS LA DMLA</b> .....	35
<b>FIGURE 12: DMLA ATROPHIQUE</b> .....	36
<b>FIGURE 13: DMLA EXSUDATIVE</b> .....	38
<b>FIGURE 14: LA SYNTHÈSE DU MONOXYDE D'AZOTE ET DES ESPÈCES RÉACTIVES D'AZOTE</b> .....	46
<b>FIGURE 15: LES COMPOSANTES DU SYSTÈME KALLICRÉINE-KININES</b> .....	49
<b>FIGURE 16: LES VOIES DE SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS DES KININES</b> .....	52
<b>FIGURE 17: INTERACTION ENTRE LE SYSTÈME KALLICRÉINE-KININES (SKK) ET LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE (SRA)</b> .....	58
<b>FIGURE 18: NIVEAU D'EXPRESSION PROTÉIQUE DU B1R DANS LA RÉTINE D'UN MODÈLE DE RAT DIABÉTIQUE DE TYPE 2</b> .....	104

## Liste des sigles et abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ang I	Angiotensine I
AngII	Angiotensine II
AR	Aldose réductase
AT1R	Récepteur de l'angiotensine de type 1
AT2R	Récepteur de l'angiotensine de type 2
B1R	Récepteur B1 des kinines
B2R	Récepteur B2 des kinines
BHR	Barrière hémato-rétinienne
BK	Bradykinine
CCL2	Chemokine ligand 2
CFD	Facteur complément D
CFH	Facteur complément H
CNV	Néovascularisation choroïdienne
CPM	Carboxypeptidase M
CPN	Carboxypeptidase N
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine I
ECAi	Inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I
eNOS	Enzyme de synthèse du monoxyde d'azote endothéliale
EPR	Couche de l'épithélium pigmentaire rétinien
ERG	Électrorétinographie
FGF-2	Facteur de croissance des fibroblastes 2
FXII	Facteur XII
GCL	Couche de cellules ganglionnaires
GFAP	Protéine acide fibrillaire gliale
GLUT 2	Protéine de transport du glucose de type 2
GLUT 4	Protéine de transport du glucose de type 4
HIF-1 $\alpha$	Facteur 1 $\alpha$ induit par l'hypoxie
HK	Kininogène de haut poids moléculaire

ICAM-1	Molécule 1 d'adhérence intercellulaire
IL-1R	Récepteur de l'interleukine 1
ILM	Membrane limitante interne
INL	Couche nucléaire interne
iNOS	Enzyme de synthèse du monoxyde d'azote inducible
IPL	Couche plexiforme interne
KBP	Protéine de liaison de kallibréine tissulaire
KD	Kallidine
LK	Kininogène de faible poids moléculaire
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- $\kappa$ B	Facteur de transcription nucléaire $\kappa$ B
NFL	Couche de fibres nerveuses
nNOS	Enzyme de synthèse du monoxyde d'azote neuronale
NO	Monoxyde d'azote
NOS	Enzyme de synthèse du monoxyde d'azote
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anion superoxyde
OLM	Membrane limitante externe
OPL	Couche plexiforme externe
PlGF	Facteur de croissance placentaire
PEDF	Facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire
PKC	Protéine Kinase C
PL	Couche des photorécepteurs
PLC	Phospholipase C
RNS	Espèces réactives de l'azote
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SKK	Système kallibréine-kinines
SNC	Système nerveux central
SRA	Système rénine-angiotensine
STZ	Streptozotocine
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
VCAM-1	Molécule 1 d'adhérence aux cellules vasculaires
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire



## Préambule

Les mécanismes de défense diminuent avec l'âge, augmentant le risque de développement des pathologies au niveau de l'œil. Dans ce contexte, la rétinopathie diabétique (RD) et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) sont les plus répandues.

Dans la catégorie des complications microvasculaires du diabète, la RD est l'une des plus courantes. L'augmentation du stress oxydatif et de la réponse inflammatoire au cours du diabète induit des altérations vasculaires et neuronales, altérant la fonction de la rétine, ce qui peut causer la perte de la vision. Cette pathologie peut évoluer avec le temps où de nouveaux vaisseaux se forment et peuvent induire le détachement de la rétine.

La DMLA est considérée comme la première cause de cécité chez les personnes âgées dans les pays industrialisés. Dans un stade précoce, des dépôts de drusen se forment dans l'espace sous-rétinien qui peut affecter la rétine et la vision centrale. Avec le temps, une perte de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), des capillaires choroïdiens, et de la couche des photorécepteurs se produit, faisant évoluer la DMLA en deux formes, soit la DMLA atrophique (sèche), et la DMLA exsudative (néovasculaire ou humide). La DMLA exsudative est caractérisée par une croissance de nouveaux vaisseaux d'origine choroïdienne (et plus rarement d'origine rétinienne) dans l'espace sous-rétinien.

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) est considéré comme le principal responsable de la croissance vasculaire dans la rétine. Par conséquent, le traitement actuel consiste à cibler cette molécule par des injections intravitréennes répétées d'un agent neutralisant (anti-VEGF) afin d'inhiber la formation des néovaisseaux pathologiques et améliorer l'acuité visuelle. Toutefois, le VEGF est une molécule constitutive, et l'inhiber interfère avec son rôle physiologique. De plus, les injections sont invasives et peuvent causer des complications. En outre, ce traitement est conçu pour les stades tardifs de la RD et de la DMLA exsudative alors que la DMLA atrophique demeure sans traitement.

Des avancées récentes suggèrent un rôle pour le système kallibréine-kinines (SKK) dans l'induction de l'inflammation et la néovascularisation dans un modèle pré-clinique de DMLA et de RD. Le SKK est un système peptidergique qui agit via l'activation de deux récepteurs, soit le récepteur B1 (B1R) et le récepteur B2 (B2R) des kinines. Alors que le B2R est exprimé constitutivement, le B1R est induit dans les conditions pathologiques et il est surexprimé dans la rétine humaine atteinte de RD. Son rôle dans les pathologies rétinienne associées à l'inflammation, notamment la RD et la DMLA, a été récemment évalué dans des études pré-cliniques chez le rat. L'administration en gouttes topiques de l'antagoniste du B1R chez le rat renverse les signes de la RD et de la DMLA. Toutefois, puisque la découverte du B1R dans les pathologies oculaires est récente, le mécanisme d'action de ce récepteur n'est pas encore décrit; cette information aiderait, évidemment, à mieux comprendre la pathologie et à développer des stratégies thérapeutiques. Dans ce contexte, nous avons montré que le B1R interagit avec l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote inductible (iNOS) dans la rétine du rat diabétique pour induire l'inflammation (Article 1). Nous avons par la suite identifié la présence de ce récepteur dans la rétine humaine atteinte de DMLA exsudative et atrophique (Article 2). Ceci contraste avec la quasi-absence de son expression dans les rétines des donneurs sains. Afin de décortiquer le mécanisme d'action du B1R dans la rétine humaine, on a évalué son association avec des marqueurs de l'inflammation et de la fibrose dans la rétine humaine DMLA. Nos résultats montrent une association avec ces marqueurs et le B1R dans la DMLA exsudative, mais non dans la DMLA atrophique. Ces données fort intéressantes montrent une dissociation entre les deux formes de DMLA chez l'humain. Aussi, ces résultats consolident des études précédentes sur des rétines humaines montrant l'absence de la iNOS dans la DMLA atrophique et sa surexpression dans la DMLA exsudative. L'expression très élevée du B1R dans la couche de l'épithélium pigmentaire rétinien et sur les vaisseaux rétiens en relation avec la barrière hémato-rétinienne suggère fortement la contribution de ce récepteur au développement de la RD et de la DMLA.

Ces travaux ouvrent la porte à des essais cliniques et chez le primate non-humain afin de remplacer les stratégies thérapeutiques actuelles considérées invasives et pas toujours efficaces dans le traitement de la RD et de la DMLA. À cet égard, l'application de l'antagoniste du B1R à la surface de l'œil en forme de gouttes peut s'avérer une voie thérapeutique très prometteuse.



*« Vous êtes bon lorsque que vous marchez fermement vers votre but d'un pas intrépide. Pourtant, vous n'êtes pas mauvais lorsque vous y allez en boitant. Même ceux qui boitent ne vont pas en arrière »*

*Gبران Khalil Gibran 1883-1931*

*À mon ange gardien, ma grand-mère  
Tout ce que je suis devenue aujourd'hui, je te le dois !*

## Remerciements

En premier lieu, je dédie cette thèse à la personne à qui je dois mon existence. Sans elle, je ne serais pas la personne que je suis aujourd'hui. Merci à mon héroïne qui nous a quittés pour un monde meilleur à la dernière année de cette thèse. **Grand-maman**, « **Teta** » comme je t'appelais si tendrement, orpheline de mère, merci de m'avoir adoptée ainsi que mon frère et ma sœur et d'avoir comblé le vide, d'avoir incarné la place de plusieurs personnes dans ma vie. Merci de m'avoir appris comment voler de mes propres ailes et me battre face aux différents défis de la vie. J'espère être à la hauteur de ta fierté absolue.

Par la même occasion, je souhaite également exprimer ma profonde gratitude envers une personne que je considère comme un père avant tout, au meilleur superviseur du monde, Professeur **Réjean Couture**, sans qui ce travail de longue haleine n'aurait pas pu se réaliser. Les mots me manquent pour illustrer ma gratitude et vous remercier pour votre inestimable disponibilité, votre patience, votre support moral en tout temps, votre grande écoute, votre empathie et vos sacrifices à tous les niveaux. Merci d'avoir su me motiver et m'encourager dans la recherche mais aussi dans la vie de tous les jours. Merci d'avoir traité vos étudiants comme étant vos enfants avant de les traiter comme étudiants, et de les mener à bon port. Merci d'être un superviseur hors du commun, empathique, altruiste et d'un support inconditionnel. Dr Couture, je vous dois une grande partie de mon succès. J'ai appris à devenir une meilleure version de moi-même. Je suis reconnaissante pour le nombre de fois où je dérapais du chemin, où je me sentais marcher seule dans un tunnel sans fin. Vous avez su comment me motiver et m'encourager à continuer. Je garderai vos judicieux conseils et votre optimisme éternel pour toujours. Je suis fière de travailler avec une sommité et je suis reconnaissante à la vie de m'avoir donné la chance de faire connaissance avec une personne unique comme vous l'êtes. Vous incarnez, à mon humble avis, le superviseur idéal pour un étudiant aux études supérieures.

Je tiens également à remercier vivement ma codirectrice de thèse, Professeure **Elvire Vaucher**, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir enseigné le sens critique de la recherche. Merci pour vos bons conseils et vos commentaires constructifs sur les articles et d'avoir partagé généreusement vos connaissances avec moi pour mener à terme ce doctorat. Merci de

m'avoir offert cette belle opportunité de croissance professionnelle, cela m'a été d'une aide précieuse.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury de cette thèse, Professeurs **Hélène Girouard**, **Bruno Larrivée** et **Florian Sennlaub**. Je suis honorée que vous participiez à mon jury de thèse afin de juger mon travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance également au Professeur **Sébastien Talbot** qui m'est venu en aide alors que rien ne l'y obligeait. Merci pour ton écoute quand j'en avais besoin, merci de m'avoir donné ton avis scientifique, de m'avoir encouragée en tout temps.

Je ne peux oublier de remercier une personne formidable, Professeure **Juliana Pereira**. Je te remercie du fond du cœur pour tous ces moments agréables passés ensemble, pour ta douceur, ton aide infini et ton écoute. Tu es un amour.

Je tiens également à remercier mes amis qui m'ont soutenue au cours de cette thèse, mes coups de cœur **Sara**, **Hayat**, **Karaks**, **Nadia** et **Sourouri** pour leur support tout au long de ce doctorat. Merci d'être là dans les moments difficiles, merci pour votre écoute, votre soutien précieux et tous les moments mémorables partagés ensemble. Merci de m'avoir appuyée et de faire partie de mon quotidien.

Un merci infini à **ma petite famille**: ma tante, ma soeur, mon frère et mes cousins qui n'ont jamais cessé de m'encourager malgré qu'un océan nous sépare.

J'aimerais remercier le fabuleux technicien du laboratoire, **Jacques Sénécal**, de m'avoir aidée avec les expérimentations et d'avoir trouvé des solutions à tous les problèmes techniques. Je salue également **Veronica Cernit**, **Yuan Li**, **France Gauthier** et **Sylvie Berthelot** pour m'avoir fait passer des heures de plaisir au laboratoire.

Enfin, je remercie le programme d'études supérieures en physiologie du **Département de pharmacologie et physiologie** pour m'avoir soutenue en m'accordant trois bourses d'études. De plus, je remercie la **Faculté des études supérieures** pour la bourse d'exemption des frais majorés, ainsi que les **Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC)** qui ont subventionné l'étude.

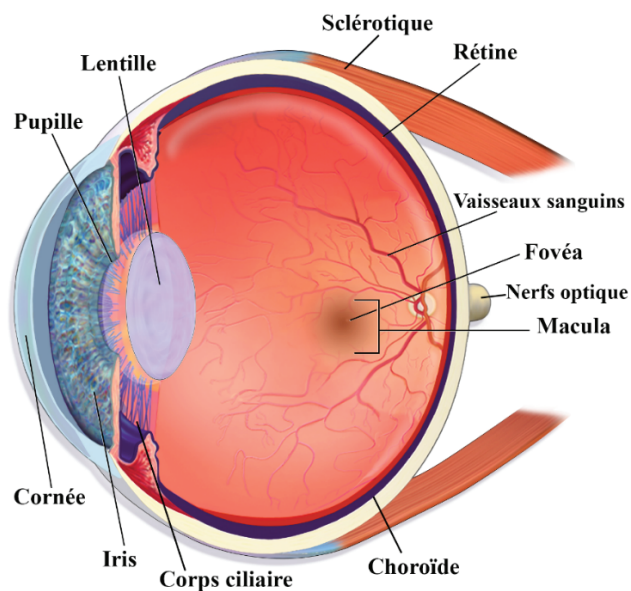


# Chapitre 1 **Introduction**

## 1.1. L'œil: anatomie et fonction

Les yeux sont la fenêtre de l'âme qui nourrissent notre cerveau avec l'information visuelle. Ces deux caméras intégrées nous permettent de percevoir l'environnement visuel qui nous entoure, et d'accomplir les quatre autres fonctions sensorielles. Et, ce n'est pas pour rien qu'on appelle cet organe fascinant « *la lampe de notre corps* ».

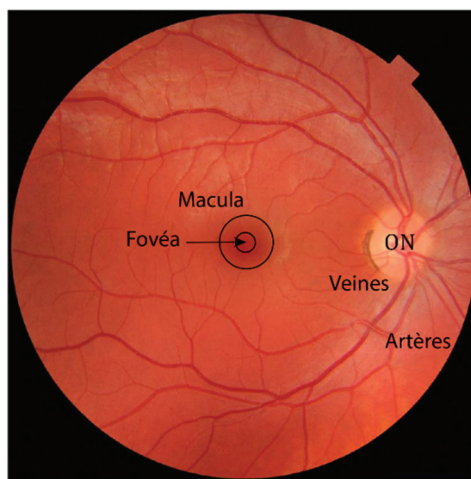
L'œil est un organe neurosensoriel qui assure la sensation visuelle par un phénomène appelé phototransduction. L'œil absorbe la lumière, la convertit en signal nerveux transmis, par la suite, au cerveau qui traduira le message en image. En effet, la lumière passe en premier dans la cornée qui focalise la lumière et l'envoie à la rétine par la pupille. L'iris contrôle l'entrée de la lumière selon l'éclairage ambiant; en rapetissant le diamètre pupillaire, l'iris empêche la pénétration d'une grande quantité de lumière et en l'agrandissant, il augmente l'entrée de la lumière. Les rayons lumineux se concentrent davantage dans le cristallin, traversent l'humeur vitrée pour atteindre la rétine qui les transforme en signaux nerveux envoyés au cerveau pour assurer la sensation visuelle (Figure 1).



**FIGURE 1: ANATOMIE DE L'ŒIL**

L'œil humain est constitué de trois tuniques. La tunique externe comprend la sclérotique et la cornée, la tunique moyenne est principalement formée de l'iris, du corps ciliaire, du cristallin et de la choroïde. La choroïde est une couche très vascularisée qui irrigue la rétine. La rétine forme la tunique interne de l'œil et donne naissance au nerf optique. (Adaptée et modifiée de Blaussen.org)

Lors d'un examen ophtalmologique, l'expert en santé de la vision regarde le fond d'œil visualisant la rétine (Figure 2). L'image du fond d'œil inclut la rétine neurosensorielle et sa dernière couche, l'EPR qui confère la couleur orangée, et le lit vasculaire. En particulier, au centre de la rétine, une région très spécialisée de la rétine appelée macula est observée; responsable de la haute acuité visuelle. La macula est très souvent affectée dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge et la rétinopathie diabétique, provoquant les pertes de vision centrale. Il convient de noter que chez les rongeurs, la densité des cônes et des bâtonnets est constante entre la périphérie et le centre de la rétine (Jeon *et al.*, 1998) ce qui fait que la rétine des rongeurs est dépourvue de la macula et de la fovéa.



**FIGURE 2: LE FOND D'ŒIL**

L'examen du fond d'œil aide à vérifier la santé de la partie interne de l'œil; la rétine. Le réseau vasculaire (artères et veines), la macula et le nerf optique (ON) sont visualisés durant cet examen. (Adaptée et modifiée de wikipedia.com)

## 1.2. La rétine

La rétine des vertébrés est un organe de vision, se développant à partir du cerveau. Elle est organisée en dix différentes couches d'environ 250  $\mu\text{m}$  d'épaisseur contenant différentes cellules spécialisées qui se synchronisent pour traduire le signal lumineux reçu en sensation visuelle (Grossniklaus *et al.*, 2015). Elle occupe 75% du globe oculaire, s'intercalant entre l'humeur vitrée et la choroïde. Malgré sa petite taille, la rétine est considérée comme l'un des tissus les plus métaboliquement actifs dans le corps humain. La rétine est hautement spécialisée, formée de millions de cellules. La transduction de la lumière se fait dans la couche des photorécepteurs qui



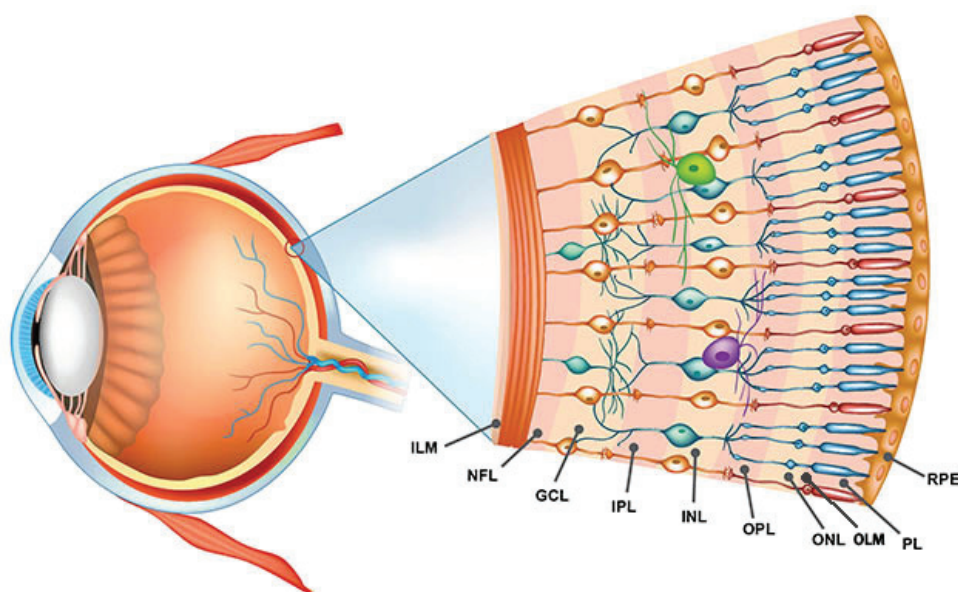
est composée de ~ cinq millions de cônes (responsables de la vision diurne et des couleurs) et d'environ 120 millions de bâtonnets (responsables de la vision crépusculaire et nocturne et de l'intensité lumineuse). Ces cellules captent la lumière (sous forme de photons) et la transforment en signaux électrophysiologiques qui seront acheminés au cerveau via le nerf optique. Deux réseaux vasculaires principaux alimentent la rétine : 1- les artères rétiniennes internes approvisionnant la rétine interne, et 2- la choroïde procurant un support en métabolites et en oxygène à la rétine externe.

### 1.2.1. Les différentes couches de la rétine

Histologiquement, la rétine est formée de dix couches (Kolb *et al.*, 1995) (Figure 3)

- 1- La membrane limitante interne (ILM) qui est formée par les terminaisons des cellules gliales, cellules de Müller et astrocytes.
- 2- La deuxième couche est la couche de fibres nerveuses (NFL), constituée principalement d'axones des cellules ganglionnaires, de vaisseaux rétiniens et de cellules gliales.
- 3- La couche de cellules ganglionnaires (GCL) constituée de cellules ganglionnaires et gliales et occasionnellement de cellules amacrines qui ont migré, ainsi que de vaisseaux sanguins.
- 4- La couche plexiforme interne (IPL) qui sépare la couche GCL de la couche nucléaire interne, est constituée des synapses entre les cellules ganglionnaires, bipolaires, et amacrines.
- 5- La couche nucléaire interne (INL) constituée principalement de noyaux des cellules de Müller, des cellules bipolaires, horizontales et amacrines.
- 6- La couche plexiforme externe (OPL) qui contient les synapses entre les cellules bipolaires, les cellules horizontales et les photorécepteurs.
- 7- La couche nucléaire externe (ONL), constituée principalement de corps cellulaires des photorécepteurs.
- 8- La membrane limitante externe (OLM) contenant les jonctions entre les cellules de Müller adjacentes ainsi qu'entre les cellules de Müller et les photorécepteurs.
- 9- La couche des photorécepteurs (PL) constituée des segments (cônes et bâtonnets) des photorécepteurs.
- 10- La couche de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est composée d'une couche de cellules hexagonales pigmentées reposant sur la membrane de Bruch. Bien que sa composition soit simple, l'EPR a plusieurs fonctions dans la rétine. En effet, L'EPR sépare la rétine

neurosensorielle de la choroïde, formant ainsi la barrière hémato-rétinienne externe. Cette barrière protège la rétine des influences systémiques, assure un transport sélectif des nutriments aux photorécepteurs, contrôle l'homéostasie ionique et élimine les déchets. En absorbant la lumière diffusée, l'EPR améliore la qualité du système optique et diminue le stress photo-oxydant causé par la combinaison de la lumière et de l'oxygène. Il convient de noter que cette couche phagocyte et digère les segments externes des photorécepteurs, permettant leur recyclage. Ainsi une dysfonction de cette couche provoque une accumulation des débris cellulaires. Pour finir, l'EPR secrète de nombreux facteurs de croissance et de signalisation y compris le facteur de croissance endothélial vasculaire, le facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire et les facteurs de croissance des fibroblastes. Ainsi, une dysfonction de cette couche est impliquée dans plusieurs pathologies oculaires notamment la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge.



**FIGURE 3: LES DIFFÉRENTES COUCHES DE LA RÉTINE**

La rétine est constituée principalement de dix couches. De l'intérieur vers l'extérieur; la membrane limitante interne (ILM), la couche des fibres nerveuses (NFL) suivie par la couche des cellules ganglionnaires (GCL). La couche plexiforme interne (IPL) sépare la GCL de la couche nucléaire interne (INL), et la couche plexiforme externe (OPL) sépare l'INL de la couche nucléaire externe (ONL). Une membrane limitante (OLM) limite la couche des photorécepteurs (PL) qui repose sur l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE). (Adaptée et éditée de photonics.com)

## 1.2.2. Organisation de la rétine au niveau cellulaire

La rétine des vertébrés est composée de cinq types de cellules neuronales: les cellules ganglionnaires, les photorécepteurs (cônes et bâtonnets), les cellules bipolaires, les cellules amacrines, et les cellules horizontales. On y trouve également trois types de cellules gliales soit la macroglie, qui comprend les astrocytes et les cellules de Müller, et la microglie (Hoon *et al.*, 2014).

### 1.2.2.1. Les cellules ganglionnaires

Les cellules ganglionnaires transmettent le signal au centre visuel. L'activité de ces cellules est modulée par les cellules amacrines soit directement ou indirectement via deux neurotransmetteurs : l'acide  $\gamma$ -amino-butyrique (GABA) et la glycine (Hoon *et al.*, 2014). En effet, les cellules amacrines peuvent inhiber directement les cellules ganglionnaires via un contact synaptique avec les dendrites des cellules ganglionnaires (*Feedforward inhibition*) ou indirectement via les cellules bipolaires (*Feedback inhibition*) (Hoon *et al.*, 2014).

### 1.2.2.2. Les cellules gliales

La rétine des mammifères est constituée de trois types de cellules gliales soit la macroglie (astrocytes et cellules de Müller) et la microglie résidente. Le terme *glia* est un mot grec qui signifie colle. Cette description est attribuée aux cellules gliales originalement trouvées dans le système nerveux central (SNC) et considérées comme la colle du SNC (Barres, 2008). Au niveau du SNC, les cellules gliales jouent un rôle dans le maintien de l'homéostasie et assurent l'intégrité des neurones (Jessen et Mirsky, 1980). Ces cellules assurent l'apport en nutriments et en oxygène, et elles protègent les neurones contre les pathogènes (Barres, 2008). Les cellules gliales participent non seulement à l'intégrité structurale rétinienne, mais elles sont également impliquées dans le métabolisme, la phagocytose des débris neuronaux, la libération de certains neurotransmetteurs et facteurs trophiques et l'absorption du potassium (Vecino *et al.*, 2016). Bien que l'activation des cellules gliales soit importante pour le maintien de l'homéostasie et la protection de la rétine, une activation chronique de ces cellules contribue aux pathologies neurodégénératives de la rétine (Penn *et al.*, 2008).

#### 1.2.2.2.1. Les cellules macrogliales

Les cellules macrogliales de la rétine sont constituées d'astrocytes et de cellules de Müller. Ces deux types cellulaires jouent des rôles similaires dans la survie et la protection des cellules rétinienne, avec une localisation des astrocytes dans les zones vasculaires alors que les cellules de Müller sont étalées dans toute la rétine (Ramírez, 1998). L'activation des cellules gliales est essentielle pour la protection de la rétine contre les réponses inflammatoires, néanmoins, une activation chronique induit une perte de fonction des cellules gliales augmentant ainsi l'inflammation et le dommage subséquent des neurones et du système vasculaire rétinien (Coorey *et al.*, 2012; Vecino *et al.*, 2016). En effet, la gliose induit une hypertrophie dans la rétine, altérant ainsi la morphologie de la rétine (Vecino *et al.*, 2016). Par exemple, la macroglia est impliquée dans le processus de néovascularisation dans les pathologies rétinienne, en libérant des facteurs angiogéniques en présence de stimuli pathogènes (Penn *et al.*, 2008).

#### 1.2.2.2.2. Les cellules de Müller

Les cellules de Müller constituent 90% des cellules gliales rétinienne des vertébrés (Reichenbach, 1995), dont les prolongements se retrouvent dans toute la rétine et assurent un lien de part et d'autre de la rétine (Goldman, 2014; Vecino *et al.*, 2016). Elles jouent un rôle important dans le contrôle de l'homéostasie de la rétine, dans le maintien de l'intégrité structurale rétinienne, le recyclage du glutamate, le métabolisme du glucose et dans la relâche de facteurs trophiques (Reichenbach et Bringmann, 2013; Hoon *et al.*, 2014). Les cellules de Müller et les astrocytes entourent les vaisseaux sanguins rétinienne, contribuant à l'organisation structurale de la barrière hémato-rétinienne (Reichenbach *et al.*, 1995) et assurant un échange métabolique entre le système vasculaire et les neurones (Reichenbach *et al.*, 1995). Leur position autour des vaisseaux dans la couche nucléaire interne de la rétine leur permet également de participer au développement du système vasculaire et à la régulation du débit sanguin (Coorey *et al.*, 2012; Vecino *et al.*, 2016). Dans les conditions de stress, les cellules de Müller deviennent réactives. Cette réaction appelée gliose est un couteau à double tranchant qui peut être à la fois bénéfique et nuisible pour la rétine (Bringmann et Reichenbach, 2001). Dans la phase aiguë de la réponse inflammatoire, l'activation des cellules de Müller protège la rétine en sécrétant des anti-oxydants et des facteurs trophiques (Honjo *et al.*, 2000). Toutefois, ces cellules libèrent également d'autres facteurs qui peuvent exacerber les événements inflammatoires, tels que le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) qui induit une néovascularisation et une altération de la barrière hémato-

rétinienne (Bringmann *et al.*, 2006). De plus, les cellules de Müller réactives surexpriment l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote inductible qui produit des quantités excessives du monoxyde d'azote; une réponse qui peut contribuer au développement des pathologies rétiniennes, qu'on discute dans la section 1.5.1 de cette thèse (Goureau *et al.*, 1994). Les réponses additionnelles des cellules de Müller aux lésions incluent également un changement de morphologie (ramification et hypertrophie du corps cellulaire), une migration vers les régions endommagées et une augmentation de l'expression de la protéine acide fibrillaire gliale (GFAP) (Rungger-Brandle *et al.*, 2000; Lupien *et al.*, 2004).

#### 1.2.2.2.3. Les astrocytes

Astro(cyte) est un terme grec qui signifie étoile, mettant en exergue la morphologie étoilée de ces cellules (Matyash et Kettenmann, 2010). La distribution des astrocytes dans la rétine concorde avec la distribution des vaisseaux sanguins (Vecino *et al.*, 2016). Les astrocytes sont généralement identifiés par l'expression de la (GFAP), qui structure les prolongements cytoplasmiques de cette cellule. Les astrocytes ont plusieurs rôles similaires à ceux des cellules de Müller. En effet, les astrocytes contribuent à la formation de la barrière hémato-rétinienne, à l'approvisionnement des cellules rétiniennes en nutriments, au support biochimique des neurones et cellules de l'endothélium vasculaire, au maintien de l'homéostasie ionique du milieu extracellulaire et à la réparation des sites endommagés lors de traumatismes (Scholz et Woolf, 2007; Gao et Ji, 2010). De plus, les astrocytes peuvent moduler le potentiel membranaire des neurones en relâchant des neurotransmetteurs tels que le glutamate (neurotransmetteur exciteur) (Fiacco *et al.*, 2009). Ils sont aussi considérés comme étant une source du VEGF, les impliquant ainsi dans la néovascularisation physiologique (Stone *et al.*, 1995) et pathologique (Ozaki *et al.*, 2000). Les astrocytes jouent également un rôle dans le métabolisme neuronal (Ramírez, 1998), l'approvisionnement des neurones en glucose ainsi que dans le stockage du glycogène dans leur cytoplasme (Witkovsky *et al.*, 1985).

#### 1.2.2.2.4. La microglie

Les cellules microgliales sont des macrophages résidents de la rétine, qui possèdent à la fois des fonctions physiologiques et pathologiques (Karlstetter *et al.*, 2015). La microglie est impliquée dans le développement et le maintien du réseau neuronal et l'homéostasie tissulaire (Fernandes *et al.*, 2014; Gertig et Hanisch, 2014; Rashid *et al.*, 2019). Lors du développement de

la rétine, ces cellules se localisent dans les couches GCL et IPL et phagocytent les déchets métaboliques produits par les cellules ganglionnaires (Bodeutsch et Thanos, 2000). Après la naissance, elles participent au remodelage synaptique et au développement du réseau neuronal (Bodeutsch et Thanos, 2000). Une fois la phase de développement est terminée, les cellules microgliales migrent vers les couches IPL et OPL et adoptent un phénotype au repos caractérisé par une morphologie très ramifiée (prolongements cytoplasmiques) et un petit corps cellulaire (Karlstetter *et al.*, 2015). Contrairement à ce que son nom l'indique, la microglie quiescente est très active. En effet, la microglie quiescente utilise ses prolongements cytoplasmiques pour éliminer les déchets métaboliques et les débris cellulaires accumulés dans le tissu rétinien (Nimmerjahn *et al.*, 2005), et pour rester en contact avec les cellules rétiniennes ce qui est essentiel pour pouvoir accomplir son rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire, des structures synaptiques et de la neurotransmission des neurones (Wang *et al.*, 2016). Les cellules microgliales répondent aux stimuli en sécrétant divers médiateurs tels que les cytokines, les chimiokines, les espèces réactives à l'oxygène, le monoxyde d'azote, la phospholipase A2, les facteurs de croissance (de l'insuline et des fibroblastes II), et les facteurs neurotrophiques (dérivés du cerveau et de la lignée cellulaire gliale) (Jha *et al.*, 2013). La microglie possède également des récepteurs pour des neurotransmetteurs et des neuromédiateurs (tels que le GABA, le glutamate, la bradykinine, et l'angiotensine II, etc...), et pour des cytokines et des chimiokines (telles que le TNF $\alpha$ , les interleukines, le facteur de croissance épidermique, etc...) leur permettant de traiter les signaux envoyés par les cellules avoisinantes ou distantes (Kettenmann *et al.*, 2011). Par ailleurs, lors d'une perturbation de son environnement, la microglie devient réactive et orchestre les événements inflammatoires dans la rétine. L'activation de la microglie a été associée à plusieurs pathologies rétiniennes telles que la RD, la DMLA, le glaucome et la rétinite pigmentaire (Ma *et al.*, 2009; Ambati *et al.*, 2013; Grigsby *et al.*, 2014; Guillonnet *et al.*, 2017; Rashid *et al.*, 2019). En s'activant, elles adoptent une morphologie amiboïde (en rétractant ses prolongements et s'hypertrophiant), prolifèrent et migrent vers les sites de lésions (Rashid *et al.*, 2019). En cas de lésion aiguë, la microglie réactive protège la rétine et facilite un rétablissement rapide de l'homéostasie tissulaire (Bellver-Landete *et al.*, 2019). Toutefois, la microglie réactive libère des médiateurs inflammatoires (tels que l'IL-1 $\beta$ , le VEGF, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, et le CCL2) et une activation chronique exacerbe la réponse inflammatoire (Guillonnet *et al.*, 2017). Des avancées récentes par l'équipe de Dr Langmann ont montré qu'une accumulation de la microglie réactive

dans l'espace sous-rétinien induit une dégénérescence des photorécepteurs (Ma *et al.*, 2009; Scholz *et al.*, 2015; Nebel *et al.*, 2017; Madeira *et al.*, 2018). Une accumulation de la microglie amiboïde, et d'autres phagocytes mononucléaires a été également rapportée dans un modèle de néovascularisation choroïdienne chez la souris (Combadiere *et al.*, 2007; Luckoff *et al.*, 2016; Luckoff *et al.*, 2017). Par ailleurs, une infiltration sous-rétinienne des phagocytes mononucléaires exprimant le récepteur du chémokine ligand 2 (CCR2+) a été rapportée dans la rétine atteinte de DMLA atrophique et exsudative chez l'humain et la souris (Sennlaub *et al.*, 2013).

### 1.2.2.3. Les photorécepteurs

Les photorécepteurs, quant à eux, jouent un rôle dans la conversion du signal lumineux en potentiel membranaire. Ainsi, c'est dans cette couche que le traitement de la lumière commence. Dans cette catégorie, on trouve les cônes et les bâtonnets. La traduction de la lumière se fait dans la membrane des segments externes des cônes et bâtonnets. Les cônes et bâtonnets font des synapses avec les cellules bipolaires dans la couche plexiforme externe de la rétine en utilisant le glutamate comme neurotransmetteur (Hoon *et al.*, 2014). La transmission synaptique entre les cellules bipolaires et les photorécepteurs est modulée par les cellules horizontales (Hoon *et al.*, 2014).

Les bâtonnets sont plus concentrés dans la rétine périphérique, et sont responsables de la vision diurne (Rieke, 2000; Sampath et Rieke, 2004). Alors que les cônes sont plus abondants dans la rétine centrale, ils sont responsables de la vision en couleur et en haute acuité, et cela grâce aux différents types de cônes qui détectent différentes longueurs d'onde (Hoon *et al.*, 2014) et une très faible convergence des signaux des photorécepteurs sur les cellules bipolaires et ganglionnaires. Chez l'humain il existe trois différents types de cônes qui détectent soit une courte (S; bleu), une moyenne (M; vert) ou une longue longueur d'onde (L; rouge). Les rats néanmoins expriment seulement les cônes S (7%) et M (~93%) (Szel et Rohlich, 1992).

### 1.2.2.4. Les cellules bipolaires

Les cellules bipolaires reliant les photorécepteurs aux cellules ganglionnaires sont divisées en deux types principaux : les cellules bipolaires cônes (qui font des synapses avec les cônes) et les cellules bipolaires bâtonnets (qui font des synapses avec les bâtonnets) (Hoon *et al.*, 2014). Selon leur fonction, les cellules bipolaires sont divisées en deux sous-classes : les cellules

bipolaires "ON" et les cellules bipolaires "OFF". Les cellules bipolaires ON font des contacts avec les cônes et les bâtonnets et sont responsables de la dépolarisation de la membrane, alors que les cellules bipolaires OFF font des contacts exclusifs avec les bâtonnets et sont responsables de l'hyperpolarisation de la membrane (Hoon *et al.*, 2014). Les cellules bipolaires se connectent avec les cellules amacrines et ganglionnaires dans l'IPL pour leur transmettre le signal émis par les photorécepteurs.

#### 1.2.2.5. Les cellules horizontales

Une fois le signal lumineux arrivé à la couche des photorécepteurs, ceux-ci vont le convertir en un signal électrique et le transmettre aux cellules bipolaires, aux cellules ganglionnaires avant de le transmettre au nerf optique. Ces transmissions sont assurées par les cellules horizontales et amacrines. Les cellules horizontales sont les cellules d'association de la couche plexiforme externe et jouent un rôle clé dans la communication intercellulaire dans la rétine (Peichl et Gonzalez-Soriano, 1994). Il existe plusieurs types de cellules horizontales tout dépendamment de l'espèce, par exemple les primates possèdent deux types cellulaires, l'humain trois (Wassle et Boycott, 1991), alors que le rat a un seul type de cellules horizontales (Peichl et Gonzalez-Soriano, 1994).

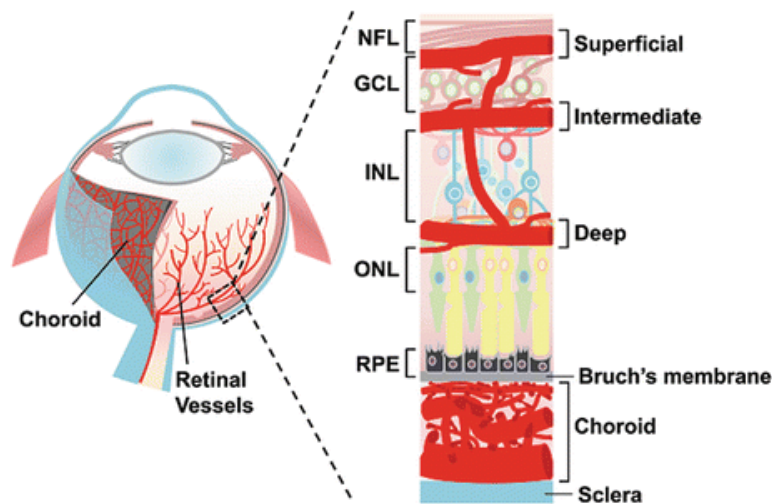
#### 1.2.3. Le réseau vasculaire rétinien et choroïdien

L'approvisionnement de l'œil en nutriments et en oxygène est réalisé par l'intermédiaire de l'artère ophtalmique, une branche de l'artère carotide interne. L'artère ophtalmique longe le nerf optique et l'accompagne dans la paroi interne de l'œil, puis bifurque en artères ciliaires postérieures et antérieures qui desservent le corps ciliaire, l'iris et la choroïde, et en artère centrale de la rétine, responsable de l'irrigation de la partie interne de la rétine (Hayreh, 2006; Labbé, 2014).

L'artère centrale de la rétine longe le nerf optique, et pénètre dans le globe oculaire où elle se divise en quatre branches pour approvisionner les quatre quadrants de la rétine. L'artère centrale de la rétine se ramifie dans la rétine en formant trois plexus situés dans la couche superficielle (entre la NFL et la GCL) et dans les couches internes (IPL et OPL) (Figure 4) (Chen *et al.*, 2016). Les artères situées en superficie bifurquent en un large réseau vasculaire et s'étendent vers l'ora serrata. Les veines de la rétine suivent un trajet similaire à celui des artères. Elles sont logées parallèles aux artères et se ramifient en plusieurs branches qui croisent le réseau artériel. Les veines sortent du globe oculaire en adhérant la veine centrale de la rétine; parallèle à l'artère centrale de



la rétine. Les capillaires rétinien sont composés de cellules endothéliales qui reposent sur une membrane basale entourée par de péricytes. Les cellules vasculaires communiquent entre elles par des complexes de jonctions gap. Le réseau artériel irrigue uniquement la partie interne de la rétine alors que la partie externe de la rétine (la couche des photorécepteurs et de l'EPR) est dépourvue de vaisseaux, recevant son approvisionnement des capillaires choroïdiens (Gray, 2008; Chen *et al.*, 2016).



**FIGURE 4: UNE REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DU LIT VASCULAIRE OCULAIRE**

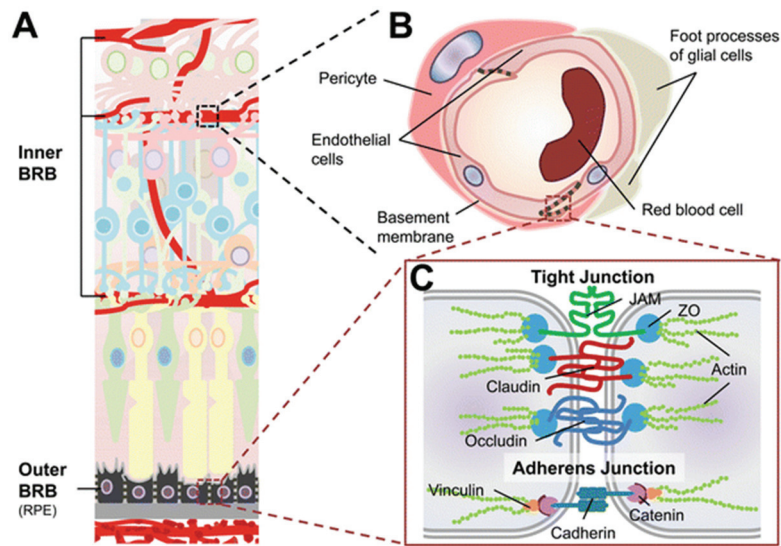
À gauche: une illustration en coupe transversale d'un œil montrant les systèmes vasculaires rétinien et choroïdien. À droite: une illustration en coupe transversale de la rétine montrant les trois couches des vaisseaux rétiniens dans la couche des fibres nerveuses (NFL) et des cellules ganglionnaires (GCL), et dans les plexiformes situant de part et d'autre de la couche nucléaire interne (INL). Le réseau vasculaire choroïdien situé entre la couche de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) et la sclère pour irriguer la couche nucléaire externe (ONL) et le RPE. (Adaptée de Chen *et al.*, 2016).

Le réseau vasculaire choroïdien est subdivisé en trois plexus soit le plexus externe, intermédiaire et interne (Hartnett, 2013). Les capillaires internes sont situés proche de la membrane de Bruch pour irriguer la partie externe de la rétine (Paul Riordan-Eva, 2011) (Figure 4). Les réseaux vasculaires choroïdien et rétinien sont bien distincts, tant au niveau anatomique qu'au niveau fonctionnel. En effet, le réseau vasculaire choroïdien a un débit sanguin très élevé (Henkind, 1979)

fournissant 65 à 85% du volume sanguin total à l'œil (Bela Anand-Apte, 2011), mais un niveau d'extraction d'oxygène faible. Alors que le débit sanguin des vaisseaux réiniens est faible, il possède un niveau élevé d'extraction d'oxygène (Tornquist et Alm, 1979). En outre, les capillaires choroïdiens ont un endothélium très fenestré, laissant passer les macromolécules plasmatiques à travers, alors que l'endothélium des capillaires réiniens est continu et étanche aux molécules de faibles poids moléculaires (Nickla et Wallman, 2010). Cette étanchéité est assurée par des jonctions serrées, situées entre les cellules endothéliales. Les vaisseaux réiniens avec la couche EPR forment la barrière hémato-rétinienne, qui contrôle le transport des nutriments et assure la protection de la rétine contre les insultes externes.

#### 1.2.4. La barrière hémato-rétinienne

Les premières observations de la barrière hémato-rétinienne (BHR) ont été faites par Schnaudigel en 1913 et Palm en 1947 qui ont montré que l'injection du bleu de trypan dans la circulation systémique de lapins colore tous les organes sauf le cerveau et la rétine (Palm, 1947). La structure de la BHR et son rôle ont été par la suite décrits par Cunha-Vaz et Shakib en 1966 (Cunha-Vaz *et al.*, 1966; Shakib et Cunha-Vaz, 1966). La BHR joue un rôle crucial dans la protection de la rétine contre toute toxicité possible transmise par le sang, et dans le maintien de l'homéostasie rétinienne. C'est une barrière physiologique sélective qui contrôle les échanges de nutriments, d'ions, de protéines, d'eau, et de déchets métaboliques, entre la circulation sanguine et la rétine (Simo *et al.*, 2010; Diaz-Coranguez *et al.*, 2017). Ainsi, une altération de cette barrière contribue à la destruction de la rétine, et par la suite à des pathologies réiniennes qui peuvent causer une perte de la vision (Diaz-Coranguez *et al.*, 2017). La BHR est constituée principalement d'une barrière interne se trouvant dans les couches internes de la rétine, et d'une barrière externe qui est l'EPR (Figure 5) (Chen *et al.*, 2016).

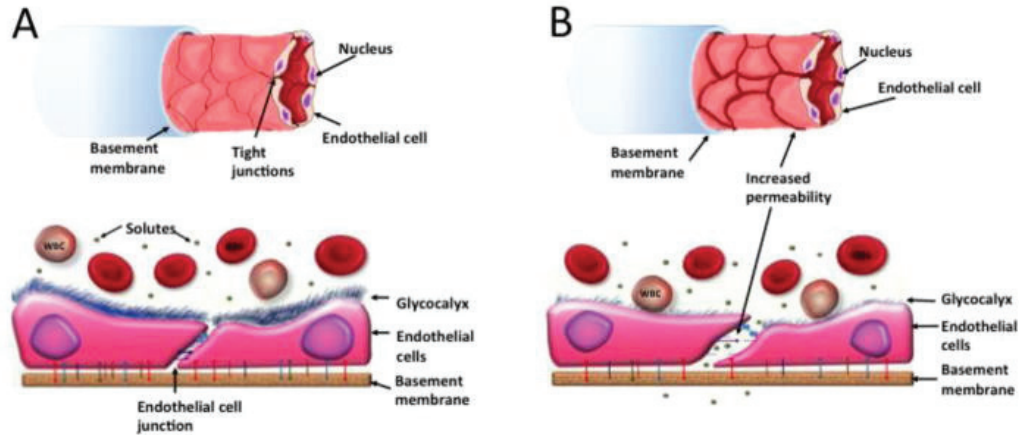


**FIGURE 5: LES COMPOSITIONS DE LA BARRIÈRE HÉMATO-RÉTINIENNE**

- (A) Une illustration schématique indiquant la localisation de la BHR interne et externe dans l'œil. (B) La BHR interne est composée de cellules endothéliales qui reposent sur une membrane basale, entourée par des péricytes et les extrémités des cellules gliales environnantes. Par ailleurs, l'épithélium pigmentaire rétinien forme la BHR externe. (C) L'étanchéité de la BHR est assurée par des jonctions adhérentes et serrées entre les cellules endothéliales et pigmentaires. (Adaptée de Chen *et al.*, 2016).

#### 1.2.4.1. La barrière hémato-rétinienne interne

La BHR interne est formée principalement d'un endothélium continu reposant sur une membrane basale entourée par des péricytes et des extrémités des cellules gliales avoisinantes (Figure 6) (Diaz-Coranguez *et al.*, 2017; Eshaq *et al.*, 2017). Cette barrière assure les échanges métaboliques entre les vaisseaux sanguins rétiens et la rétine interne, qui vont passer soit par voie transcellulaire (transcytose) ou par voie paracellulaire. La BHR restreint également la fuite des macromolécules plasmatiques, ainsi que le passage des molécules potentiellement toxiques pour la rétine. Dans les conditions pathologiques, cette barrière est altérée menant à son ouverture, et la perte de sa sélectivité dans le contrôle du passage moléculaire (Diaz-Coranguez *et al.*, 2017).



**FIGURE 6 : LA BARRIÈRE HÉMATO-RÉTINIENNE INTERNE**

(A) Dans les conditions physiologiques, l'endothélium possède une couche de glycocalyx et des jonctions adhérentes et serrées et des jonctions gap entre les cellules endothéliales, qui assurent les échanges métaboliques entre le lit vasculaire oculaire et la rétine et restreignent la fuite des macromolécules et d'autres agents nuisibles pour la rétine. (B) Ces jonctions sont altérées dans les conditions pathologiques, diminuant ainsi la sélectivité de la barrière hémato-rétinienne (Adaptée de Eshak *et al.*, 2017).

#### 1.2.4.1.1. Passage transcellulaire

Malgré qu'elle soit très peu observée, la transcytose à travers les cellules endothéliales est essentielle pour la régulation de l'homéostasie rétinienne (Diaz-Coranguez *et al.*, 2017). C'est un passage bidirectionnel (du sang à la rétine et de la rétine au sang) des vésicules qui se fait par des invaginations au niveau de la membrane des cellules endothéliales des vaisseaux rétinien (Chow et Gu, 2017). Pour les petites molécules, le passage se fait par diffusion passive à travers la membrane des cellules endothéliales (Toda *et al.*, 2011). Les plus grosses molécules ont néanmoins besoin d'énergie (ATP) pour être transportées en se couplant à un récepteur membranaire, ou par pinocytose, ou bien en utilisant des transporteurs ou des pompes (Diaz-Coranguez *et al.*, 2017).

#### 1.2.4.1.2. Passage paracellulaire

Le transport paracellulaire est contrôlé par trois types de jonctions : les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et les jonctions gap (Figure 5). Les jonctions serrées sont formées de plus de quarante protéines divisées en deux groupes incluant des protéines transmembranaires et des protéines cytoplasmiques (Diaz-Coranguez *et al.*, 2017; Viillard et Larrivee, 2017).

Les protéines transmembranaires incluent les claudines, les occludines et les molécules de jonctions d'adhésion (JAM), alors que les protéines cytoplasmiques sont constituées de zonulas, d'afadines et de cingulines (Bazzoni et Dejana, 2004; Balda et Matter, 2016). Les protéines transmembranaires interagissent avec les protéines cytoplasmiques pour former les jonctions serrées. Les jonctions adhérentes sont composées des protéines transmembranaires appelées cadhérines qui sont associées à des microfilaments d'actine. Les jonctions gap quant à elles sont formées de canaux traversant les deux membranes cellulaires pour former des plaques jonctionnelles.

#### 1.2.4.2. **La barrière hémato-rétinienne externe**

L'épithélium pigmentaire rétinien en séparant la choroïde de la rétine forme la BHR externe (Figure 5). Pour plus d'informations sur l'EPR, veuillez-vous référer à la section 1.2.1 de cette thèse. Brièvement, les jonctions serrées et adhérentes situées entre les cellules épithéliales contrôlent les échanges métaboliques et hydro-ioniques entre la circulation choroïdienne et la rétine. La membrane limitante externe participe également à la formation de la BHR externe.

### 1.3. **La rétinopathie diabétique**

Parmi les complications du diabète, la rétinopathie diabétique (RD) est la plus fréquente avec une prévalence de 47% (Diabetes et al., 2009). La RD est considérée comme la première cause de cécité dans le monde (Frank, 2004; Hirai *et al.*, 2011). Bien que l'apparition et la progression de la RD soient étroitement liées à la concentration du glucose plasmatique, d'autres facteurs dont la pression artérielle, la lipidémie sanguine, le stress oxydatif et l'inflammation contribuent au développement de la RD (Wong *et al.*, 2016; Avogaro et Fadini, 2019).

#### 1.3.1. **Le diabète mellitus**

Le terme diabète dérive du verbe grec *diabainen* qui signifie 'qui passe à travers', en référence à l'excrétion excessive d'urine (Kumar, 2005). Le terme diabète *mellitus* (diabète sucré comme le miel) se traduit par la production excessive d'urine sucrée (Kumar, 2005).

Le *diabète mellitus* est considéré comme l'épidémie majeure de ce siècle (Shaw *et al.*, 2010). Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), l'incidence globale du diabète a augmenté de 50% au cours des quatre dernières décennies. Une prévalence qui est estimée à doubler en 2030

(Danaei *et al.*, 2011). Le diabète est divisé en deux types : soit le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Le diabète peut aussi se manifester pendant la grossesse (diabète gestationnel) et dans d'autres conditions telles que dans le cas de la pathologie du pancréas exocrine (cas de fibrose kystique et pancréatite) ou dans le cas des troubles génétiques (diabète néonatal et diabète de la maturité apparaissant chez des jeunes (*Maturity Onset Diabetes of the Young*; MODY)) ("American Diabetes Association: clinical practice recommendations 1997," 1997).

#### 1.3.1.1. Le diabète de type 1

Il est estimé que 10% de la population canadienne vit avec le diabète de type 1 ([www.diabetes.ca](http://www.diabetes.ca)). Le diabète de type 1 est une pathologie auto-immune aboutissant à la destruction des cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas, qui produisent l'insuline en fonction des taux de glucose sanguin, et à une carence subséquente en insuline (Davies *et al.*, 1994; "American Diabetes Association: clinical practice recommendations 1997," 1997). Il n'existe actuellement aucune stratégie thérapeutique pour prévenir le développement du diabète de type 1. En effet, les patients diabétiques doivent recevoir des injections d'insuline pour contrôler leur glycémie (Keenan *et al.*, 2010).

L'homéostasie et l'élimination du glucose dans le corps sont principalement contrôlées par l'insuline et par la protéine de transport du glucose de type 4 (GLUT 4) (Huang et Czech, 2007). Brièvement, une augmentation de la concentration du glucose plasmatique induit la sécrétion d'insuline. Ce dernier, va stimuler la GLUT4 (sur le muscle squelettique et le tissu adipeux) pour absorber et stocker le glucose sous forme de glycogène ou l'oxyder pour produire de l'énergie (Huang et Czech, 2007). Or, une déficience en insuline cause une augmentation chronique des concentrations de glucose plasmatique et urinaire. Il s'avère que l'hyperglycémie chronique est un initiateur majeur de complications macrovasculaires touchant en premier le cœur et ses larges vaisseaux, et de complications microvasculaires touchant les petits vaisseaux notamment les reins (néphropathie), les nerfs (neuropathie) et la rétine (rétinopathie) (Forbes et Cooper, 2013). Les complications du diabète sont considérées comme la première cause de cécité, morbidité et de mortalité chez les personnes diabétiques (Sheetz et King, 2002).

### 1.3.1.2. Modèles animaux de diabète de type 1

Plusieurs espèces animales ont été utilisées pour étudier la RD notamment le singe, le cochon, le poisson zèbre, le chien et le rongeur (Jiang *et al.*, 2015). Néanmoins, les rongeurs sont les plus utilisés surtout le rat vu la rapidité du développement de la RD et le coût (Jiang *et al.*, 2015). Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune où le système immunitaire attaque les cellules  $\beta$  du pancréas. Dans les modèles animaux, la destruction de ces cellules est atteinte par des agents chimiques comme la streptozotocine et l'alloxan, par l'ablation partielle du pancréas (pancréatectomie), par la modification génétique, par l'injection de virus ou par l'utilisation des rongeurs spontanément diabétiques (King, 2012).

#### 1.3.1.2.1. Les agents chimiques

*La streptozotocine* : (STZ) [2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucopyranose)] est un antibiotique qui est sélectivement toxique pour les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas. Grâce à sa structure similaire au glucose, la STZ est transportée dans les cellules  $\beta$  par la protéine de transport du glucose de type 2 (GLUT 2). Cette molécule est sélective pour la GLUT2 et n'est pas reconnue par les autres transporteurs de glucose. Les cellules  $\beta$  sont riches en GLUT2 et vont alors transporter la STZ. Notons que la STZ est également toxique aux autres organes exprimant la GLUT2 tels que les reins, le foie et l'hypothalamus (Jiang *et al.*, 2015).

La STZ est un agent alkylant, une fois pénétrée dans les cellules  $\beta$ , elle inhibe la synthèse de l'ADN menant à une déficience de la sécrétion d'insuline. Une dose idéale de STZ est comprise entre 55 et 65 mg/Kg chez le rat (Jiang *et al.*, 2015). Les rats STZ, modèle utilisé dans la première étude de cette thèse, sont plus utilisés que les souris vu leur rapidité à développer une réponse inflammatoire après traitement à la STZ contrairement aux souris qui ont une résistance à développer une RD à la STZ (qui peut prendre des mois) (Jiang *et al.*, 2015). Les rats STZ présentent une augmentation de la perméabilité vasculaire, une augmentation de l'expression du VEGF et une perte des péricytes dans la rétine (Pouliot *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2015).

*L'alloxane* : (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil) est un agent chimique qui est rapidement absorbé par les cellules  $\beta$  (Nerup *et al.*, 1994), dans lesquelles il va se transformer en radicaux libres causant la fragmentation de l'ADN de ces cellules (Szkudelski, 2001). Néanmoins, vu ses effets secondaires et sa toxicité très élevée comparée à la STZ, l'alloxane est moins utilisée que la STZ (Jiang *et al.*, 2015).

#### 1.3.1.2.2. Les modèles spontanés

Trois modèles diabétiques spontanés ont été décrits, soit les souris diabétiques non-obèses (NOD), les rats *biobreding* (BB) et les rats LEW.1AR1/Ztm-iddm (Yang et Santamaria, 2006). Ces trois modèles développent le diabète à la suite d'une infiltration des cellules immunitaires dans le pancréas causant une destruction des cellules  $\beta$  (King, 2012). Ces modèles sont intéressants et populaires pour les études des maladies auto-immunes et génétiques du diabète visant à comprendre la tolérance de transplantation d'îlots et les mécanismes impliqués dans le développement du diabète de type 1 (King, 2012).

#### 1.3.1.2.3. Le modèle de diabète insulino-dépendant génétiquement induit

Les souris AKITA développent un diabète insulino-dépendant dû à une mutation du gène 2 de l'insuline; ce gène est responsable de la conversion de la pro-insuline en insuline et son absence augmente le stress du réticulum endoplasmique (King., 2012). Néanmoins, ces souris ont besoin d'être traitées à l'insuline pour survivre. Ce modèle peut être utilisé pour remplacer le modèle STZ vu son absence en cellules  $\beta$  (Mathews *et al.*, 2002), surtout pour étudier les complications microvasculaires induites par le diabète (Drel *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2011).

#### 1.3.1.2.4. Modèle de diabète induit par des virus

Des virus ont été récemment utilisés pour produire un modèle de diabète de type 1, soit par l'induction d'une réponse auto-immune contre les cellules  $\beta$  soit par une infection directe de ces cellules (van der Werf *et al.*, 2007). Les virus utilisés pour ce modèle sont le Coxsackie du groupe B, un virus à ARN pouvant causer l'encéphalomyocardite (Jaidane *et al.*, 2009). Néanmoins, ce modèle n'est pas trop populaire vu sa complexité puisque l'induction du diabète dépend de la réplication et du temps d'infection (King, 2012).

#### 1.3.1.2.5. La pancréatectomie

Durant la pancréatectomie partielle, une partie du pancréas est enlevée pour induire le diabète de type 1. Ce modèle se fait généralement chez les animaux de grande taille comme le cochon, le primate et le chien (Mellert *et al.*, 1998; Fisher *et al.*, 2001). C'est un modèle très invasif et son utilisation est limitée aux études intéressées par l'auto-transplantation des îlots pancréatiques (Emamaullee *et al.*, 2009).



### 1.3.2. Physiopathologie de la rétinopathie diabétique

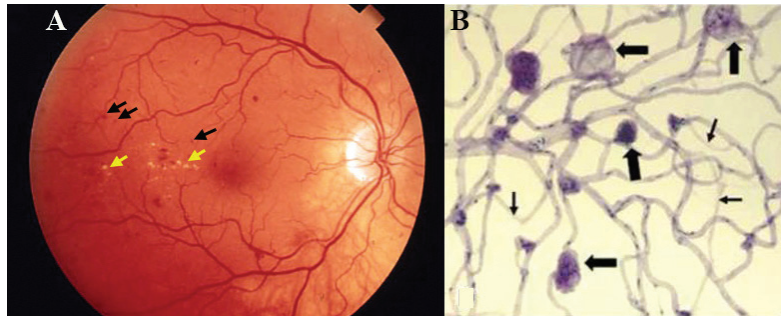
La RD est l'une des complications microvasculaires les plus fréquentes chez les diabétiques dont le risque de la développer s'élève à 90% chez les patients diabétiques de type 1 et à 50 à 60% chez les patients diabétiques de type 2 (Klein *et al.*, 1984; Wong *et al.*, 2016). Les premières altérations lors d'une RD se manifestent par des signes cellulaires de l'inflammation et des signes biochimiques du stress oxydatif (Penn *et al.*, 2008).

Les altérations vasculaires surviennent dans les stades précoces et se manifestent par une perte des péricytes, un amincissement de la membrane basale, une dégénérescence des cellules endothéliales, une leucostase, une agrégation plaquettaire, et par une altération du débit sanguin rétinien (Penn *et al.*, 2008). Ces événements peuvent bloquer les vaisseaux, stimulant ainsi la production des facteurs angiogéniques pour compenser la diminution dans l'approvisionnement en oxygène et nutriments. Les facteurs angiogéniques vont affaiblir les jonctions cellulaires, aboutissant à l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne (Penn *et al.*, 2008). Ainsi, avec la progression des altérations vasculaires, des micro-anévrysmes, des hémorragies, des tâches de nodules cotonneux et d'autres manifestations commencent à apparaître lors d'un examen ophtalmoscopique (Penn *et al.*, 2008).

### 1.3.3. Les stades de la rétinopathie diabétique

En fonction de la progression des altérations vasculaires mentionnées ci-dessus, la RD est subdivisée en trois stades principaux, soit le stade non-prolifératif, le stade pré-prolifératif et le stade prolifératif.

Les altérations vasculaires observées dans le stade non-prolifératif sont un amincissement de la paroi vasculaire, une perte des cellules endothéliales et des péricytes, une ouverture de la barrière hémato-rétinienne et une apparition des micro-anévrysmes (Figure 7) (Kollias et Ulbig, 2010; Tang et Kern, 2011; Bhat *et al.*, 2014; Simo *et al.*, 2018).



**FIGURE 7: RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE NON-PROLIFÉRATIVE**

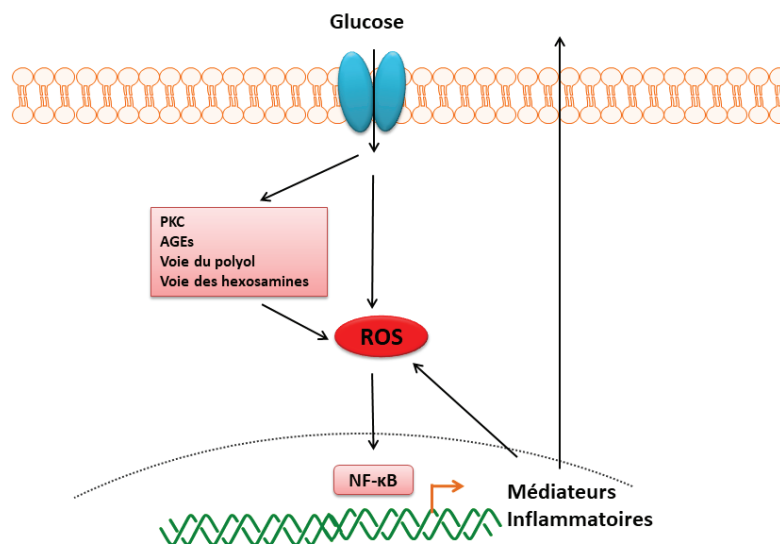
(A) Une image du fond d'œil d'un patient atteint de rétinopathie diabétique non proliférative. Des micro-anévrismes peuvent être observés (flèches noires) ainsi que des exsudats (flèches jaunes) (Adaptée de Kollias et Ulbig, 2010). (B) Une image d'une rétine d'un patient diabétique montrant l'apparition des micro-anévrismes (flèches épaisses) et des capillaires dégénérés (flèches minces) (Adaptée de Tang et Kern, 2011).

Dans le stade pré-prolifératif, une dysfonction endothéliale drastique se produit accompagnée d'une surproduction de vasoconstricteurs (tels que la thromboxane A2 et l'endothéline) favorisant ainsi une ischémie (Wong *et al.*, 2016). D'autre part, une accumulation des leucocytes et des fibrines plaquettaires pourrait se produire, menant à l'occlusion de vaisseaux privant ainsi la rétine neurosensorielle de l'apport en oxygène et en nutriments (Wong *et al.*, 2016). Pour compenser, les vaisseaux se dilatent et forment des dérivations (shunts) entre les veines et les artères avec l'apparition de nodules cotonneux (accumulation de matériel axonal qui apparaît blanc sur le fond d'œil) (Wong *et al.*, 2016). La RD pré-proliférative pourrait évoluer au stade prolifératif marqué par la néovascularisation pathologique. Brièvement, l'hypoxie sévère (résultant de l'ischémie) stimule la production des facteurs angiogéniques comme le VEGF. D'autre part, les leucocytes accumulés sécrètent des protéases qui dégradent la membrane basale des vaisseaux. Ensemble, ces événements stimulent la migration et la répllication des cellules endothéliales qui forment de nouveaux vaisseaux. Ces vaisseaux sont anormaux et fragiles, ce qui peut causer des hémorragies et la formation de fibrose (Simo *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2016). Dans un stade avancé, ces vaisseaux vont croître vers la cavité vitréenne et vont se rétracter causant un détachement de la rétine causant la cécité (Wong *et al.*, 2016). Il convient de noter qu'un œdème maculaire, résultant de l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'accumulation de fluides dans la macula, peut se produire à n'importe quel stade de la RD (Wong *et al.*, 2016). L'œdème maculaire est l'une

des causes les plus communes de la perte sévère de la vision centrale dans la RD, dont le risque de le développer s'élève à 20,1% chez les patients diabétiques de type 1, et à 13.9 à 25,4% chez les patients diabétiques de type 2 (Klein *et al.*, 1995; Frank, 2004).

### 1.3.4. Les voies moléculaires impliquées dans la pathogenèse de la rétinopathie diabétique

La RD est une pathologie très complexe et multifactorielle. En effet, l'hyperglycémie active de multiples voies moléculaires qui contribuent à la pathogenèse de la RD, y compris les voies métaboliques et hémodynamiques, le stress oxydatif et l'inflammation (Figure 8). Je me concentre dans cette partie sur les voies métaboliques et par la suite sur le processus inflammatoire (section 1.3.4.2 de cette thèse) et le stress oxydatif (section 1.5 de cette thèse).



**FIGURE 8: LES DIFFÉRENTES VOIES IMPLIQUÉES DANS LA PATHOGENÈSE DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE**

L'hyperglycémie chronique, la voie du polyol, la formation des produits de glycation avancée (AGEs) et la voie de la protéine kinase C (PKC) augmentent le stress oxydatif, causant une réponse inflammatoire vasculaire et une dysfonction mitochondriale.

#### 1.3.4.1. Les voies métaboliques

##### 1.3.4.1.1. La voie du polyol

La voie du polyol représente un très faible pourcentage de la dégradation totale du glucose. L'aldose réductase (AR) est une enzyme qui détoxifie les cellules en transformant les aldéhydes en

alcool. Dans les conditions physiologiques, l'aldose réductase a une faible affinité pour le glucose qui est converti en pyruvate par glycolyse. Or, lors d'une hyperglycémie, l'affinité de l'AR pour le glucose augmente, le métabolisme du glucose est ainsi redirigé de la glycolyse vers la voie du polyol. Le glucose suivra ainsi deux réactions, dans une première étape l'AR convertit le glucose en sorbitol accompagné par une oxydation de la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) en NADP<sup>+</sup>. Par la suite, et par l'action de la sorbitol déshydrogénase, le sorbitol est oxydé en fructose en réduisant la nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) en NADH. Par conséquent, les niveaux cellulaires de l'antioxydant (NADPH) diminuent et ceux du NADH; une source importante à la chaîne respiratoire des mitochondries (Brownlee, 2001; Forbes et Cooper, 2013) ce qui provoque une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Brownlee, 2001). L'augmentation des ROS altère l'acide désoxyribonucléique (ADN), les lipides et les protéines. L'activité gliale, la perte des péricytes, la neurodégénérescence ainsi que l'altération de l'endothélium vasculaire ont été associées à l'accumulation du sorbitol dans la RD (Lorenzi, 2007).

#### 1.3.4.1.2. La formation intracellulaire des produits de glycation avancée

Les produits de glycation avancée (AGEs) sont les produits d'une réaction non-enzymatique entre le glucose ou le fructose avec les résidus des protéines, des lipides ou des acides nucléiques (Brownlee, 2001). En normoglycémie, la formation des AGEs est réversible alors qu'elle est irréversible dans les conditions d'hyperglycémie (Brownlee, 2001). En se liant à leurs récepteurs RAGE, les AGEs peuvent induire la production d'une pléiotropie de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs de transcription pro-inflammatoires (Shimizu *et al.*, 2011; Forbes et Cooper, 2013) et augmentent la production des ROS (Wendt *et al.*, 2003; Coughlan *et al.*, 2009). Les AGEs, en réagissant avec les composants cellulaires, contribuent à l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne, à l'amincissement de la membrane basale des vaisseaux et aux changements vasculaires dans la RD (Kalfa *et al.*, 1995; Mott *et al.*, 1997; Shimizu *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2018).

#### 1.3.4.1.3. Activation de la protéine kinase C (PKC)

L'hyperglycémie active indirectement la PKC, soit via la formation de diacylglycérol (DAG), par l'activation de la phospholipase C (PLC) ou encore par l'inhibition de la DAG kinase (Keogh *et al.*, 1997). Il y a au moins onze isoformes de PKC, dont quatre qui seront activées dans la RD; la PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  (Koya et King, 1998; Brownlee, 2001; Suzuma *et al.*, 2002). Chacune de ces isoformes déclenche des réponses bien distinctes. Par exemple, la PKC  $\beta$  contribue à

l'altération du flux sanguin rétinien (Ishii *et al.*, 1996) alors que la PKC  $\alpha$  augmente la perméabilité des cellules endothéliales en culture avec du glucose *in-vitro* (Hempel *et al.*, 1997). L'activation du facteur de transcription nucléaire  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) et de la NADPH oxydase dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires en culture par le glucose a été associée à la PKC (Pieper et Riaz ul, 1997; Yerneni *et al.*, 1999). Le diabète augmente l'expression du VEGF dans le muscle lisse vasculaire via l'activation de la PKC, ce qui peut causer une dysfonction endothéliale (Williams *et al.*, 1997). Pour terminer, la PKC en activant la NADPH oxydase mitochondriale augmente le stress oxydatif ce qui exacerbe la pathologie de la RD (Inoguchi *et al.*, 2000). Malgré son efficacité dans les modèles animaux de RD, l'inhibiteur de la PKC $\beta$  (ruboxistaurin) a montré une faible efficacité chez l'humain (Davis *et al.*, 2009; Aiello *et al.*, 2011; Boyd *et al.*, 2011).

#### 1.3.4.1.4. La voie des hexosamines

Une fois le glucose transporté dans la cellule, il est dégradé en glucose-6-phosphate et par la suite en fructose-6-phosphate par l'action de l'enzyme glutamine fructose-6-phosphate aminotransférase. Une augmentation de la concentration intracellulaire du glucose aboutit à une dégradation du fructose-6-phosphate en UDP N-acetylglucosamine. Ce dernier et par l'action de l'enzyme O-lié N-acetylglucosamine (O-linked N-acetylglucosamine) réagit avec les sérines et thréonines des facteurs de transcription, ce qui altère l'expression des gènes dans les tissus diabétiques tout en apportant des modifications post-translationnelles aux protéines se trouvant dans le cytoplasme et le noyau (Sayeski et Kudlow, 1996; Kolm-Litty *et al.*, 1998; Du *et al.*, 2000; Forbes et Cooper, 2013).

#### 1.3.4.2. **L'inflammation**

L'augmentation du stress oxydatif dans les conditions pathologiques active le NF- $\kappa$ B qui, à son tour, déclenche la transcription des gènes des médiateurs pro-inflammatoires (Kern *et al.*, 2007).

##### 1.3.4.2.1. Les cytokines pro-inflammatoires:

Les cytokines sont des protéines de petite taille (de 5 à 20 kDa) impliquées dans la signalisation cellulaire, notamment dans l'immunomodulation et le développement embryonnaire (Saito, 2001; Goodman, 2006). Les cytokines peuvent être secrétées par toutes les cellules nucléées telles que les cellules endothéliales, épithéliales et immunes (lymphocytes B, T et macrophages)

(Goodman, 2006). Vu leur nature peptidique, les cytokines ne peuvent pas traverser la couche lipidique membranaire, donc leur action se fait via des récepteurs membranaires pour moduler la réponse immunitaire (Schafers et Sorkin, 2008). Les cytokines sont une très large famille incluant des chimiokines, des interférons, des interleukines, des lymphokines et des facteurs de nécrose tumorale. Dans le cadre de cette thèse, je vais me concentrer sur le rôle de l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).

#### 1.3.4.2.2. Interleukine-1 $\beta$

La famille de l'interleukine-1 comprend onze membres participant à l'immunité innée et l'inflammation (Dinarelo, 2011, 2018). Les interleukines 1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) et bêta (IL-1 $\beta$ ) sont les plus connues et les plus étudiées pour leur implication dans les pathologies oculaires, particulièrement la RD, la DMLA et la rétinite pigmentaire (Wooff *et al.*, 2019). Ces deux cytokines sont codées par deux gènes différents, mais agissent sur le même récepteur qui est l'IL-1R (Clark *et al.*, 1986). Elles possèdent des effets pro-inflammatoires similaires (Afonina *et al.*, 2015). Contrairement à l'IL-1 $\alpha$  qui est une cytokine constitutive et active dans sa forme de précurseur, l'IL-1 $\beta$  est hautement inductible et produite dans une forme de précurseur (35 kDa) et ne devient active (17kDa) qu'à la suite de l'activation de l'inflammasome (Gabay *et al.*, 2010). En effet, le gène IL-1 $\beta$  code pour le précurseur IL-1 $\beta$ , qui par l'action de l'enzyme caspase 1, donne l'IL-1 $\beta$  mature (Clark *et al.*, 1986). De plus, l'IL-1 $\alpha$  est impliquée dans la phase aiguë de l'inflammation alors que l'IL-1 $\beta$  est impliquée dans la phase chronique (Afonina *et al.*, 2015).

L'IL-1 $\beta$  est impliquée dans les réponses inflammatoires et auto-immunes, dans l'activation de plusieurs voies de signalisation cellulaire incluant l'apoptose et dans la différenciation et la prolifération cellulaire (Sutton *et al.*, 2009; Wooff *et al.*, 2019). L'IL-1 $\beta$  est d'un intérêt très particulier, puisqu'elle est impliquée dans la phase chronique de l'inflammation et dans les pathologies oculaires (Wooff *et al.*, 2019). En effet, les patients ayant une DMLA humide ont des niveaux élevés de l'IL-1 $\beta$  dans la vitrée (Zhao *et al.*, 2015b). L'antagoniste du récepteur de l'IL-1 (l'IL-1R) diminue la taille de la CNV chez les rongeurs (Lavalette *et al.*, 2011). De plus, les injections intravitréennes d'inhibiteurs de l'IL-1 $\beta$  renversent l'expression des chimiokines, diminuent l'infiltration des macrophages et l'apoptose des photorécepteurs dans un modèle de DMLA sèche chez le rat (Natoli *et al.*, 2017). L'IL-1 $\beta$  est également impliquée dans la RD. En effet, l'hyperglycémie induit l'expression de l'IL-1 $\beta$  dans la rétine des rats diabétiques STZ

(Scuderi *et al.*, 2015). De plus, une diminution des niveaux plasmatiques de l'antagoniste naturel de l'IL-1R (l'IL-1RA) a été rapportée chez les patients atteints de la RD (Chatziralli *et al.*, 2017).

#### 1.3.4.3. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Le VEGF est une glycoprotéine dimérique qui joue un rôle clé dans la néovascularisation physiologique et pathologique comme dans le cas de la rétinopathie diabétique, la rétinopathie des prématurés et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (Penn *et al.*, 2008; Kant *et al.*, 2009). Chez les mammifères, cinq familles de VEGF ont été décrites soit le VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, et le facteur de croissance placentaire (PlGF). Le VEGF-A est l'isoforme la plus étudiée et la plus associée à l'angiogenèse qui constitue la cible de la plupart des traitements anti-angiogéniques des pathologies oculaires néovasculaires (Ferrara, 2002). Dû à l'épissage alternatif, plusieurs isoformes du VEGFA existent chez l'humain dont les plus abondantes sont : l'isoforme VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189 et VEGF-206. Le VEGF est sécrété localement par les cellules ganglionnaires, les cellules macrogliales, l'EPR et l'endothélium vasculaire (Aiello *et al.*, 1995; Sone *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1997; Robbins *et al.*, 1997; Ida *et al.*, 2003).

Trois récepteurs classiques du VEGF à activité tyrosine kinase ont été décrits, soit le VEGFR-1/Flt-1 (fms-like tyrosine kinase), le VEGFR-2/Flk1/KDR (Kinase domain tyrosine kinase), et le VEGFR-3/Flt-4. Une fois activés, ces récepteurs subissent une auto-phosphorylation et stimulent les voies de transmission du signal. Le VEGF-A agit via VEGFR-1 et VEGFR-2. Le VEGF-B participe à la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration et l'adhésion cellulaire en se liant au VEGFR-1. Le VEGF-C et le VEGF-D se lient aux VEGFR-2 et VEGFR-3 pour réguler l'hématopoïèse et la lymphangiogenèse (Yancopoulos *et al.*, 2000). Le PlGF se lie sélectivement au VEGFR-1 pour potentialiser la prolifération des cellules endothéliales induite par le VEGF-A (Yonekura *et al.*, 1999). Les neuropilines 1 et 2, initialement décrits comme des récepteurs neuronaux liant les sémaphorines (dont le rôle est de guider la croissance des axones), peuvent également lier le VEGF soit en homodimérisant ou en hétérodimérisant avec les VEGFR-1 et VEGFR-2 (Gluzman-Poltorak *et al.*, 2000; Gluzman-Poltorak *et al.*, 2001).

Le VEGF est une molécule de nature très ambivalente. Bien qu'il soit impliqué dans les conditions physiologiques, ce facteur est considéré comme un contributeur principal du processus inflammatoire dans les pathologies oculaires, notamment la RD et la DMLA (Penn *et al.*, 2008). Le VEGF-A est le seul membre de la famille VEGF qui est induit par l'hypoxie et il est le plus

impliqué dans les conditions pathologiques telles que le cancer et les vasculopathies rétinienne (Kerbel, 2008; Wong *et al.*, 2016; Mesquita *et al.*, 2018). Le VEGF-165 est impliqué dans l'inflammation vasculaire, la néovascularisation pathologique et l'hyperperméabilité vasculaire dans les pathologies oculaires néo-vasculaires (Ishida *et al.*, 2003; Nishijima *et al.*, 2007).

L'hyperglycémie chronique induit une ischémie et une hypoxie qui stimulent la synthèse du VEGF. Le stress oxydatif est également impliqué dans la synthèse du VEGF. Pour compenser le déficit en oxygène et en métabolites, le VEGF stimule la croissance de nouveaux vaisseaux. Néanmoins, ces vaisseaux sont fragiles et perméables, causant des hémorragies dans le tissu rétinien, ce qui exacerbe la pathologie. De plus, Le VEGF est impliqué dans l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne (Aiello *et al.*, 1994; Qaum *et al.*, 2001). En effet, le VEGF induit la phosphorylation des jonctions cellulaires (occludines, ZO-1 et VE-cadhérine), augmentant ainsi la perméabilité vasculaire transcellulaire et paracellulaire (Antonetti *et al.*, 1999; Gavard et Gutkind, 2006). La surexpression du VEGF dans les pathologies oculaires néovasculaires a été décrite dans plusieurs modèles animaux et chez l'humain (Amadio *et al.*, 2016). Par conséquent, les anticorps anti-VEGF, que j'explique plus en détail dans la section suivante, ont permis d'améliorer l'acuité visuelle chez l'humain (Fogli *et al.*, 2018).

### **1.3.5. Les traitements de la rétinopathie diabétique**

Un contrôle de la glycémie est impératif pour réduire et ralentir la progression de la RD. En ce qui concerne les stratégies thérapeutiques pour traiter la RD, plusieurs procédures chirurgicales sont disponibles pour ralentir la progression de la pathologie. Néanmoins, ces traitements sont invasifs et ciblent le stade tardif de la RD, il n'y a toujours pas de traitement efficace pour les stades précoces qui sont plus répandus (Simo *et al.*, 2018).

#### **1.3.5.1. La photocoagulation au laser**

La photocoagulation au laser est utilisée pour traiter la RD proliférative et l'œdème maculaire (Frank, 2004; Bressler *et al.*, 2011). Elle consiste à détruire des spots du tissu rétinien par un faisceau laser, diminuant ainsi la demande en métabolites, l'hypoxie et l'expression du VEGF, ce qui peut diminuer l'hypoxie, l'expression du VEGF et la néovascularisation (Frank, 2004; Bressler *et al.*, 2011). Cette stratégie thérapeutique ralentit l'évolution de la pathologie, sans corriger la perte de vision ou l'évolution de la pathologie (Penn *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2016).



Par ailleurs, la destruction tissulaire peut causer des cicatrices rétinienne permanentes, entraînant des scotomes, une perte de la vision périphérique, de la couleur et une perte de la vision nocturne (Fong *et al.*, 2007; Penn *et al.*, 2008). Une néovascularisation secondaire peut aussi survenir comme phénomène compensatoire après un traitement de photocoagulation (Wong *et al.*, 2016).

#### 1.3.5.2. **La vitrectomie**

La vitrectomie est une chirurgie durant laquelle l'humeur vitrée est enlevée et remplacée par un gel. Cette stratégie est offerte aux patients qui ont une néovascularisation intravitréenne, une hémorragie dans le vitré ou un détachement de la rétine (Mohamed *et al.*, 2007).

#### 1.3.5.3. **Les injections intravitréennes de corticostéroïdes**

C'est dans les années 2000 que les injections intravitréennes de corticostéroïdes et des anti-VEGF ont été introduites pour traiter la RD et l'œdème maculaire, surtout pour les cas réfractaires à la photocoagulation au laser (Wong *et al.*, 2016). Les corticostéroïdes sont des anti-inflammatoires qui bloquent plusieurs voies d'inflammation; de plus, ils diminuent l'induction et l'expression du VEGF (Nauck *et al.*, 1998). Après l'introduction des anti-VEGF, les injections de corticostéroïdes ont été confinées aux patients ayant un œdème maculaire chronique ou ayant déjà subi une chirurgie pour cataracte (Wong *et al.*, 2016).

#### 1.3.5.4. **Les injections intravitréennes des anti-VEGF**

Les injections des agents anti-angiogéniques ou anti-VEGF consistent à neutraliser le VEGF; une protéine clé impliquée dans la croissance néovasculaire. Cette approche thérapeutique préserve et améliore l'acuité visuelle en inhibant la néovascularisation et en réduisant la perméabilité vasculaire. Les anti-VEGF sont actuellement la thérapie de choix; administrés seuls ou en combinaison avec la photocoagulation au laser (Elman *et al.*, 2011; Mitchell *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2012; Rajendram *et al.*, 2012). L'évolution des anti-VEGF vise une meilleure pénétration et efficacité (Seah *et al.*, 2020). Les quatre anti-VEGF les plus communément utilisés sont les suivants :

Le bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>, Hoffmann La Roche) est un anticorps monoclonal humain qui lie toutes les isoformes du VEGF-A. Ce traitement a une longue demi-vie mais une faible pénétration, et est utilisé pour traiter la néovascularisation (Schmucker *et al.*, 2012).

Le ranibizumab (Lucentis<sup>®</sup>, Novartis) est un fragment de l'anticorps monoclonal bevacizumab qui a une affinité de liaison pour toutes les isoformes du VEGF-A. Son efficacité et ses effets secondaires sont similaires à ceux du bevacizumab mais avec une meilleure pénétration. Il est utilisé pour traiter la néovascularisation et l'œdème maculaire (Schmucker et al., 2012).

Le pegaptanib (Macugen<sup>®</sup>, Eyetech Pharmaceuticals/Pfizer) est un aptamère qui se lie spécifiquement au VEGF-165; le principal isomère impliqué dans la néovascularisation pathologique et l'hyperperméabilité vasculaire (Stein et Castanotto, 2017).

L'aflibercept (Zaltrap<sup>®</sup>, Regneron pharmaceuticals) est une protéine de fusion recombinante constituée des domaines des récepteurs du VEGF humain (VEGF-R1 et VEGF-R2) qui lie le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C et le facteur de croissance placentaire (Stewart, 2012).

Il convient de noter que ces traitements invasifs ont besoin d'être répétés six à douze fois par année et présentent des risques élevés de développement d'ophtalmie, de cataractes, du glaucome et de détachement de la rétine (Elman *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2012; Rajendram *et al.*, 2012). De plus, 31% à 65% des patients ne répondent plus adéquatement après 6 mois de traitement et certains d'entre eux y deviennent même réfractaires (Antonetti *et al.*, 2012; Bressler *et al.*, 2018). Fait important, les injections intra-vitréennes des anti-VEGF interfèrent avec le rôle physiologique du VEGF non seulement au niveau de la rétine mais aussi au niveau systémique (Stewart, 2012; Simo *et al.*, 2014). En effet, ces neutralisants peuvent traverser la barrière hémato-rétinienne, passer dans la circulation systémique et provoquer des événements indésirables thromboemboliques, des infarctus du myocarde voire des accidents vasculaires cérébraux (Xu et Tan, 2017; Singh *et al.*, 2019). D'où la nécessité de trouver de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces et qui ciblent les stades précoces de la RD. Pour terminer, cibler les altérations vasculaires dans la RD est un atout, toutefois il y a d'autres voies qui jouent aussi un rôle crucial dans la pathogenèse de la RD, notamment la neuro-inflammation et la neurodégénérescence (Simo et Hernandez, 2015).

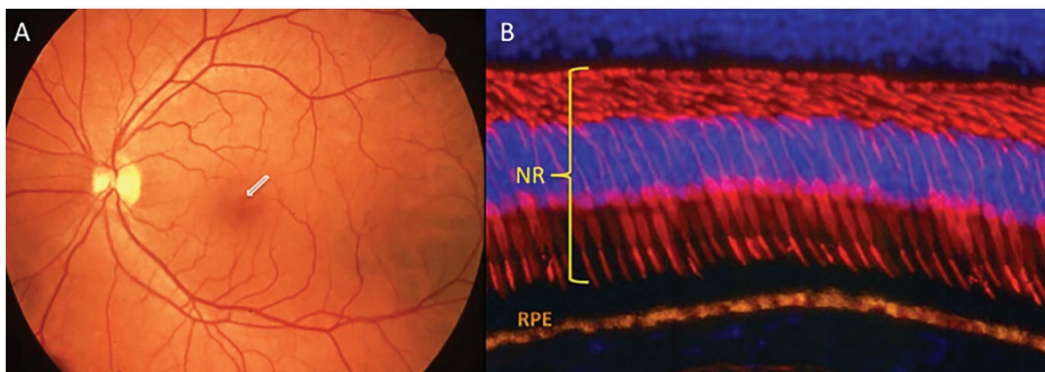
#### 1.4. La dégénérescence maculaire liée à l'âge

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est une pathologie à évolution progressive qui provoque la dégénérescence de la macula (Wong *et al.*, 2014). Elle entraîne une baisse de la vision centrale et peut apparaître avec l'âge généralement à partir de 50-55 ans (Friedman *et al.*,

2004). La DMLA est la cause principale de la cécité chez les personnes âgées, dont la prévalence mondiale est estimée à 8,7% en 2020 (Wong *et al.*, 2014).

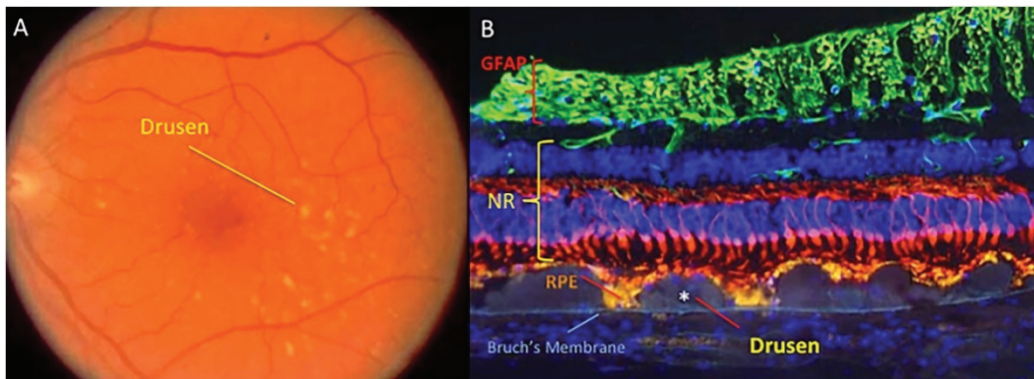
Dans des stades précoces, des dépôts lipidiques appelés drusen se forment et s'accumulent dans la partie sous-rétinienne. Les dépôts de type dur qui sont de petite taille (d'un diamètre plus petit que 63 nm) sont associés au vieillissement. Toutefois, les dépôts de drusen mous qui sont de grande taille (d'un diamètre plus grand que 125 nm) sont associés au développement du stade précoce de la DMLA (Guillonnet *et al.*, 2017). Ces drusen sont formés de plusieurs composants inflammatoires, lipidiques et protéiques (Figure 9 et 10) (Hageman *et al.*, 2001; Crabb *et al.*, 2002; Hollyfield *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006; Yamada *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2016). Avec le temps, des altérations parviennent au niveau de l'EPR et la DMLA évolue à des stades tardifs soit par atrophie géographique appelée DMLA atrophique ou sèche, soit par néovascularisation choroïdienne appelée DMLA exsudative ou néovasculaire (Lambert *et al.*, 2016).

De cause encore inconnue, plusieurs facteurs de risque ont été associés à la pathogenèse et à la progression de la DMLA, dont les plus souvent mentionnés sont l'âge, le tabagisme, les antécédents familiaux, et l'ethnie (Thakkestian *et al.*, 2006; Ennis *et al.*, 2008; Sobrin et Seddon, 2014; Lambert *et al.*, 2016).



**FIGURE 9: RÉTINE HUMAINE SAINE**

(A) Un fond d'œil et (B) une coupe par immunofluorescence de la macula d'une rétine saine. Les noyaux cellulaires sont marqués en bleus, les cônes en rouge, l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) en orange. (NR) neurorétine. (Adaptée de Lambert *et al.*, 2016).

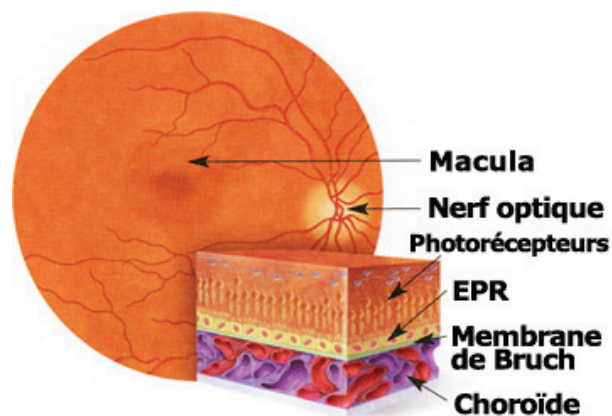


**FIGURE 10: STADE PRÉCOCE DE LA DMLA**

(A) Un fond d'œil montrant les dépôts de drusen, et (B) une coupe de la rétine en immunofluorescence montrant des drusen (\*) dans l'espace sous-rétinien, une augmentation de la réactivité du GFAP (en vert) et une dégradation de la couche des photorécepteurs (en rouge). Épithélium pigmentaire rétinien (RPE), neurorétine (NR) (Adaptée de Lambert *et al.*, 2016)

#### 1.4.1. Les structures impliquées dans la pathogenèse de la DMLA

Trois structures principales participent à la pathogenèse de la DMLA soit l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), la membrane de Bruch et la choroïde (Figure 11) (Lambert *et al.*, 2016).



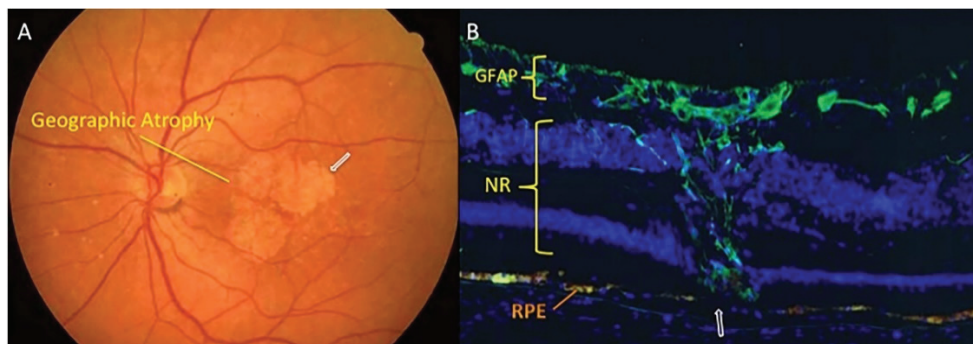
**FIGURE 11: LES TROIS STRUCTURES RÉTINIENNES IMPLIQUÉES DANS LA DMLA**

La choroïde, la membrane de Bruch et la couche pigmentaire épithéliale (EPR) sont les trois structures principales impliquées dans la DMLA. Tirée de [vista-alpina.com](http://vista-alpina.com).

L'EPR est une monocouche cellulaire à multifonctions. L'EPR en coordination avec la membrane de Bruch et la choroïde jouent un rôle essentiel dans le maintien des photorécepteurs. Ainsi, une altération de ces structures affecte la perception visuelle. L'EPR joue un rôle clé dans l'évolution de la DMLA, où certains chercheurs la considèrent comme le site principal des altérations dans les deux formes de DMLA (Zarbin, 2004; Ambati *et al.*, 2013). En effet, Ambatti et collègues expliquent qu'à partir du moment où l'EPR est altéré, la pathologie est considérée comme irréversible (Ambatti *et al.*, 2013). Par ailleurs, McLeod et ses collègues considèrent l'EPR comme le site principal des altérations dans la DMLA sèche, alors qu'ils considèrent la néovascularisation choroïdienne comme le site principal de la DMLA humide (McLeod *et al.*, 2009).

#### 1.4.2. La DMLA atrophique

La DMLA atrophique ou sèche, comme son nom l'indique, est caractérisée par une atrophie qui se produit au niveau de la couche de l'EPR, des photorécepteurs et des capillaires choroïdiens. À l'apparition des symptômes, le fond d'œil révèle de petits points jaunâtres/blanchâtres représentant les zones atrophiques (Figure 12). Ces événements sont accompagnés d'une perte progressive de la vision au cours du temps (Lambert *et al.*, 2016; Fleckenstein *et al.*, 2018).



**FIGURE 12: DMLA ATROPHIQUE**

(A) Un fond d'œil montrant les atrophies géographiques, et (B) une coupe de la rétine au niveau de la macula en immunofluorescence montrant la dégradation de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) (flèche) accompagnée d'une perte des photorécepteurs qui sont remplacés par le tissu glial (GFAP en vert). Neurorétine (NR). (Adaptée de Lambert *et al.*, 2016)

La DMLA atrophique peut être subdivisée principalement en quatre stades en fonction de l'évolution de l'atrophie de la couche des photorécepteurs et de l'EPR. Au premier stade « atrophie

rétinienne externe incomplète », un amincissement se produit dans la rétine externe qui évolue et devient plus sévère avec le temps, évoluant à son deuxième stade qui est « l'atrophie rétinienne externe complète ». Les atrophies évoluent avec le temps pour toucher par la suite les couches des photorécepteurs et de l'EPR, qui commencent à dégénérer laissant parfois la lumière passer dans la choroïde : c'est le stade « atrophie rétinienne externe et une EPR incomplète ». Ce stade peut progresser en « atrophie rétinienne externe, un EPR et une choroïde dégénérés » où la couche des photorécepteurs, l'EPR et la choroïde sont complètement dégénérés, et il est accompagné d'une transmission continue de la lumière dans la choroïde (Spaide, 2013; Xu *et al.*, 2017; Heesterbeek *et al.*, 2020). Ainsi, en mesurant le taux de croissance de l'atrophie géographique on peut évaluer la progression de la pathologie (Schaal *et al.*, 2016). Les études cliniques utilisent ce taux pour tester l'efficacité des traitements en cours.

La physiopathologie de la DMLA atrophique est complexe et le déclencheur principal de cette maladie demeure à identifier (Ambatti *et al.*, 2013). Plusieurs facteurs contributeurs à la pathogenèse de la DMLA ont été récemment décrits. Dans ce contexte, le système de cascade du complément (Boyer *et al.*, 2017) et les facteurs génétiques semblent jouer un rôle dans le développement de la DMLA avancée, on estime que les facteurs génétiques représentent un facteur de risque de 71% à 80% (Seddon *et al.*, 2005; Seddon *et al.*, 2006; Seddon *et al.*, 2015).

Jusqu'à ce jour, il n'y a pas de traitement efficace pour la DMLA sèche. Plusieurs essais cliniques ont été conduits chez l'humain dans l'espoir de trouver une cible thérapeutique. Ces essais ont ciblé différents axes notamment l'inflammation, la dégénérescence de l'EPR, le stress oxydatif, la restauration de la perfusion choroïdienne, la thérapie génétique et la thérapie cellulaire (Ding *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011; Hanus *et al.*, 2013; Weber *et al.*, 2014).

Dans deux des plus grands essais conduits sur la DMLA sèche chez l'humain, l'inhibition du facteur complément D (CFD) par des injections intravitréennes de l'anticorps anti-CFD (Lampalizumab) pendant 48 semaines n'avait pas d'effet sur la taille et l'évolution de l'atrophie géographique (Holz *et al.*, 2018; Kumar-Singh, 2019).

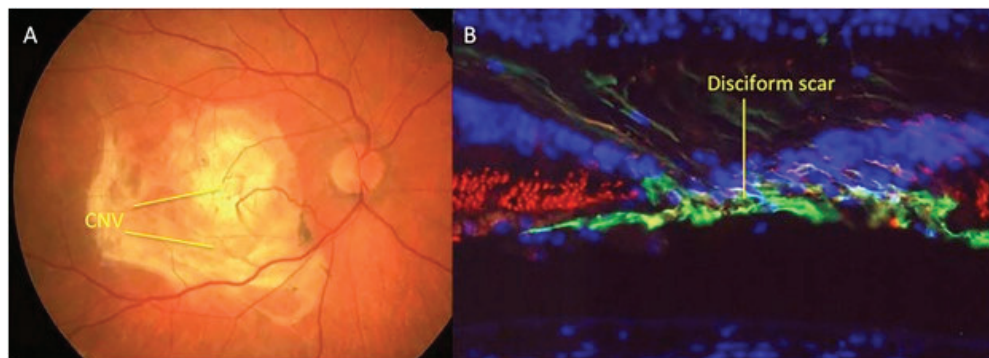
Une étude utilisant la thérapie cellulaire a été récemment conduite visant à régénérer la partie endommagée, en injectant une monocouche d'EPR dérivée de cellules souches embryonnaires humaines fabriquée sur du plastique synthétique (pour mimer la membrane de

Bruch). Dans cette étude, quatre patients sur cinq ont montré une amélioration de la vision et de l'atrophie au niveau de l'EPR (Kashani *et al.*, 2018).

Le rôle du stress oxydatif dans la DMLA atrophique a été également évalué dans l'essai clinique AREDS (Age-Related Eye Disease Studies). AREDS a montré qu'une supplémentation en antioxydants ( $\beta$ -carotène et vitamines C et E), en zinc, lutéine, zéaxanthine et en acides gras oméga diminue le risque d'évolution de la DMLA (Gorusupudi *et al.*, 2017).

### 1.4.3. La DMLA exsudative

La DMLA exsudative est caractérisée par la croissance de néovaisseaux d'origine choroïdienne (CNV) ou rétinienne (10 à 15% des cas) (Ghazi, 2002) qui prolifèrent vers l'espace sous-rétinien (Penn *et al.*, 2008). Ces vaisseaux sont perméables causant ainsi une fuite du liquide plasmatique, et un soulèvement de la rétine qui amène à une baisse de la vision (Penn *et al.*, 2008). Un tissu cicatriciel fibrovasculaire peut également se former dans l'espace sous-rétinien, exacerbant la pathologie (Figure 13) (Penn *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2016).



**FIGURE 13: DMLA EXSUDATIVE**

(A) Un fond d'œil montrant la néovascularisation choroïdienne au niveau de la macula, et (B) une coupe de la rétine au niveau de la macula en immunofluorescence montrant la perte de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) et des photorécepteurs remplacés par la cicatrice gliale (GFAP en vert) dans et sous la rétine. Neurorétine (NR). (Adaptée de Lambert *et al.*, 2016)

#### 1.4.3.1. Les traitements de la DMLA exsudative

Actuellement, il n'y a aucun traitement curatif de la DMLA. Les traitements existants aident à ralentir la progression de la pathologie sans la traiter. Les traitements les plus couramment utilisés

sont la photocoagulation au laser et les agents anti-angiogéniques (anti-VEGF). La thérapie photodynamique qui n'est plus couramment utilisée était une stratégie qui consistait à injecter par voie intraveineuse la vertéporfine (Visudyne<sup>MC</sup>). Le médicament est d'abord transporté par la circulation systémique à l'œil, et traverse par la suite la BHR altérée. Un laser est dirigé dans l'œil pour activer la vertéporfine, qui va sceller les vaisseaux endommagés (Gao *et al.*, 2018).

#### 1.4.4. Les facteurs impliqués dans la DMLA

La DMLA est une maladie polygénique multifactorielle dont les causes principales à l'origine de cette pathologie restent mal connues (Ambatti *et al.*, 2013, Rashid *et al.*, 2019). Plusieurs facteurs contribuant au développement et/ou à la progression de la maladie ont été décrits. Dans cette section on discute des facteurs les plus courants.

##### 1.4.4.1. Les facteurs de risque

Les facteurs génétiques semblent jouer un rôle dans la DMLA où plusieurs allèles ont été identifiés et corrélés avec un risque de développer la DMLA, dont les plus communs sont l'allèle de l'apolipoprotéine E et le facteur H du complément (CFH) (revue dans Guillonnet *et al.*, 2017). Les porteurs de l'allèle qui siège l'apolipoprotéine E2 ont un risque plus élevé de développer la DMLA, alors que l'allèle de l'apolipoprotéine E4 est considéré comme un facteur protecteur contre la DMLA (Thakkinstian *et al.*, 2006; Guillonnet *et al.*, 2017; Leveillard *et al.*, 2019). Fait intéressant, une surexpression d'apolipoprotéine E a été rapportée sur les phagocytes mononucléaires dans l'espace sous-rétinien dans la DMLA chez l'humain (Levy *et al.*, 2015a), chez la souris transgénique humanisée exprimant l'allèle apolipoprotéine 2 humaine (Sennlaub *et al.*, 2013; Levy *et al.*, 2015a; Levy *et al.*, 2015b), et chez la souris déficiente en récepteur de la chémokine CX3CL1, plus communément appelé fractalkine, (CX3CR1).

Des polymorphismes ainsi que des mutations se situant sur les gènes CFH (LOC387715) qui codent pour le facteur complément H ont été également corrélés à la pathogenèse de la DMLA (Klein *et al.*, 2004). Une substitution de la tyrosine 402 (Y402) à l'histidine (H402) dans le CFH est associée à la DMLA (revue dans Guillonnet *et al.*, 2017). Le CFH402H est associé à l'augmentation du stress oxydatif et l'inflammation ainsi qu'à l'induction de la néovascularisation dans l'espace sous-rétinien dans la DMLA (Shaw *et al.*, 2012). De plus, le CFH402H contribue à



l'accumulation des phagocytes mononucléaires dans la rétine DMLA chez la souris (Calippe *et al.*, 2017).

Des facteurs environnementaux ont été également identifiés comme facteurs de risque impliqués dans l'initiation et l'évolution de la DMLA. Parmi ces facteurs on cite : le tabagisme, l'alcoolisme, l'obésité et la diète (Klein *et al.*, 2004; Sobrin et Seddon, 2014).

#### **1.4.4.2. Le VEGF dans la DMLA exsudative**

Pour une description détaillée du VEGF, son rôle et son implication dans les pathologies oculaires néovasculaires, veuillez-vous référer à la section 1.3.4.3 de cette thèse. L'implication du VEGF et du PlGF (membre de la famille du VEGF, qui se lie au VEGFR-1) dans la néovascularisation choroïdienne a été mise en évidence dans des modèles animaux et chez l'humain (van Eeden *et al.*, 2006; Lim *et al.*, 2012; Balsler *et al.*, 2019; Cunningham *et al.*, 2019). L'altération de l'intégrité de la barrière hémato-rétinienne externe in-vitro est attribuée au VEGF (Hartnett *et al.*, 2003). En effet, le VEGF stimule la migration des cellules endothéliales à travers la membrane de Bruch et l'EPR exacerbant l'altération de la barrière hémato-rétinienne. La surexpression du VEGF dans l'EPR chez les souris augmente la leucostase et la fuite vasculaire (Schwesinger *et al.*, 2001). Bien que la surexpression du VEGF ait aussi induit une néovascularisation intra-choroïdienne, ces vaisseaux ne traversent pas la membrane de Bruch qui demeure intacte. Ces résultats pointent vers d'autres facteurs participant aux altérations de l'intégrité de la membrane de Bruch qui seront nécessaires pour induire la croissance des vaisseaux choroïdiens dans la rétine DMLA (Schwesinger *et al.*, 2001).

#### **1.4.4.3. Le facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire**

Le facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire (PEDF) est un facteur anti-angiogénique sécrété par l'EPR (Maminishkis *et al.*, 2006). Le PEDF est un facteur de survie neuronal avec des propriétés anti-inflammatoires (Zhang *et al.*, 2006b). L'intérêt des chercheurs pour le PEDF vient surtout du fait qu'il puisse réguler / inhiber l'expression du VEGF et interagir aussi avec le VEGFR-2 (Zhang *et al.*, 2006a). En effet, les différences de réponses d'angiogenèse entre les différentes souches des rongeurs après l'exposition à l'hyperoxie étaient étroitement associées au ratio VEGF/PEDF (Gao *et al.*, 2001; Chan *et al.*, 2005). Une diminution du ratio VEGF/PEDF (diminution du VEGF et augmentation du PEDF) a été observée chez les souches qui ont développé

moins d'angiogenèse. L'expression génomique du PEDF était dix fois plus élevée que celle du VEGF dans les rétines humaines saines (Kociok et Joussem, 2007). Alors qu'une diminution d'expression du PEDF dans la rétine externe (RPE, membrane de Bruch) et dans la choroïde est observée dans les rétines humaines atteintes de DMLA (Bhutto *et al.*, 2006).

#### 1.4.4.4. Les cellules gliales

Pour une description détaillée des cellules gliales et leur rôle dans la rétine, veuillez-vous référer à la section 1.2.2.2 de cette thèse. Les cellules gliales rétiniennes sont les cellules immunitaires constituées de macroglie (astrocytes et cellules de Müller) et de microglie. Elles assurent le soutien trophique et métabolique à la rétine. En effet, ces cellules jouent un rôle principal dans la phagocytose des débris cellulaires et dans le maintien de la barrière-hémato-rétinienne (Vecino *et al.*, 2016). L'activation et le dysfonctionnement des cellules gliales ont été décrits dans les pathologies rétiniennes dans les modèles animaux et chez l'humain (Rungger-Brandle *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2012).

##### 1.4.4.4.1. Les cellules microgliales

Bien que la microglie revête un profil neuroprotecteur, une participation de la microglie à l'inflammation a été rapportée dans les deux formes de DMLA chez l'humain et la souris (Newman *et al.*, 2012; Sennlaub *et al.*, 2013). En effet, la microglie âgée connaît une diminution de mobilité, de sa fonction phagocytaire avec une transition de phénotype (du ramifié à hypertrophique et amiboïde) à un phénotype pro-inflammatoire (Chen *et al.*, 2019).

Une accumulation des cellules microgliales dans l'espace sous-rétinien DMLA dans des modèles animaux et chez l'humain a été rapportée (Gupta *et al.*, 2003; Ambati *et al.*, 2013; Guillonnet *et al.*, 2017; Rashid *et al.*, 2019), contribuant à la dégénérescence des photorécepteurs (Scholz *et al.*, 2015). En revanche, les rétines saines sont dépourvues d'une accumulation microgliale dans la rétine externe et/ou dans l'espace sous-rétinien (Combadiere *et al.*, 2007; Sennlaub *et al.*, 2013). Par ailleurs, une infiltration sous-rétinienne des monocytes de type chimiokines C-C récepteur-2 CCR2 a été également rapportée dans la DMLA atrophique induite par la lumière verte LED (Sennlaub *et al.*, 2013). De plus, les chimiokines C-C ligand-2 (CCL-2) qui attirent les monocytes pro-inflammatoires sont augmentés dans les yeux humains atteints de

DMLA exsudative (Rezar-Dreindl *et al.*, 2016) et atrophique (Sennlaub *et al.*, 2013). Toutes ces données suggèrent la participation des cellules résidentes et infiltrantes dans la DMLA.

La microglie réactive dans l'espace sous-rétinien produit des médiateurs pro-inflammatoires, y compris IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, et CCL-2 (Guillonnet *et al.*, 2017). Ainsi, un recrutement chronique de ces cellules cause une accumulation des cytokines pro-inflammatoires et une apoptose subséquente des photorécepteurs (Zhao *et al.*, 2015a). Il convient de noter que la migration de la microglie vers les sites rétiniens endommagés peut promouvoir une croissance vasculaire (Ma *et al.*, 2009).

#### 1.4.4.4.2. Les cellules macrogliales

Tous les stimuli pathologiques (les événements dégénératifs, les lésions tissulaires, l'inflammation et le vieillissement) peuvent activer les cellules macrogliales qui vont proliférer, migrer et augmenter leur expression en GFAP. Cette réponse a pour but de protéger la rétine contre les lésions, phénomène nommé la gliose réactive (Luna *et al.*, 2010). Toutefois, une activation chronique de ces cellules peut adapter un profil pro-inflammatoire (gliose proliférative) et exacerber la neurodégénérescence rétinienne comme dans la DMLA et la RD (Cuenca *et al.*, 2014). La plupart des pathologies rétiniennes sont associées à une gliose des cellules macrogliales (Ardeljan et Chan, 2013).

*Les astrocytes* : L'astrocyte réactif encore appelé astroglie, est un mécanisme de défense où l'astrocyte se multiplie, prolifère et migre vers les sites altérés (de Hoz *et al.*, 2016). Plusieurs études ont rapporté une astroglie dans les maladies neurodégénératives rétiniennes (De Hoz *et al.*, 2016). En effet, les astrocytes représentent une source importante de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires (macrophage protéine inflammatoire-2 alpha (MIP-2 $\alpha$ )), de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ), de protéine chimiotactique monocyttaire de type 1 (MCP-1), de facteurs du complément et de facteurs angiogéniques (VEGF-A). La libération de ces facteurs altère l'intégrité de la barrière hémato-rétinienne et favorise la dégénérescence rétinienne (Pekny *et al.*, 2014; Vecino *et al.*, 2016). Dans un modèle de néovascularisation chez le lapin (induit par l'injection des facteurs de croissance de fibroblaste de base FGFb), une accumulation des cellules macrogliales a été observée dans l'espace sous-rétinien (Kimura *et al.*, 1999). Les astrocytes et les cellules de Müller réactives sont trouvés également dans les rétines humaines atteintes de DMLA atrophique (Wu *et al.*, 2003). Les coupes histologiques des rétines humaines atteintes de DMLA

montrent la formation d'une membrane gliale, formée principalement d'astrocytes et des cellules de Müller, située entre le corps vitré et la membrane limitante interne (Ramirez *et al.*, 2001).

*Les cellules de Müller* : À l'instar des autres cellules gliales, les cellules de Müller activées sont un couteau à double tranchant; elles sont impliquées à la fois dans la neuroprotection de la rétine et la dégénérescence rétinienne et contribuent à des changements dégénératifs, inhibant ainsi la réparation des neurones rétinien (Hippert *et al.*, 2015). En effet, les cellules de Müller réactives peuvent contribuer à la mort des neurones en favorisant la libération des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  des interleukines), de la MCP-1, de la molécule d'adhésion intercellulaire 1 (CD54) et du NO, exacerbant ainsi la réponse inflammatoire (Hippert *et al.*, 2015).

## 1.5. Le stress oxydatif dans les pathologies oculaires

Par définition, le stress oxydatif est un déséquilibre entre les espèces pro-oxydantes et anti-oxydantes. La défense antioxydante diminue lors des inflammations chroniques (le cas de la rétinopathie diabétique) et avec le vieillissement (le cas de la DMLA), entraînant une augmentation des ROS et des espèces réactives de l'azote (RNS) et une activation ultérieure de la neuro-inflammation. Plusieurs études ont mis en évidence le rôle du stress oxydatif dans le développement et la progression des pathologies oculaires notamment la RD et la DMLA (El-Remessy *et al.*, 2003a; Penn *et al.*, 2008; Di Marco *et al.*, 2019; Miranda et Romero, 2019). En effet, la supplémentation avec des antioxydants a ralenti l'initiation ainsi que la progression de la RD dans des modèles animaux ainsi que chez l'humain (Kowluru *et al.*, 2000; Kowluru, 2001; Kowluru *et al.*, 2001a; Kowluru et Kennedy, 2001; Kowluru *et al.*, 2001b). La contribution du stress oxydatif dans la pathologie de la DMLA a été aussi mise en évidence dans la phase III d'un essai clinique (Age-Related Eye Disease Studies, AREDS) qui a montré les effets bénéfiques des suppléments antioxydants sur le développement de la DMLA sèche avancée (Zeng *et al.*, 2012).

### 1.5.1. Les enzymes de synthèse du monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) dans la rétine joue un rôle dans la défense immunitaire, l'angiogenèse, le développement des neurones et la neurotransmission ainsi que dans le contrôle du tonus vasculaire (Miclescu et Gordh, 2009). En effet, le NO pénètre dans les cellules et se lie à l'enzyme guanylate cyclase (GC) (une enzyme cytoplasmique) pour produire du guanosine cyclique monophosphate (GMPc) (Miclescu et Gordh, 2009). Celui-ci est un second messenger très

important impliqué dans le contrôle du débit sanguin rétinien (vasorelaxant) et dans la phototransduction (Schmetterer et Polak, 2001; Canto *et al.*, 2019). Toutefois, le NO en excès peut réagir avec les radicaux libres pour former des espèces réactives d'azote et par la suite endommager la rétine, induire une réponse inflammatoire, voire même participer à la dégénérescence rétinienne (Goureau et Courtois, 1996).

Les enzymes de synthèse du monoxyde d'azote (NOS) sont des enzymes qui synthétisent du NO et de la L-citrulline à partir de la L-arginine et l'oxygène (Miclescu et Gordh, 2009). Trois isoformes de NOS ont été décrites en fonction de leur localisation : soit la NOS neuronale (nNOS ou NOS1), la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3) et la NOS inductible (iNOS ou NOS2). Les deux premières isoformes sont constitutives alors que la iNOS est induite lors des réponses inflammatoires (par des lipopolysaccharides, des interférons et des facteurs de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Knowles et Moncada, 1994; Kaneki *et al.*, 2007).

Les NOS sont constituées de deux sous-unités catalytiques soit la réductase (qui lie la NADPH et le FAD) et l'oxygénase (qui lie la L-arginine, l'oxygène, la tétrahydrobioptérine et l'hème), liées entre elles par un complexe calcium/calmoduline (Stuehr, 1997). Notez que le complexe calcium/calmoduline des NOS constitutives possède une faible affinité au calcium (Forstermann *et al.*, 1995). Ainsi, ces enzymes ont besoin de concentrations élevées de calcium pour être actives en conditions physiologiques. Une fois activées, les NOS constitutives produisent le NO pendant une courte durée, pour réguler la neurotransmission et le tonus vasculaire (Goureau *et al.*, 1999). La iNOS en revanche a une affinité élevée pour le calcium (Förstermann *et al.*, 1995). Une fois activée, elle produit le NO pendant une longue durée pour tuer les pathogènes qui envahissent le corps (MacMicking *et al.*, 1997; Stuehr, 1997).

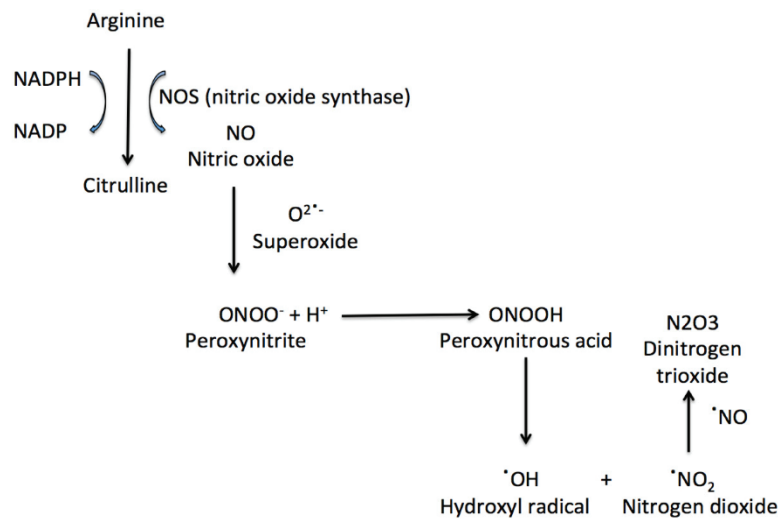
#### 1.5.1.1. L'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote inductible

La iNOS est produite particulièrement par les cellules pro-inflammatoires, et une production chronique de cette enzyme est nuisible pour les cellules (Carr *et al.*, 2017). En effet, la iNOS est l'un des contributeurs les plus puissants dans le stress oxydatif et nitrosatif, et plusieurs études se sont intéressées à son implication dans les pathologies oculaires. Une surexpression de la iNOS a été rapportée dans plusieurs modèles animaux de RD, et son inhibition a montré des effets bénéfiques sur la pathologie (Kern et Engerman, 2001; Kowluru *et al.*, 2001b; Du *et al.*, 2002; Ellis *et al.*, 2002; Mishra et Newman, 2010; Rosales *et al.*, 2010). La leucostase, l'ouverture de la

barrière hémato-rétinienne (diminution de l'expression des jonctions serrées) et l'augmentation de la perméabilité vasculaire induites par le diabète, sont renversées par l'inhibition de la iNOS dans la rétine des rats diabétiques (avec le L-NAME) (Leal *et al.*, 2007). L'inhibition de la iNOS avec la S-nitrosoglutathione renverse le stress nitrosatif, ralentit les altérations structurales de la rétine et améliore la fonction rétinienne dans la RD (Rosales *et al.*, 2010). Par ailleurs, la délétion génétique de la iNOS renverse l'expression de plusieurs médiateurs inflammatoires, la formation des anions superoxydes ( $O_2^-$ ), la nitration des protéines, la perte des péricytes et la formation de capillaires acellulaires dans un modèle de RD chez la souris (Zheng *et al.*, 2007). Fait intéressant, les rétines humaines diabétiques expriment également la iNOS contrairement aux rétines saines (Abu El-Asrar *et al.*, 2001).

Le rôle de la iNOS a aussi été étudié dans la néovascularisation pathologique. Dans un modèle de rétinopathie ischémique, Sennlaub et collègues ont montré que la délétion génétique de la iNOS ou son inhibition avec le 1400W atténue l'apoptose des cellules rétiniennes, promeut la néovascularisation (physiologique) dans la rétine ischémique et diminue l'angiogenèse intravitréenne (néovascularisation pathologique) (Abu El-Asrar *et al.*, 2001; Sennlaub *et al.*, 2001, 2002). Cette dernière est considérablement plus forte dans les rétines des souris exprimant la iNOS, comparé aux souris déficientes en iNOS. Fait intéressant, les zones ischémiques centrales de la rétine, où l'expression de la iNOS est élevée, expriment moins le VEGFR-2 lorsque comparées aux zones périphériques intactes pauvres en iNOS. Ces résultats suggèrent que l'implication de la iNOS dans la néovascularisation pathologique se fait en partie par une régulation négative du VEGFR-2 (Sennlaub *et al.*, 2001). L'expression de la iNOS est également augmentée dans la rétine CNV chez le singe et le rat, et son inhibition réduit l'apoptose des photorécepteurs (She *et al.*, 2007). Chez l'humain, la iNOS est co-exprimée avec le VEGF dans les cellules endothéliales vasculaires des rétines DMLA, supportant un rôle de la iNOS dans la néovascularisation pathologique (Hattenbach *et al.*, 2002). La cytotoxicité de la iNOS est associée en premier lieu aux produits du NO notamment les RNS et le peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ). En effet, le NO peut aussi réagir avec les  $O_2^-$  pour former des RNS et le peroxy-nitrite ( $NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$ ) (Figure 14) (Muller et Morawietz, 2009; Canto *et al.*, 2019). On réfère ici au stress nitrosatif qui est nuisible pour les cellules à cause de la réaction de ces produits avec les lipides, les protéines, ainsi que l'ADN des cellules (Knott et Bossy-Wetzell, 2009).

Les RNS sont également produits dans les conditions physiologiques, mais sont détruits par plusieurs mécanismes de défense impliquant des enzymes comme la superoxyde dismutase et les vitamines A, C et E (Figuroa-Romero *et al.*, 2008). Il convient de noter que la nature physiologique de la rétine, notamment sa richesse en acides gras polyinsaturés, son métabolisme d'oxygène très élevé, son exposition à la lumière, favorise la génération des radicaux libres (Beatty *et al.*, 2000; Vielma *et al.*, 2012). Dans ce contexte, ces radicaux sont associés à plusieurs pathologies oculaires comme la rétinopathie diabétique, la rétinite pigmentaire, le glaucome et la DMLA (Stringham et Stringham, 2015).



**FIGURE 14: LA SYNTHÈSE DU MONOXYDE D'AZOTE ET DES ESPÈCES RÉACTIVES D'AZOTE**

Les enzymes de synthèse du monoxyde d'azote (NOS) synthétisent du monoxyde d'azote (NO) à partir de l'arginine. Dans les conditions inflammatoires, la iNOS produit des quantités excessives du monoxyde d'azote (NO) qui va réagir avec les anions superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) pour former du peroxy-nitrite ( $ONOO^-$ ). L'acide conjugué peroxy-nitrite ( $ONOOH$ ) peut former des radicaux hydroxyles et du dioxyde d'azote ( $NO_2$ ), qui peuvent réagir avec les protéines (nitration) et les acides gras (oxydation) et les altérer. (Adaptée de Canto *et al.*, 2019).

### 1.5.1.2. Le peroxy-nitrite

Les produits du NO (comme le  $ONOO^-$ ) sont considérés comme médiateurs inflammatoires impliqués dans plusieurs maladies neurodégénératives (Ndengele *et al.*, 2008). Le  $ONOO^-$  est une molécule hautement toxique. En effet, le  $ONOO^-$  est une molécule très réactive qui altère les protéines suite à des réactions de nitration avec les tyrosines des protéines, ou par des réactions

d'oxydation du thiol ou de S-nitrosylation. En outre, le ONOO<sup>-</sup> en induisant la relâche du cytochrome C bloque la chaîne respiratoire mitochondriale et induit l'apoptose (Martinez-Ruiz *et al.*, 2011). Il convient de noter que la formation du ONOO<sup>-</sup> diminue la biodisponibilité du NO dans les cellules endothéliales contribuant ainsi à la formation des microangiopathies. La déplétion du NO contribue également à une hypoxie et une diminution de la production d'énergie par la mitochondrie ce qui peut altérer la microcirculation rétinienne (Yamagishi et Matsui, 2011). L'implication du ONOO<sup>-</sup> dans les complications du diabète a été rapportée dans plusieurs modèles animaux et chez l'humain (Du *et al.*, 2002; Abu El-Asrar *et al.*, 2004; Kowluru et Odenbach, 2004; Obrosova, 2005; Obrosova *et al.*, 2005; Penn *et al.*, 2008). D'où, l'interruption de ce cycle (diminuer la formation des O<sub>2</sub><sup>-</sup> ou du ONOO<sup>-</sup> ou inhiber la iNOS) peut avoir des effets prometteurs sur la RD (Penn *et al.*, 2008).

## 1.6. Le système kalllicréine-kinines

Le système kalllicréine-kinines (SKK) est un système peptidergique trouvé dans tous les tissus (SKK tissulaire) et dans le plasma (SKK plasmatique). Le SKK joue un rôle primordial dans la défense humorale via l'induction de la réponse inflammatoire (Tang et Kern, 2011). Dans une phase aiguë, le SKK participe au recrutement des protéases du milieu extracellulaire et des neutrophiles (Tang et Kern, 2011). Si la réponse inflammatoire persiste, l'activité du SKK est amplifiée et active une pléiade de voies d'inflammation qui contribuent à la destruction tissulaire et à l'inflammation chronique (Stadnicki, 2011). Le SKK est aussi impliqué dans la régulation de la pression artérielle, le contrôle du tonus vasculaire, l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire, la douleur, et la coagulation (Couture *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2014; Couture *et al.*, 2014). Une attention a été récemment portée au SKK pour son implication dans les pathologies oculaires (Wilkinson-Berka et Fletcher, 2004; Feener, 2010; Bhat *et al.*, 2014).

### 1.6.1. Bref aperçu historique

L'identification des composantes du SKK a commencé dans les années 1900. En 1909, Abelous et Bardier ont observé un effet hypotenseur avec l'urine humaine si injectée par voie intraveineuse aux lapins. Frey a confirmé cette observation en 1926, en injectant de l'urine humaine à des chiens. La molécule responsable de cet effet hypotenseur a été nommée la substance-F (Frey et Kraut, 1928). En 1930, Kraut montre que cette molécule est présente en grande concentration



dans le pancréas. La substance F a été renommée la kallibréine; l'enzyme qui active les kininogènes pour former les kinines (Blais *et al.*, 2000). En 1949, Rocha e Silva isola la bradykinine qui est libérée des kininogènes à partir des globulines plasmatiques (Blais *et al.*, 2000; Marceau et Regoli, 2004). Les enzymes kininases responsables du métabolisme des kinines ont par la suite été identifiées.

### 1.6.2. Les kinines

Les kinines sont les médiateurs du SKK appartenant à un groupe de peptides de neuf à onze acides aminés (Couture et al., 2001). Les kinines incluent la bradykinine (BK), la kallidine (KD) et la T-kinine (Ile-Ser-BK) (exprimée exclusivement chez le rat), et leurs métabolites actifs; la des-Arg9-BK et la lys-des-Arg9-BK (ou des-Arg10-KD) (Tableau 1).

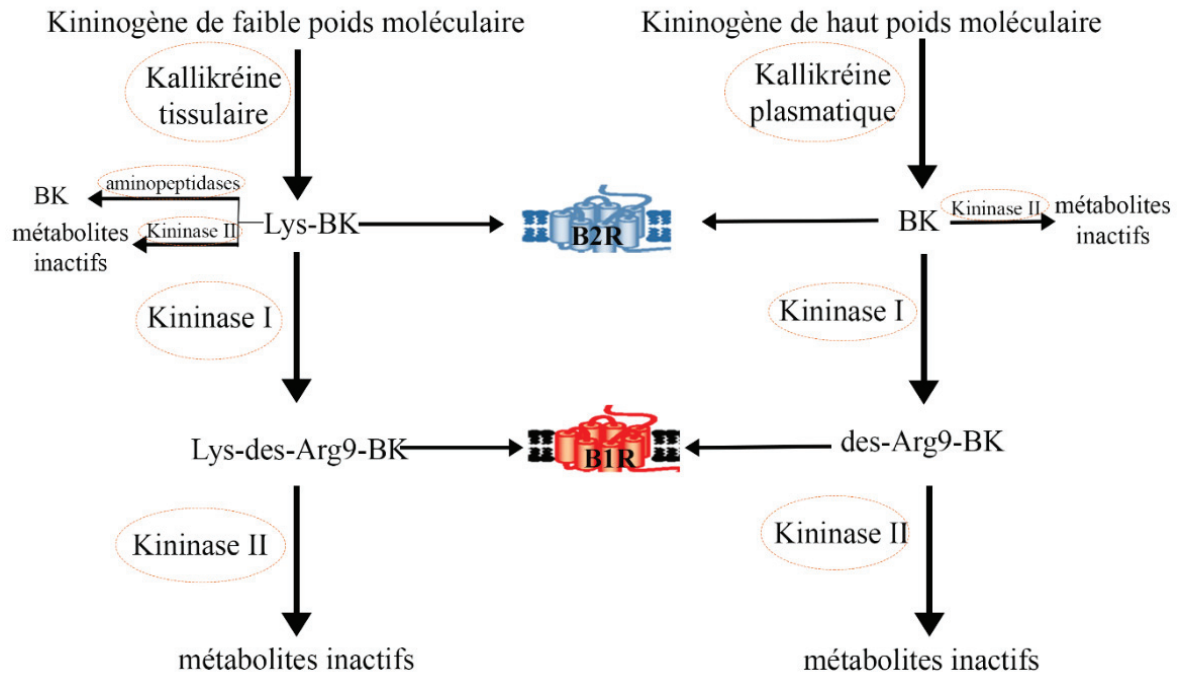
Les kinines sont formées à partir des kininogènes par l'action des enzymes kallibréines (Couture *et al.*, 2014). Deux types de kininogènes ont été décrits chez les mammifères soit les kininogènes de haut poids moléculaire (88 à 120 kDa) (HK) et de faible poids moléculaire (50 à 68 kDa) (LK) (Okamoto et Greenbaum, 1983; Marceau et Regoli, 2004) qui génèrent respectivement la BK dans le sang et la KD dans les tissus (Figure 15).

**TABLEAU 1: STRUCTURE PRIMAIRE DES KININES**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	<b>Arg</b>	OH
KD (Lys-BK)	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	<b>Arg</b>	OH
T-Kinine	Ile Ser	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	<b>Arg</b>	OH
Des-Arg9-BK		Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	OH	
Lys-Des-Arg9-BK (Des-Arg10-KD)	lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	OH	
Des-Arg11-T-Kinine	Ile Ser	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	OH	

Au niveau plasmatique, le HK forme la BK par l'activation du facteur XII de coagulation encore appelée facteur Hageman (FXII). Ce dernier active la kallibréine plasmatique à la suite d'un contact avec des surfaces chargées négatives telles que les composantes de la matrice extracellulaire ou

d'autres particules chargées négativement (sulfate de cholestérol, urate ou phospholipides acides). Au niveau tissulaire, la kallikréine tissulaire transforme le LK en kallidine (lys-BK) (KD) (Figure 15) (Gabra *et al.*, 2003).



**FIGURE 15: LES COMPOSANTES DU SYSTÈME KALLICRÉINE-KININES**

Une fois générés, ces peptides (BK, KD et T-kinine) seront dégradés en métabolites actifs par l'action des aminopeptidases et la kininase I, et en métabolites inactifs par l'action de la kininase II. La kininase I, incluant les carboxypeptidases N (CPN dans le sang) et M (CPM dans la membrane cellulaire), métabolise la BK, la KD et la T-kinine respectivement en des-Arg9-BK, lys-des-Arg9BK (ou des-Arg10-KD) et des-Arg11-T-kinine, en enlevant l'Arginine en position carboxy-terminale (Tableau 1) (Marceau et Regoli, 2004). Les aminopeptidases métabolisent la T-kinine et la KD en BK.

La kininase II (aussi appelée l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA)), et l'endopeptidase neutre (enképhalinase) dégradent la BK (ainsi que KD et T-kinine) en métabolites inactifs soit la BK (1-7) et la BK (1-5). En clivant le dipeptide (phénylalanine<sup>8</sup> - arginine<sup>9</sup>) de la partie C-terminale de la BK, elles forment la BK (1-7). Par ailleurs, l'ECA peut dégrader la des-Arg9-BK en métabolite inactif BK (1-5). Ces métabolites ne possèdent pas d'activité physiologique. Il

convient de noter que les kininases sont impliquées dans le métabolisme d'autres peptides appartenant à d'autres systèmes tels que l'angiotensine, l'endothéline, les anaphylatoxines C3a et C5a, la substance P et les peptides natriurétiques (Couture *et al.*, 2014).

### 1.6.3. Les récepteurs des kinines

Le SKK performe à travers deux types de récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR); soit le récepteur B2 des kinines (B2R) et le récepteur B1 des kinines (B1R). La classification pharmacologique des récepteurs des kinines fut établie selon l'ordre de puissance et d'affinité de différents agonistes et antagonistes (Regoli *et al.*, 1990; Marceau *et al.*, 1998). La BK, la Lys-BK et la T-kinine sont les agonistes du B2R, alors que leurs métabolites (la des-Arg9-BK, la Lys-des-Arg9-BK et des-Arg11-T-kinine) sont les agonistes du B1R (Figure 15) (Menke *et al.*, 1994; Marceau et Regoli, 2004). L'affinité des agonistes pour ces récepteurs diffère selon l'espèce (Regoli *et al.*, 2001). Par exemple, l'affinité du B1R humain est supérieure pour les ligands possédant un résidu lysine en position N-terminale (Lys-des-Arg9-BK) par opposition aux rongeurs (le B1R a une affinité supérieure pour le des-Arg9-BK) (Hess *et al.*, 2001). Les récepteurs des kinines ont été clonés dans les années '90 chez plusieurs espèces (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). La séquence du B2R (364 aa) révèle une homologie de 36 % avec celle du B1R chez l'humain (353 aa) (Menke *et al.*, 1994) alors qu'elle est de 30 % entre le B2R (366 aa) et le B1R (334 aa) chez les rongeurs (Pesquero *et al.*, 1996).

### 1.6.4. L'expression des récepteurs des kinines

Contrairement au B2R qui est un récepteur ubiquitaire et constitutif, le B1R est quasi indétectable dans les conditions physiologiques; par contre, il est induit dans les conditions pathologiques (Regoli et Barabe, 1980; McEachern *et al.*, 1991; Menke *et al.*, 1994; Christiansen *et al.*, 2002). Ceci explique pourquoi la majorité des réponses physiologiques sont générées par le B2R, alors que les réponses inflammatoires sont plutôt régulées par le B1R.

L'expression du gène du B1R est contrôlée par les cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Blais *et al.*, 2000), par les voies de signalisation impliquées dans le stress cellulaire telles que les voies de la MAP Kinase, par le stress oxydatif et l'hyperglycémie chronique (diabète) (Marceau *et al.*, 1998; Couture *et al.*, 2001; deBlois et Horlick, 2001; Marceau et Regoli, 2004). En outre, l'expression du B1R est régulée par le facteur de transcription nucléaire NF- $\kappa$ B

lors du diabète (Couture *et al.*, 2014). En effet, l'inhibition du NF- $\kappa$ B *in-vitro* (Sardi *et al.*, 2002) et *in-vivo* (Cameron *et al.*, 2005; Morand-Contant *et al.*, 2010) renverse l'expression du B1R.

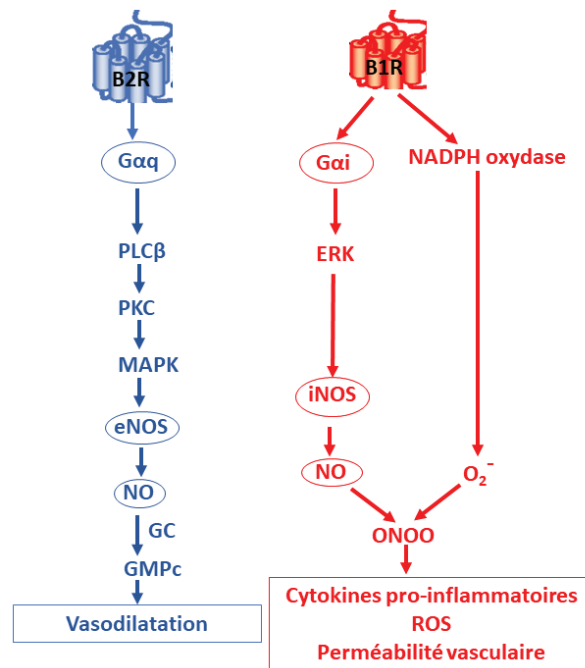
De récentes études ont appuyé l'implication du B1R dans les pathologies oculaires néo-vasculaires, notamment dans la RD (Bhat *et al.*, 2014; Couture *et al.*, 2014) et dans la néovascularisation choroïdienne (Hachana *et al.*, 2020a). L'augmentation du stress oxydatif dans la rétine du rat diabétique-STZ induit l'expression du B1R (Abdouh *et al.*, 2003; Abdouh *et al.*, 2008; Pouliot *et al.*, 2012), alors que l'application à la surface de l'œil d'antagonistes du B1R empêche le développement de la RD (Pouliot *et al.*, 2012; Hachana *et al.*, 2018). De plus, l'augmentation du stress oxydatif dans le nerf optique et le cortex visuel chez les rats diabétiques STZ (d'une et quatre semaines) induit l'expression du B1R dans ces régions (Catanzaro *et al.*, 2017). Ces données appuient une association entre le stress oxydatif et le B1R dans la RD.

### 1.6.5. Les voies de signalisation des récepteurs des kinines

Les B1R et B2R sont des récepteurs GPCR couplés préférentiellement à la sous-unité G $\alpha$ q (Figure 16) (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Une fois stimulés, les récepteurs des kinines activent la phospholipase C $\beta$  qui clive le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>) et entraîne la formation subséquente de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et du diacylglycérol (DAG) (Hess *et al.*, 1994; Austin *et al.*, 1997; Bastian *et al.*, 1997). L'IP<sub>3</sub> en activant son récepteur sur le réticulum endoplasmique (IP<sub>3</sub>R) induit l'ouverture des canaux réticulum sarco-endoplasmique Ca<sup>2+</sup> ATPase (SERCA) causant une augmentation subséquente de calcium intracellulaire (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). L'augmentation intracellulaire de Ca<sup>2+</sup> entraîne la libération de vésicules contenant des neurotransmetteurs (tels que le glutamate et la substance P) (Couture *et al.*, 2001), des prostaglandines et du NO. Les B1R et B2R sont également couplés aux protéines G $\alpha$ s et G $\alpha$ i, pour activer (G $\alpha$ s) et inhiber (G $\alpha$ i) l'adénylate cyclase et la formation AMPc. Par ailleurs, les récepteurs des kinines sont impliqués dans l'activation des MAP kinases et des voies JAK / STAT impliquées dans la régulation des gènes (Marceau *et al.*, 1998; Marceau et Regoli, 2004).

Le B2R peut activer également des voies de signalisation alternatives (indépendantes du recrutement de protéines G), en interagissant directement avec la eNOS, la nNOS, la PLC  $\gamma$  et la tyrosine phosphatase SHP2 (Bascands *et al.*, 2003). En effet, le B2R interagit avec la eNOS en C-terminal (Ju *et al.*, 1998). Une fois activé par la BK, le B2R libère la eNOS résultant en une

production du NO (Ju *et al.*, 1998) qui engendre des réponses vasodilatatrices, anti-inflammatoires et anti-oxydantes (Wink et Mitchell, 1998; Javanmard *et al.*, 2009).



**FIGURE 16: LES VOIES DE SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS DES KININES**

Le B2R constitutif en se couplant à la sous-unité Gαq active la eNOS qui produit du NO. Ceci cause une vasodilatation et parfois à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Le B1R inductible se couple à la sous-unité Gαi et active la iNOS qui produit des quantités excessives de NO. Le B1R active également la NADPH oxydase (via Gαq et PKC Haddad et Couture, 2017) responsable de la génération de l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Le NO réagit avec O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pour former le peroxyde d'azote (ONOO<sup>-</sup>). Ceci conduit à l'inflammation, la production des ROS et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire.

L'activation du B1R peut également activer la voie de la phospholipase A2 et D (Couture *et al.*, 2001), la voie des MAPK (Medeiros *et al.*, 2004), du NF-κB (Morand-Contant *et al.*, 2010) et de la NADPH oxydase (Dias *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2011; Haddad et Couture, 2017b). En se couplant à la sous-unité Gαi, le B1R active la iNOS par l'intermédiaire de la voie Src/Ras/Raf/MEK/ERK, ce qui résulte en une phosphorylation de la sérine 745 de la iNOS menant à son activation (Kuhr *et al.*, 2010). Ainsi, la génération de NO suivant l'activation du B1R est principalement attribuable à l'activation de la iNOS qui produit des quantités excessives de NO (Gabra *et al.*, 2003; Brovkovych *et al.*, 2011). En effet, le blocage de la eNOS suivant la stimulation

du B1R n'a pas prévenu la génération de NO dans les cellules endothéliales humaines préalablement exposées à des cytokines pro-inflammatoires, nécessaire à l'induction du B1R (Zhang *et al.*, 2007). En revanche, l'inhibiteur sélectif de la iNOS -1400W- a complètement empêché la formation de NO dans ce modèle *in-vitro* (Zhang *et al.*, 2007). De plus, le chélateur de calcium BAPTA-AM n'a pas d'effet sur la génération de NO induite par le B1R, suggérant une production par une NOS indépendante de la concentration intracellulaire de calcium (Brovkovych *et al.*, 2011). En effet, l'activation de la iNOS dépend de cofacteurs et substrats et non pas de la concentration de calcium (Kuhr *et al.*, 2010). Le NO réagit avec l'anion superoxyde pour former le peroxy-nitrite (Kuhlencordt *et al.*, 2001; Radi *et al.*, 2001), diminuant ainsi la biodisponibilité du NO tout en amplifiant l'inflammation et le stress oxydatif (Figure 16) (Kuhlencordt *et al.*, 2001; Radi *et al.*, 2001). Ensemble, ces données suggèrent une implication du B1R dans les réponses inflammatoires où le B1R est situé en amont de l'activation et de l'expression de la iNOS.

Il s'avère que le B1R s'autoinduit (augmente sa propre expression) via une boucle de rétroaction positive (Phagoo *et al.*, 2001). En effet, l'activation du B1R amplifie la génération des ROS (Dias *et al.*, 2010), des chimiokines (Talbot et Couture, 2012), des cytokines pro-inflammatoires (l'IL-1 $\beta$  et la TNF- $\alpha$ ) (Cunha *et al.*, 2007), et diminue la génération des cytokines anti-inflammatoires (IL-4) (Talbot et Couture, 2012). Ensemble, les ROS et ces médiateurs activent le NF- $\kappa$ B, qui à son tour induit la transcription du gène codant pour le B1R. Comme discuté, le B1R emprunte certaines des voies de signalisation du B2R. Néanmoins, les conséquences de l'activation de ces deux récepteurs ne sont pas les mêmes, le B2R possède un profil plutôt physiologique alors que le B1R est davantage impliqué dans les conditions pathologiques.

Il convient de noter que, une fois activé, le B2R est rapidement internalisé et désensibilisé (Blaukat *et al.*, 1999; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). En revanche, le B1R est résistant à la désensibilisation et subit plutôt une *upregulation* en présence de ses agonistes (Blaukat *et al.*, 1999; Marceau et Regoli, 2004), et il est ainsi impliqué dans le déclenchement et le maintien d'une réponse inflammatoire chronique (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

#### 1.6.6. Le système kallibréine-kinines dans la rétinopathie diabétique

Plusieurs événements caractéristiques de la RD ont été associés au SKK, notamment l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'inflammation, l'œdème et la néovascularisation (Phipps et Feener, 2008). L'activité de la protéine de liaison de la kallibréine tissulaire (KBP),

encore nommée kallistatine, est diminuée de 60% dans les rétines des rats diabétiques-STZ, et par conséquent une augmentation de la kallicréine tissulaire se produit. Cette réponse persiste même à quatre mois après l'induction du diabète (Hatcher *et al.*, 1997).

Une augmentation de la kallicréine plasmatique (Clermont *et al.*, 2011; Catanzaro *et al.*, 2012) et du B1R (Pouliot *et al.*, 2012) est observée dans les rétines des rats diabétiques-STZ. Cette augmentation du B1R entraîne la vasodilatation des microvaisseaux réiniens (Abdough *et al.*, 2003), et augmente la perméabilité vasculaire et la réponse inflammatoire dans les rétines des rats STZ (Pouliot *et al.*, 2012). Ces événements sont renversés par l'administration de gouttes topiques à la surface de l'œil d'antagonistes du B1R (LF022-0542 et R-954) (Pouliot *et al.*, 2012; Hachana *et al.*, 2018). Par ailleurs, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'amincissement de la rétine causés par les injections intravitréennes du VEGF sont diminués (de 68% et de 47%, respectivement) chez les souris déficientes en KLKB1 (gène codant pour le B1R) (Clermont *et al.*, 2016).

Chez l'humain, les composantes du SKK (kallicréine tissulaire et le kininogène de bas poids moléculaires, LK) sont exprimées dans la rétine, la cornée et le corps ciliaire (Ma *et al.*, 1996a) et sont augmentées dans la RD (Liu et Feener, 2013). Les B1R et B2R sont également exprimés sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins réiniens (Ma *et al.*, 1996a). Le LK, la kallicréine plasmatique (Gao *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008), et la kallicréine tissulaire sont également exprimés dans le vitré de patients atteints de RD, alors qu'ils sont absents dans le vitré des patients sains (Nakamura *et al.*, 2011). En outre, les concentrations de la KBP sont diminuées dans l'humeur vitrée des patients ayant une RD proliférative (Ma *et al.*, 1996). Des niveaux élevés de l'ARNm du B1R sont détectés dans les rétines humaines diabétiques de type 1 et de type 2, alors qu'aucune expression n'a été trouvée dans les rétines témoins (Bhat *et al.*, 2014). Bien que plusieurs études aient suggéré une production locale du SKK dans l'œil humain (Ma *et al.*, 1996a; Gao *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008), Phipps et Feener ont proposé une infiltration du SKK de la circulation systémique dans la rétine diabétique (Phipps et Feener, 2008). Ces auteurs expliquent que les composantes du SKK qui sont augmentées dans le plasma des patients diabétiques peuvent, avec l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'hémorragie des vaisseaux réiniens, s'infiltrer dans l'interstitium réinien et dans le vitré (Phipps et Feener, 2008). Quoiqu'il en soit de l'origine du SKK, qu'il s'agisse d'une production locale ou d'une infiltration

de la circulation systémique dans la rétine, toutes ces données appuient une implication du SKK dans le déclenchement et le développement de la RD. Pour terminer, dans la phase I.B d'un essai clinique les injections intravitréennes de l'inhibiteur de la kallibréine plasmatique KVD001 ont montré une bonne efficacité pour traiter l'œdème maculaire. Le traitement a amélioré l'acuité visuelle et l'épaisseur rétinienne centrale sans engendrer un problème de sécurité. Fait intéressant, aucun patient n'a présenté une exacerbation de la gravité de la RD (Bolinger et Antonetti, 2016; Sun *et al.*, 2019). Ces résultats ont encouragé la poursuite de l'investigation clinique du KVD001 (Sun *et al.*, 2019).

Ainsi, les effets angiogéniques, pro-inflammatoires et vasoactifs du SKK (Couture *et al.*, 2001) font de ce système une cible thérapeutique prometteuse pour traiter la RD. Afin de minimiser le plus possible les effets secondaires d'un *shut-down* complet du SKK qui est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques (telles que le contrôle de la pression artérielle et le contrôle de la coagulation sanguine), on s'intéresse dans notre laboratoire à étudier l'implication des récepteurs des kinines dans la RD qui selon nous représentent une approche plus spécifique.

### 1.6.7. Le système kallibréine-kinines dans la DMLA

Bien que l'implication du SKK dans la DMLA ait été peu étudiée dans la rétine, les effets pro-angiogénique et pro-inflammatoire du SKK ont été mis en évidence dans différents modèles de néovascularisation dans la rétine et dans d'autres tissus.

L'augmentation des composantes du SKK dans la rétine a été rapportée chez le rat âgé. En effet, comparés aux rats jeunes de deux semaines, les rats âgés de quatre mois présentent une diminution significative de la protéine KBP et, par conséquent, une augmentation de la kallibréine tissulaire (Hatcher *et al.*, 1997). En outre, dans un modèle de néovascularisation choroïdienne induite par le laser chez le rat, le blocage du B1R diminue la taille de la CNV, l'inflammation et l'hyperperméabilité vasculaire (Hachana *et al.*, 2020a). Cette réponse semble être indépendante du système VEGF-A/VEGFR-2 (Hachana *et al.*, 2020a). L'administration locale de l'agoniste du B1R (Lys-des-Arg9-BK) induit la néovascularisation dans la cornée de lapin, une réponse qui est complètement abolie par le R-715, antagoniste sélectif du B1R (Parenti *et al.*, 2001). Dans ce modèle, ni l'agoniste du B2R ni son antagoniste ont eu des effets sur la néovascularisation (Parenti *et al.*, 2001). Par ailleurs, le kininogène de poids moléculaire élevé ainsi que la BK induisent la néovascularisation dans la membrane chorioallantoïde embryonnaire de poulet (qui se développe



sur la face interne de la coquille) (Colman *et al.*, 2003). Fait intéressant, l'induction de la néovascularisation par le VEGF et le facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF-2) est inhibée par l'anticorps monoclonal anti-HK (Colman *et al.*, 2003). En outre, la kallistatine a empêché la liaison du VEGF à ses récepteurs dans une culture de cellules endothéliales rétinienne (Gao *et al.*, 2003). Paradoxalement à cette étude, il a été montré que la kallistéine tissulaire inhibe la néovascularisation en clivant le VEGF-164 dans un modèle de CNV induit par laser (Fukuhara *et al.*, 2013) et dans un modèle de rétinopathie ischémique (un modèle de néovascularisation rétinienne pathologique) (Nakamura *et al.*, 2011). Néanmoins, le B2R est également impliqué dans la néovascularisation par l'augmentation de l'expression du VEGF (Ikeda *et al.*, 2004). En effet, dans un modèle de rétinopathie ischémique, l'antagoniste du B2R (fasitibant) a significativement réduit la néovascularisation rétinienne ainsi que l'expression du VEGF et du FGF-2 (Terzuoli *et al.*, 2018). L'inhibition à la fois du B2R et de la kininase II réduit significativement la taille de la CNV (Nagai *et al.*, 2007).

Dans un modèle d'ischémie des membres postérieurs chez la souris, l'agoniste du B1R exacerbe la néovascularisation, une réponse qui est abolie par l'inhibition du B1R (soit par délétion génétique soit par un antagoniste sélectif) (Emanueli *et al.*, 2002). Dans ce même modèle mais chez le rat diabétique, les effets pro-angiogéniques de l'inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont attribués à l'augmentation de la génération de la BK et l'activation du B2R (Ebrahimian *et al.*, 2005). Paradoxalement à cette étude, Li et collègues ont montré que le B1R est plus impliqué que le B2R dans la néovascularisation dans ce modèle. En effet, l'antagoniste du B1R abolit la néovascularisation et réduit l'expression du VEGF-A et du VEGFR-2 alors que l'antagoniste du B2R a moins d'impact sur ces événements (Li *et al.*, 2008). Ensembles, ces études suggèrent une implication du SKK dans la néovascularisation induite par l'ischémie.

#### **1.6.8. Le système kallistéine-kinines dans l'inflammation**

Bien que les altérations microvasculaires jouent un rôle primordial dans la pathogenèse des pathologies oculaires d'origine néo-vasculaire (RD et DMLA), l'inflammation rétinienne est également un contributeur principal dans ces pathologies. En effet, une augmentation de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires (NF- $\kappa$ B, des prostaglandines, la COX-2, l'IL-1 $\beta$ , l'HIF-1 $\alpha$  et le NO) survient dans des modèles de RD et de DMLA chez le rat (Kern *et al.*, 2007; Pouliot *et al.*,

2012; Hachana *et al.*, 2018; Hachana *et al.*, 2020a). Cette réponse inflammatoire est renversée par l'inhibition du B1R (Pouliot *et al.*, 2012; Hachana *et al.*, 2018; Hachana *et al.*, 2020a).

La participation du SKK dans l'inflammation se fait surtout par l'intermédiaire du B1R (Marceau et Regoli, 2004). Bien que son profil tende à être anti-inflammatoire, le B2R peut être impliqué dans la phase aiguë de la réponse inflammatoire (Couture *et al.*, 2001). Le B1R est décrit comme un médiateur clé dans les réponses inflammatoires chroniques surtout celles déclenchées par des cytokines ou des pathogènes (Walker *et al.*, 1996; Tonussi et Ferreira, 1997; Marceau et Bachvarov, 1998). Les souris n'exprimant pas le B1R (soit par délétion génétique ou par l'administration d'antagoniste du B1R) ont une diminution des médiateurs pro-inflammatoires avec une augmentation des médiateurs anti-inflammatoires (Wang *et al.*, 2008).

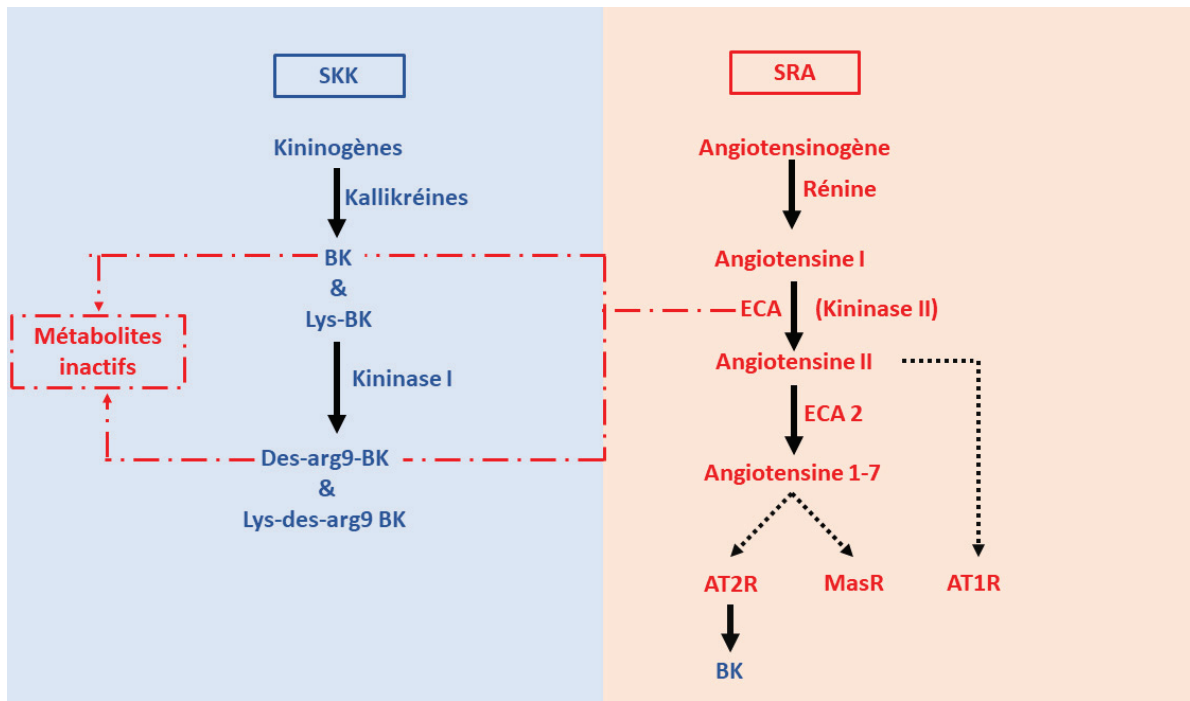
#### 1.6.9. Le système kallibréine-kinines et le système rénine-angiotensine

Le SKK contrebalance le système rénine-angiotensine (SRA) dans plusieurs réponses physiologiques et pathologiques (Couture *et al.*, 2014). Le SRA, entre autres, joue un rôle clé dans la régulation de la pression artérielle et l'équilibre hydro-électrolytique.

Dans les conditions d'hypotension, d'hyponatrémie ou même d'hyperkaliémie, les reins sécrètent une enzyme appelée rénine. Cette dernière métabolise l'angiotensinogène, une protéine produite par le foie qui circule dans le sang, en angiotensine I (Ang I). Par l'action de l'ECA (kininase II), l'Ang I est métabolisée principalement dans les vaisseaux pulmonaires en Ang II, agoniste du récepteur de type 1 de l'angiotensine II (AT1R). L'Ang II, par l'action de l'ECA2, peut subir une dégradation pour produire de l'angiotensine 1-7, agoniste des récepteurs (AT2R) et Mas (MasR) (Couture *et al.*, 2014). Il convient de noter que l'activation de l'AT2R libère la BK (Figure 17) (Tsutsumi *et al.*, 1999).

L'ECA ou kininase II, est une enzyme ubiquitaire, localisée surtout sur l'endothélium vasculaire et elle est liée à la membrane cellulaire par sa partie C-terminale avec une partie catalytique extracellulaire (Soubrier *et al.*, 1988; Wei *et al.*, 1991). L'ECA est une enzyme à double action; elle est responsable de la génération du vasoconstricteur angiotensine II, et de la dégradation des kinines vasodilatatrices (Yang *et al.*, 1970; Ismael *et al.*, 2008). L'ECA dégrade les kinines et leurs métabolites actifs en coupant les dipeptides et les tripeptides en position C-terminal (Figure

17) (Yang *et al.*, 1970, 1971; Inokuchi et Nagamatsu, 1981; Couture *et al.*, 2014; Regoli et Gobeil, 2017).



**FIGURE 17: INTERACTION ENTRE LE SYSTÈME KALLICRÉINE-KININES (SKK) ET LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE (SRA)**

Fait intéressant, les effets pro-inflammatoires de l'Ang II ont été attribués à l'activation de l'AT1R et du B1R (Parekh *et al.*, 2019). L'Ang II via l'activation de l'AT1R induit le B1R *in-vitro* (Morand-Contant *et al.*, 2010), et *in-vivo* (Fernandes *et al.*, 2006). En effet, l'Ang II augmente l'activation de la NADPH oxydase, de l'IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  et du NF- $\kappa$ B, et par conséquent induit le B1R (Morand-Contant *et al.*, 2010, Parekh *et al.*, 2019). Fait important, l'antagoniste du B1R renverse ces cascades de signalisation induites par l'AT1R (Parekh *et al.*, 2019).

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication du SRA dans l'inflammation et les altérations vasculaires dans les pathologies rétinienne notamment dans la RD, la rétinopathie des prématurés et la DMLA (Wilkinson-Berka *et al.*, 2019). Ceci a commencé par la découverte de l'expression locale des composantes du SRA dans l'œil humain (Danser *et al.*, 1994; Paul *et al.*, 2006; White *et al.*, 2015; Choudhary *et al.*, 2017). Chez l'humain, une production intraoculaire du SRA a été suggérée puisque les concentrations de la rénine (Berka *et al.*, 1995), de l'Ang I et de l'Ang II (Kohler *et al.*, 1997) dans la rétine et la choroïde (Wheeler-Schilling *et al.*, 1999) sont plus élevées que dans le plasma (Igic, 2018; Wilkinson-Berka *et al.*, 2019). Par ailleurs, une

augmentation de la pro-rénine a été rapportée dans l'humeur vitrée des patients ayant une RD proliférative (Danser *et al.*, 1989).

#### **1.6.9.1. Le système rénine-angiotensine dans la rétinopathie diabétique**

Le SRA exerce une multitude d'actions pathologiques dans les rétinopathies, notamment la stimulation de la néovascularisation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la formation d'un œdème et l'inflammation (Wilkinson-Berka *et al.*, 2019). L'utilisation des bloqueurs du SRA a permis de mettre en évidence l'implication du SRA dans le développement des rétinopathies. En effet, l'Ang II induit l'apoptose des péricytes dans la rétine *in-vivo* et *in-vitro* chez le rat hypertendu en augmentant l'expression des RAGE (Yamagishi *et al.*, 2005), alors que l'antagoniste de des récepteurs de l'angiotensine (Candesartan) bloque ces réponses (Sugiyama *et al.*, 2007). L'inhibiteur de l'AT1R, candésartan, réduit la perméabilité vasculaire rétinienne chez le rat-STZ ou le rat traité par l'Ang II (Phipps *et al.*, 2009). L'AT1R potentialise la néovascularisation induite par le VEGF, participant ainsi à la progression de la RD (Strain et Chaturvedi, 2002). Toutefois, les effets des antagonistes de l'AT1R sur la RD sont contradictoires. Les comprimés de candésartan (bloqueur de l'AT1R), par exemple, réduisent l'évolution des microanévrismes sans faire régresser ou ralentir la pathogenèse de la RD (Sjolie *et al.*, 2011). Paradoxalement, le losartan (AT1R antagoniste) ralentit la progression de la RD (Mauer *et al.*, 2009). L'inhibition de l'ECA (ECAi) diminue l'expression du VEGF et l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans un modèle de RD chez le rat (Gilbert *et al.*, 2000). L'inhibition de l'ECA diminue le risque et prévient le développement et l'évolution de la RD chez l'humain (Vejakama *et al.*, 2012; Kiire *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Les ECAi administrés aux patients diabétiques normotendus ralentissent la pathogenèse de la RD (Mauer *et al.*, 2009). Fait intéressant, l'inhibition de l'ECA prévient l'induction du B1R dans les vaisseaux du rat diabétique (Ismael *et al.*, 2008). Ainsi, les effets bénéfiques des inhibiteurs de l'ECA dans la RD pourraient être attribués à l'inhibition du B1R (Bhat *et al.*, 2014).

#### **1.6.9.2. Le système rénine-angiotensine dans la DMLA**

L'antagoniste des récepteurs de la pro-rénine prévient la production du CCL2 et du VEGF *in-vivo* dans un modèle de CNV chez la souris et *in vitro* dans les cellules endothéliales vasculaires (Satofuka *et al.*, 2008). L'expression cellulaire de l'AT1R dans la RPE (Pons *et al.*, 2011) peut faire de ce récepteur une cible thérapeutique pour la DMLA (Igic, 2018), étant donné que

l'antagoniste de l'AT1R bloque la néovascularisation choroïdienne dans les tissus humains et la CNV *in-vivo* chez la souris (Nagai *et al.*, 2006). Bien que des effets bénéfiques importants aient été montrés avec les bloqueurs du SRA dans certaines études de DMLA chez le rongeur, l'implication de ce système dans la DMLA humaine semble moins impressionnante. En effet, plusieurs études ont montré que ni les ECAi ni les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine n'ont d'effets positifs sur la DMLA chez l'humain (Thomas *et al.*, 2015; Kolomeyer *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2019). Les résultats des essais cliniques indiquant l'efficacité des ECAi ciblant le SRA dans le traitement de la pathologie rétinienne sont plutôt attribués à l'inhibition de la dégradation de la BK (Wang *et al.*, 2015). De plus, une diminution de la dégradation des agonistes endogènes du B1R a été observée dans le plasma des patients traités avec les ECAi (Molinaro *et al.*, 2002).

Pour terminer, cibler le SRA serait intéressant pour bloquer l'activation du B1R et traiter la RD (Bhat *et al.*, 2014). Toutefois, l'augmentation des niveaux des kinines due à l'inhibition de l'ECA a soulevé des questions sur la possibilité que les ECAi puissent augmenter la perméabilité vasculaire et induire un œdème dans la rétine (Bolinger et Antonetti, 2016). De plus, une augmentation de la BK après l'inhibition de l'ECA peut causer une chute de la pression artérielle, et des angioedèmes, ainsi qu'une douleur liée à l'inflammation (Beavers *et al.*, 2011; Bezalel *et al.*, 2015). Ainsi, cibler le B1R dans les pathologies rétinienne liées à l'inflammation demeure la thérapie la plus sécuritaire avec le moins d'interaction possible avec d'autres axes impliqués dans les réponses physiologiques.

## 1.7. Rationnel de la thèse et ses objectifs généraux

En résumé, les informations présentées portent sur les mécanismes fondamentaux impliqués dans le développement de deux pathologies rétinienne liées à l'inflammation soit la RD et la DMLA. Les principaux traitements de ces pathologies ont été également abordés. D'ailleurs, le rôle pro-inflammatoire et pro-angiogénique du SKK, et plus particulièrement du B1R, dans la RD et la DMLA a été discuté attentivement. Brièvement, une participation du B1R à l'augmentation du stress oxydatif, des médiateurs inflammatoires et de la perméabilité vasculaire a été rapportée dans la rétine du rat diabétique-STZ, et son inhibition renverse ces réponses (Abdouh *et al.*, 2008; Pouliot *et al.*, 2012; Hachana *et al.*, 2018). Le B1R participe également aux événements inflammatoires mais aussi à la néovascularisation dans la CNV chez le rat, qui sont renversés par un traitement avec des gouttes oculaires d'un antagoniste du B1R (Hachana *et al.*, 2020a). Il ressort

que le B1R représente une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de la RD et de la DMLA.

Hypothèse (article 1) : Nous proposons que le B1R contribue aux évènements inflammatoires, au stress oxydatif et à la dysfonction vasculaire en activant la voie de la iNOS dans la rétine du rat diabétique-STZ. À travers cette étude, nous répondons à une question fondamentale qui est en rapport avec le mécanisme d'action du B1R et la voie par laquelle le B1R contribue à la pathogenèse de la RD. Cette étude pré-clinique suggère qu'un antagoniste du B1R ou de la iNOS pourrait être administré par voie topique afin de traiter la RD.

Hypothèse (article 2) : Nous proposons que le B1R est induit et surexprimé dans la rétine humaine atteinte de DMLA, associée à des marqueurs de l'inflammation. Nous avons entrepris d'étudier l'expression et la localisation cellulaire du B1R en relation avec certains marqueurs de l'inflammation et de la fibrose dans des rétines humaines atteintes de DMLA exsudative et atrophique obtenues en *post-mortem* de la Biobanque de yeux humains pour la recherche à l'Hôpital St. Michael's de Toronto. Une identification de l'expression du B1R dans des rétines humaines atteintes de DMLA (atrophique et exsudative) est essentielle pour une transition vers des études cliniques, où l'antagoniste du B1R pourrait être administré par voie topique; un traitement moins invasif que les injections intravitréennes. Très peu d'études se sont intéressées à l'expression du SKK dans la DMLA chez l'humain et aucune n'a regardé l'expression du B1R.

## Chapitre 2 **Premier article**

## 2.1. Article 1

**Othman R, Vaucher E, Couture R. (2019) Bradykinin Type 1 Receptor - Inducible Nitric Oxide Synthase: A New Axis Implicated in Diabetic Retinopathy. *Frontiers in Pharmacology*. 29;10:300.**

### 2.1.1. Problématique

Des données récentes de notre laboratoire suggèrent un rôle clé du récepteur B1 des kinines dans la pathogenèse de la rétinopathie diabétique (RD) (Pouliot *et al.*, 2012; Hachana *et al.*, 2018). Toutefois, le mécanisme par lequel ce récepteur est impliqué dans la pathologie demeure à découvrir. Par ailleurs, plusieurs études supportent une implication de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote inductible (iNOS) dans la RD. Il a été rapporté que le B1R peut activer la iNOS dans les cellules embryonnaires humaines (HEK293) via la voie G $\alpha$ i / ERK/ MAPK. Cette étude vise à élucider si les effets adverses du B1R dans la RD sont attribués à une activation de la voie iNOS.

### 2.1.2. Hypothèse

Le B1R contribue à l'inflammation, au stress oxydatif et à la dysfonction vasculaire dans la RD, en activant la voie de la iNOS.

### 2.1.3. Objectifs

- 1- Déterminer si l'inhibition de la iNOS interrompt la cascade inflammatoire activée par le B1R dans la rétine en diminuant l'expression des médiateurs pro-inflammatoires, le stress oxydatif et la perméabilité vasculaire induits par le B1R et le diabète.
- 2- Évaluer l'expression et la distribution du B1R et de la iNOS dans la rétine diabétique, et l'effet de l'inhibition de la iNOS sur cette distribution.

### 2.1.4. Méthode expérimentale

Des rats Wistar âgés de 6 semaines ont été rendus diabétiques par une injection unique de streptozotocine (65 m/kg, i.p.). Pendant la deuxième semaine de diabète, les rats ont été traités deux fois par jour avec des gouttes oculaires de l'inhibiteur sélectif de la iNOS, le 1400W (150  $\mu$ g/10 $\mu$ l). À la fin de la deuxième semaine, les rétines ont été prélevées pour évaluer : 1) l'expression



protéique et de l'ARNm des immunomodulateurs par Western blot et qRT-PCR; 2) l'expression des protéines nitrosylées; 3) l'expression et la distribution du B1R et de la iNOS par immunofluorescence; et 4) la perméabilité vasculaire (induite par le diabète et par des injections intravitréennes de l'agoniste du B1R (R838), par la technique du bleu d'Evans.

#### **2.1.5. Contribution**

RO a participé au design expérimental, a réalisé les expériences, a analysé les données et a écrit la première version du manuscrit. EV et RC ont contribué à l'interprétation des résultats et au design expérimental, et à l'écriture de la version finale du manuscrit. RC a fait la correspondance avec l'éditeur.

Chapitre 3 **Deuxième article**

### 3.1. Article 2

**Othman R, Berbari S, Vaucher E, Couture R. (2020) Differential expression of kinin receptors in human wet and dry age-related macular degeneration retinæ. Pharmaceuticals (Basel). 24;13(6):130.**

#### 3.1.1. Problématique

Les injections intravitréennes des anti-VEGF sont le seul traitement disponible actuellement pour traiter la DMLA exsudative. Les anti-VEGF traitent toutefois la néovascularisation, sans traiter les autres signes cliniques. Par ailleurs, la DMLA atrophique demeure non traitable. Trois études seulement (incluant celle de notre équipe, Hachana *et al.*, 2020a) ont investigué l'implication du SKK dans un modèle de néovascularisation choroïdienne. Aucune étude n'a cependant évalué l'implication du SKK dans la DMLA atrophique.

Ainsi, cette étude vise pour la première fois à identifier si des processus inflammatoires associés aux récepteurs des kinines se manifestent dans la DMLA chez l'humain. La distribution cellulaire du B1R et du B2R par immunofluorescence et hybridation *in-situ* a été examinée dans les rétines humaines *post-mortem* saines et atteintes de DMLA exsudative et atrophique.

La finalité de cette étude est de démontrer si un traitement avec l'application de gouttes oculaires contenant un antagoniste du B1R peut être considéré comme une stratégie thérapeutique d'avenir pour traiter les deux formes de DMLA associées à l'inflammation.

#### 3.1.2. Hypothèse

En se basant sur notre étude pré-clinique, on croit que le B1R est également exprimé dans la rétine humaine atteinte de DMLA, et qu'il est associé à des marqueurs de l'inflammation.

#### 3.1.3. Objectifs

Nos objectifs sont d'évaluer : 1) la localisation cellulaire du B1R et du B2R dans la DMLA atrophique et exsudative; 2) l'association du B1R avec les immunomodulateurs (iNOS et VEGFA), les marqueurs de la fibrose, la microglie et la macroglie (astrocytes et cellules de Müller); 3) si les deux formes de DMLA, qui sont considérées comme deux entités différentes, partagent le B1R comme axe inflammatoire commun.

#### 3.1.4. **Contribution**

RO a participé au design expérimental, a réalisé les expériences, a analysé les données et a écrit la première version du manuscrit. SB a aidé dans l'hybridation *in-situ*. EV et RC ont contribué à l'interprétation des résultats et au design expérimental, et à l'écriture de la version finale du manuscrit. RC a fait la correspondance avec l'éditeur.

## Chapitre 4 **Discussion et perspectives**

#### 4.1. **Faits saillants de la thèse**

La recherche sur l'implication du SKK dans les pathologies oculaires a débuté il y a plus d'une vingtaine d'années et plusieurs questions demeuraient à être explorées, notamment le rôle physiopathologique, l'expression et le mécanisme d'action du B1R dans la rétine humaine. Ainsi, cette thèse a permis d'approfondir nos connaissances sur le B1R dans deux pathologies rétiniennes liées à l'inflammation soit la RD dans un modèle de diabète de type 1 induit par la STZ chez le rat, et la DMLA exsudative et atrophique chez l'humain. Dans le premier article, nous avons montré une participation conjointe de la iNOS et du B1R dans les événements inflammatoires, la formation du peroxy-nitrite, les altérations vasculaires et l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans la rétinopathie diabétique chez le rat. Notre deuxième étude est la première à démontrer une forte expression du B1R dans la DMLA exsudative versus une faible expression dans la DMLA atrophique chez l'humain. Le B1R était surtout exprimé sur les vaisseaux rétiniens, dans l'épithélium pigmentaire, sur les cellules macrogliales et la microglie de la rétine atteinte de DMLA exsudative. Une colocalisation avec la iNOS et les marqueurs de la fibrose (collagène-1 $\alpha$  et  $\alpha$ -SMA) a été également observée. Par conséquent, nos études montrent une contribution du B1R à l'inflammation, au stress oxydatif et aux altérations vasculaires associées aux pathologies rétiniennes chez le rat et l'humain. Une participation du B1R à la néovascularisation pathologique dans les pathologies néovasculaires rétiniennes est également suggérée. Ces résultats mettent en évidence l'importance de considérer l'antagonisme du B1R comme traitement possible des pathologies rétiniennes néovasculaires et/ou liées à l'inflammation telles que la RD et la DMLA.

#### 4.2. **Avantages et limitations du modèle de diabète induit par la STZ**

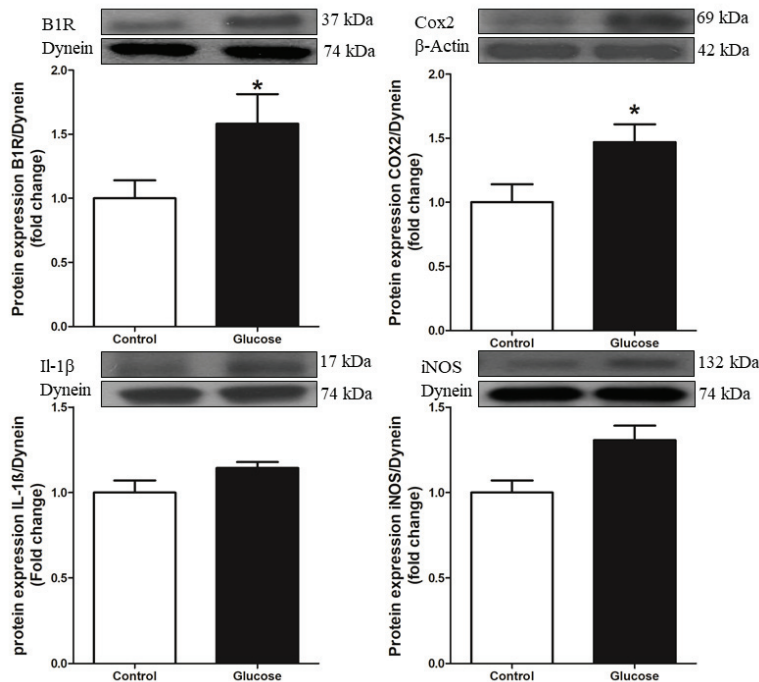
Le modèle STZ s'avère le modèle le plus utilisé pour étudier le diabète de type 1, et pour évaluer le rôle du B1R dans les complications du diabète (Couture *et al.*, 2014). L'avantage de ce modèle est l'apparition rapide du phénotype de la RD chez le rat qui peut être atteinte à partir du quatrième jour après l'injection de la STZ (Abdouh *et al.*, 2003; Pouliot *et al.*, 2011). En effet, une augmentation de la perméabilité vasculaire, de la leucostase, des médiateurs inflammatoires et du stress oxydatif ainsi qu'une diminution du débit sanguin ont été observées dans la rétine du rat diabétique-STZ (Abdouh *et al.*, 2003; Pouliot *et al.*, 2011; Pouliot *et al.*, 2012). Une perte de

capillaires et des cellules rétinienne (Gastinger *et al.*, 2006), une prolifération et activation des cellules gliales (Zeng *et al.*, 2000) et un amincissement de la rétine (Zhang *et al.*, 2008) ont aussi été observés dans ce modèle. Certaines lignées de rats-STZ ont également montré une diminution de l'activité électrophysiologique de la rétine (Rossini *et al.*, 1977; Hancock et Kraft, 2004; Zheng *et al.*, 2007; Kohzaki *et al.*, 2008; Sasaki *et al.*, 2010).

Le modèle STZ possède toutefois certaines limitations. En effet, c'est un modèle qui résume le stade précoce de la RD (stade non-prolifératif) sans développer les signes des stades les plus avancés, dont la néovascularisation (Olivares *et al.*, 2017) que nous n'avons pas observée à 6 mois post-STZ (Hachana *et al.*, 2018). Une autre limitation de ce modèle est que la structure de la STZ est similaire à celle du glucose, lui permettant d'être transporté via le GLUT 2. Toutefois, plusieurs organes expriment ce transporteur tels que les reins, le foie et la rétine (Petzold et Swenberg, 1978; Brambilla *et al.*, 1987; Schnedl *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1994; Johnston *et al.*, 2007), et une cytotoxicité secondaire au passage cellulaire de la STZ peut donc se produire. En outre, la STZ induit la libération de plusieurs médiateurs pro-inflammatoires et donc, peut déclencher une réponse inflammatoire aiguë (Herold *et al.*, 1996). Ce qui peut en quelque sorte affecter les résultats. Nous attribuons cependant le phénotype de la RD et l'induction du B1R dans la rétine à l'hyperglycémie chronique due au développement du diabète de type 1 et non au processus inflammatoire induit par la STZ.

Pour mettre en contexte, la majorité des patients diabétiques de type 1 développent une RD durant les vingt premières années de diabète, malgré que ces patients ne représentent que 10% de la population diabétique. Il serait alors pertinent d'investiguer l'implication du SKK dans la rétinopathie dans un modèle de diabète de type 2. Notre équipe a récemment montré une expression rétinienne du B1R dans un modèle de diabète de type 2 spontanément induit chez le rat GOTO-Kakizaki (Hachana *et al.*, 2020b). Par ailleurs, nous avons récemment initié une étude dans un autre modèle de diabète de type 2 chez le rat traité au glucose pendant douze semaines. Ce modèle développe la résistance à l'insuline et plusieurs caractéristiques d'un diabète de type 2 (Dias *et al.*, 2010; Dias et Couture, 2012b; El Midaoui *et al.*, 2017; Haddad et Couture, 2017a). Nos résultats préliminaires montrent une augmentation de l'expression protéique du B1R et de la COX-2 mais non de l'IL-1 $\beta$  et de la iNOS dans la rétine des rats traités au glucose (Figure 18). Ces études

indiquent donc que le B1R est induit et surexprimé dans le diabète de type 2; son rôle et sa distribution cellulaire demeurent cependant à être confirmés.



**FIGURE 18: NIVEAU D'EXPRESSION PROTÉIQUE DU B1R DANS LA RÉTINE D'UN MODÈLE DE RAT DIABÉTIQUE DE TYPE 2**

Mesure par immunobuvardage de type Western de l'expression protéique du B1R dans la rétine du rat témoin (control) et traité au glucose (10% dans l'eau de boisson) pendant 12 semaines. Les données sont exprimées sous forme de moyenne  $\pm$  SEM de 5 rats. La comparaison statistique avec le groupe témoin (\*) est indiquée par \*  $P < 0.05$ .

#### 4.3. Avantages et limitations des coupes de rétines humaines

Comme il existe de grandes différences entre les espèces, il nous était impératif de confirmer l'expression du B1R dans les rétines humaines atteintes de DMLA. Ainsi, l'utilisation de tissus humains nous a permis de rapporter pour la première fois une expression du B1R dans la DMLA chez l'humain. Toutefois, l'utilisation des rétines humaines obtenues *en post-mortem* a certaines limitations inhérentes. Ces limitations sont tributaires des données disponibles dans la banque de tissus, incluant les variations d'âge et l'absence de l'historique médical des donneurs. En effet, de nombreux facteurs peuvent influencer la physiologie d'une personne, y compris l'âge, les facteurs génétiques et environnementaux, incluant les habitudes de vie (tabagisme, alcoolisme, sédentarité,



diète, etc.) et les antécédents médicaux. Néanmoins, nous savons qu'aucun des patients de notre étude n'a reçu de traitement anti-VEGF pour la DMLA. Le temps de prélèvement *post-mortem* et le temps de fixation sont inconnus, et auraient pu expliquer la fragilité des rétines face à la coupe. En effet, plusieurs rétines étaient déchirées et détachées de l'EPR ce qui a limité notre investigation. Malgré ce contexte, une surexpression du B1R a été observée dans toutes les rétines DMLA contrairement aux rétines contrôles. L'utilisation des coupes humaines s'avère importante pour valider l'expression du B1R déjà observée dans le modèle de DMLA pré-clinique, afin d'ouvrir la porte à des études cliniques.

#### **4.4. Expression et mécanismes d'action des récepteurs des kinines dans la rétinopathie diabétique**

La première démonstration de la présence du B1R chez l'homme remonte à une étude fonctionnelle effectuée sur des spécimens de colon prélevés lors de chirurgies (Couture *et al.*, 1981). La mesure d'expression du B2R a été réalisée pour la première fois en 1992, dans le tissu synovial humain (Bathon *et al.*, 1992), et sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux (Munoz et Leeb-Lundberg, 1992). Par ailleurs, la première mesure d'expression du B1R est celle de Chai qui a rapporté une expression de l'ARNm du B1R dans les reins et le pancréas chez l'humain (Chai *et al.*, 1996). Dans la même année, Ma a rapporté une expression du B1R et du B2R sur les cellules endothéliales des vaisseaux rétiniens chez l'humain (Ma *et al.*, 1996b). Toutefois, ces études n'ont pas fourni d'analyse pathologique des patients. Par ailleurs, plusieurs pathologies ont été associées à l'expression des récepteurs des kinines y compris les maladies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, rénales ou encore cérébrales (Couture *et al.*, 2014; Qadri et Bader, 2018). Le B1R, et à un moindre degré le B2R, sont trouvés exprimés dans plusieurs types de cancer tels que le cancer épidermoïde de l'œsophage, le cancer colorectal, le cancer de la vésicule biliaire et de la prostate (Dlamini et Bhoola, 2005; Zelawski *et al.*, 2006; Toledo *et al.*, 2012; Naidu *et al.*, 2014).

Peu d'études se sont penchées sur l'immuno-localisation du B1R faute de disponibilité d'un anticorps commercial spécifique dirigé contre le B1R. Ainsi, pour contourner ce problème notre équipe a développé des anticorps anti-B1R (un dirigé contre un épitope humain et un autre contre un épitope de rat), ce qui a permis d'étudier la distribution et la localisation cellulaire du B1R dans plusieurs organes (Talbot *et al.*, 2009) y compris la moelle épinière, le cerveau, le pancréas, et les vaisseaux du rat diabétique-STZ (Ongali *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2005; Talbot *et al.*, 2009;

Tidjane *et al.*, 2016; Haddad et Couture, 2017b). Cet anticorps nous a permis de confirmer l'expression du B1R par immunobuvardage de type *Western* et par immunofluorescence dans la rétine du rat diabétique-STZ (premier article de cette thèse) qui avait été démontrée préalablement par autoradiographie (Abdou *et al.*, 2003), et dans un modèle de DMLA chez le rat (Hachana *et al.*, 2020a).

Le SKK est exprimé localement dans la rétine, et participe à plusieurs niveaux dans la fonction oculaire (Ma *et al.*, 1996b; Webb, 2011). En effet, la kallibréine plasmatique et le HK se lient à l'endothélium vasculaire pour libérer la bradykinine et activer le B2R qui joue un rôle clé dans le contrôle du tonus vasculaire (Webb, 2011). Par ailleurs, la kallibréine plasmatique est essentielle pour l'adaptation du flux sanguin dans les conditions de stress aigu, de pré-conditionnement et de protection tissulaire contre les lésions ischémiques (Webb, 2011). Ces composantes sont ainsi exprimées constitutivement dans la rétine, contrairement au B1R qui est quasi indétectable dans la rétine saine, mais qui est induit dans les conditions pathologiques dans la rétine du rat (Pouliot *et al.*, 2012; Bhat *et al.*, 2014; Hachana *et al.*, 2018; Hachana *et al.*, 2020a), et la rétine de l'humain atteinte de RD (Bhat *et al.*, 2014).

Des avancées récentes supportent une contribution du SKK dans le développement et la progression de la RD. La kallibréine plasmatique et le HK sont exprimés dans la rétine du rat diabétique (Takeda *et al.*, 1999; Phipps et Feener, 2008), et dans le vitré des patients atteints de RD (Gao *et al.*, 2007). La protéine de liaison de la kallibréine tissulaire est diminuée dans la rétine du rat diabétique (Hatcher *et al.*, 1997), ce qui explique l'augmentation de la kallibréine tissulaire observée dans ce modèle (Catanzaro *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'injection de la kallibréine plasmatique augmente la perméabilité vasculaire dans la rétine du rat témoin et davantage dans la rétine diabétique; une réponse qui est renversée par l'inhibition de la kallibréine plasmatique (Clermont *et al.*, 2011). L'implication de cette dernière dans la RD a été toutefois attribuée à l'activation du B2R. En effet, l'inhibition du C1-INH, inhibiteur du FXII, augmente la kallibréine plasmatique et une augmentation secondaire de la BK qui résulte en une activation du B2R et à un œdème vasogène (Han *et al.*, 2002). Toutefois, la PK est une enzyme constitutive impliquée dans d'autres systèmes y compris la thrombose et l'hémostase sanguine, ainsi son inhibition risque d'interférer avec son rôle physiologique (Bhat *et al.*, 2014). De plus, le B2R constitutif aussi bien que la eNOS sont essentiels pour le bon fonctionnement des vaisseaux et le maintien du débit

sanguin. Dans ce contexte, la délétion génétique de la eNOS aggrave les complications vasculaires dans la rétine des souris diabétiques (Li *et al.*, 2010). Dans notre étude, le B2R ne semble pas être affecté par le diabète. En effet, nos données sur l'expression protéique et de l'ARNm du B2R ne montrent pas de changements significatifs, après 2 semaines, dans la rétine diabétique-STZ. Une autre étude de notre laboratoire a aussi montré une augmentation non significative de l'expression de l'ARNm du B2R dans la rétine du rat diabétique-STZ de deux semaines (Pouliot *et al.*, 2012). Toutefois, dans le même modèle, une augmentation significative de l'ARNm du B2R a été observée à 2 et 24 semaines (Hachana *et al.*, 2018). Dans cette dernière étude, l'expression protéique n'a pas été mesurée. Par ailleurs, dans un modèle de résistance à l'insuline, aucun changement au niveau de l'expression protéique du B2R n'a été observé dans le cortex rénal, l'aorte et le foie du rat diabétique (Haddad et Couture, 2016). Nos résultats sont conformes avec l'implication du B2R dans la phase aiguë de la réponse inflammatoire et non dans la phase chronique, ceci étant associé à sa rapide désensibilisation et internalisation après activation par ses agonistes (Couture *et al.*, 2014). Malgré tout, des études pharmacologiques utilisant des antagonistes spécifiques et sélectifs du B2R seront nécessaires afin de confirmer ou d'infirmer la participation du B2R dans la RD.

En revanche, nos mesures d'expression protéique et de l'ARNm du B1R montrent une '*upregulation*' de ce récepteur associé à une augmentation d'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , VEGF-A, VEGFR-2, HIF-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , CPM) dans la rétine du rat diabétique-STZ (premier article de cette thèse). En effet, l'hyperglycémie chronique augmente le stress oxydatif qui active le facteur nucléaire NF- $\kappa$ B, responsable de la transcription de plusieurs médiateurs inflammatoires, incluant le B1R (Couture *et al.*, 2014). Le B1R est exprimé très tôt dans la rétine du rat STZ; au 4<sup>e</sup> jour et reste jusqu'au 6<sup>ème</sup> mois après l'induction du diabète (Abdouh *et al.*, 2003; Hachana *et al.*, 2018). Il contribue au processus inflammatoire, à la leucostase et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans la RD puisque ces événements sont renversés par l'administration de gouttes topiques d'antagonistes du B1R (LF22-0542 et R-954) (Pouliot *et al.*, 2012; Hachana *et al.*, 2018). Les efforts de notre équipe durant les dix dernières années ont permis de faire avancer la recherche sur l'implication du B1R dans la RD, toutefois son mécanisme d'action demeurerait à investiguer.

Il a été rapporté que le B1R active la iNOS via la voie Gai / ERK / MAPK dans les cellules rénales embryonnaires humaines (HEK293) (Brovkovich *et al.*, 2011), et que l'inhibition du B1R

renverse la surexpression de la iNOS dans la rétine, le pancréas, le tissu adipeux et les vaisseaux des rats diabétiques (Dias et Couture, 2012b; Pouliot *et al.*, 2012; Tidjane *et al.*, 2016). Par ailleurs, le B1R peut également activer la NADPH oxydase qui produit l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Dias *et al.*, 2010; Dias et Couture, 2012a, b; Haddad et Couture, 2017b). Le NO produit par la iNOS peut réagir rapidement avec l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> pour former le ONOO<sup>-</sup>, lequel induit l'apoptose des cellules endothéliales et neuronales, la dégénérescence neuronale et l'ouverture de la BHR dans la RD (El-Remessy *et al.*, 2003a; El-Remessy *et al.*, 2003b; el-Remessy *et al.*, 2005; El-Remessy *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007; Al-Shabrawey *et al.*, 2008a; Al-Shabrawey *et al.*, 2008b). Le ONOO<sup>-</sup> peut activer le NF-κB et augmenter ainsi l'expression des immunomodulateurs, incluant le B1R (Couture *et al.*, 2014; Haddad et Couture, 2017b). Par conséquent, l'activation du B1R amplifie et perpétue les événements inflammatoires et le stress oxydatif à travers une boucle de rétroaction positive. En outre, le B1R s'autoinduit en présence de ses agonistes en activant cette voie qui cause la transcription du gène codant pour le B1R (Schanstra *et al.*, 1999). Cette voie est la mieux décrite dans l'inflammation, toutefois le B1R peut aussi activer différentes sous-unités Gα qui seront également impliquées dans les processus inflammatoires (Couture *et al.*, 2014). Ainsi, il était important de tester l'interaction avec la iNOS dans la rétine du rat diabétique. Fait intéressant, le 1400W renverse l'expression des médiateurs inflammatoires et la formation des protéines nitrosylées dans la rétine du rat diabétique, incluant le B1R. Ceci était notre première preuve de la participation de la iNOS dans la boucle d'autoinduction du B1R. Nos résultats montrent également que l'arrêt de cette boucle avec le 1400W diminue l'expression de la CPM ce qui peut diminuer également la production des agonistes endogènes du B1R. Par conséquent, le triangle B1R, iNOS, NADPH oxydase proposé par notre étude représente une voie raisonnable dans la formation des protéines nitrosylées et la contribution aux événements inflammatoires dans la RD.

Pour terminer, il a été suggéré que le B1R puisse altérer l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique soit en inhibant l'expression des composantes des jonctions serrées (occludine, claudine et zonula occludens-1), ou en réarrangeant l'actine filamenteuse du cytosquelette (Sriramula, 2020). L'agoniste du B1R, des-Arg9-BK, diminue l'expression de la zonula-occludens-1 et de l'occludine dans les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau humain in-vitro (Mugisho *et al.*, 2019). En lien avec cette observation, l'inhibition de la iNOS dans la rétine de la souris diabétique prévient la diminution d'expression de l'occludine et de la zonula occludens-1 protégeant ainsi la dissociation de la BHR (Leal *et al.*, 2007). Dans notre étude, l'agoniste du

B1R (R-838) exacerbe la perméabilité vasculaire dans la rétine du rat diabétique-STZ, sans affecter la rétine témoin. Cette réponse est par ailleurs renversée par l'inhibiteur de la iNOS (1400W). Aussi les antagonistes du B1R renversent l'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne chez le rat diabétique-STZ (Pouliot *et al.*, 2012; Hachana *et al.*, 2018). Ainsi, il serait intéressant d'investiguer le mécanisme par lequel le B1R participe à l'ouverture de la BHR.

#### 4.5. Rôle des récepteurs des kinines dans la néovascularisation

La contribution du B1R dans l'inflammation et la néovascularisation dans un modèle de DMLA exsudative chez le rat a été récemment rapporté par notre équipe (Hachana *et al.*, 2020a). Ainsi, une investigation de l'expression du B1R dans la rétine humaine DMLA est un atout pour une transition vers la clinique. Dans notre deuxième article de cette thèse, nous rapportons une expression du B1R dans les deux formes de DMLA humaine. Cette expression était plus importante dans la DMLA exsudative, suggérant une implication du B1R dans les événements de néovascularisation produits dans cette pathologie. Ceci conforte les études pré-cliniques précédentes (Hachana *et al.*, 2020a). Le rôle du B1R dans la néovascularisation a été rapporté dans plusieurs modèles. Dans les kératinocytes humains, l'activation du B1R augmente la libération de l'IL4 et du VEGF et stimule la migration des cellules endothéliales (Mejia *et al.*, 2015). L'agoniste du B1R induit la néovascularisation dans la cornée du lapin, une réponse renversée par le blocage du B1R qui est aussi efficace que l'inhibition du VEGF-A (Parenti *et al.*, 2001). Par ailleurs, l'inhibition du B1R diminue significativement la vascularisation d'une tumeur dans le foie de la souris (da Costa *et al.*, 2018). De plus, l'antagoniste du B1R renverse la revascularisation et les augmentations de l'expression du VEGF, de la eNOS et du FGFb induites par l'inhibiteur de l'ECA dans la patte ischémique du rat diabétique-STZ (Gao et Yu, 2008). Dans ce même modèle, l'administration d'un agoniste B1R ou B2R induit la revascularisation en stimulant la mobilisation des monocytes et des cellules mononucléaires pro-angiogéniques CD34/VEGFR-2 et l'infiltration des macrophages (Desposito *et al.*, 2015). En outre, dans une co-culture des cellules endothéliales humaines et de neuroblastomes, les B1R et B2R sont exprimés sur les sites d'interaction entre ces deux types de cellules, suggérant un rôle de ces deux récepteurs dans la néovascularisation dans le neuroblastome (Naidoo et Raidoo, 2006). Fait important, nos résultats montrent une remarquable expression du B1R sur les cellules musculaires lisses des vaisseaux dans la rétine de DMLA et ceci pourrait induire une constriction prolongée des vaisseaux et contribuer à l'ischémie rétinienne,

déclencheur principal de la néovascularisation par l'activation du VEGF-A (Pen *et al.*, 2008). Collectivement, ces données supportent l'implication de B1R dans la néovascularisation dans la DMLA humaine.

Bien que le B2R soit impliqué dans la néovascularisation, son expression protéique et son ARNm n'étaient pas affectés par la DMLA, ce qui est consistant avec sa contribution à la phase aiguë et non chronique dans les réponses inflammatoires. En effet, la libération de la BK augmente drastiquement lors d'un dommage tissulaire, ce qui mène à l'activation du B2R (Couture et Girolami, 2004). Toutefois, le B2R se désensibilise et s'internalise rapidement après son activation (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005), et la réponse inflammatoire serait maintenue par le B1R. Aussi, la BK et la Lys-BK libérées dans les conditions inflammatoires sont métabolisées par l'action des kininases I en des-Arg9-BK et Lys-des-Arg9-BK qui stimulent le B1R (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'activation du B1R active les mêmes voies de signalisation que celles du B2R, mais sans désensibilisation ou internalisation du récepteur résultant en une induction et perpétuation des événements inflammatoires (Couture *et al.*, 2001).

#### **4.6. Rôle du B1R dans l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne dans la DMLA**

Une expression importante du B1R est observée sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et dans l'EPR des rétines humaines atteintes de DMLA, suggérant son implication dans la perturbation de l'intégrité de la BHR interne et externe dans cette pathologie (deuxième article). Notre équipe a récemment rapporté une expression du B1R sur les cellules endothéliales et une contribution de ce récepteur à l'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne dans la CNV chez le rat (Hachana *et al.*, 2020a). Par ailleurs, la participation du B1R à l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique a été mise en évidence dans plusieurs études (Qadri et Bader, 2018; Mugisho *et al.*, 2019). Par exemple, l'activation du B1R exprimé sur les cellules endothéliales vasculaires du cerveau humain augmente le transport paracellulaire en diminuant l'expression des composantes de la barrière hémato-encéphalique (Zonulas-occludens 1 et occludine) (Mugisho *et al.*, 2019). Ainsi, l'expression du B1R sur les cellules endothéliales vasculaires des rétines humaines atteintes de DMLA suggère son implication dans l'ouverture de la BHR interne dans cette pathologie. Cette théorie s'applique également pour son expression sur l'EPR. L'altération de cette dernière est un pivot dans le développement de la DMLA précédant les stades tardifs de DMLA, dans lesquels

l'inflammation et le stress oxydatif jouent un rôle primordial (Ambati *et al.*, 2013; Datta *et al.*, 2017). Ainsi, nous rapportons ici une distribution du B1R dans l'EPR pouvant contribuer à sa dégénérescence en augmentant et perpétuant les événements inflammatoires et le stress oxydatif (Abdough *et al.*, 2003; Pouliot *et al.*, 2012).

#### 4.7. L'axe B1R-iNOS dans la DMLA

Pour déterminer si le B1R recrute les mêmes voies de signalisation dans les pathologies inflammatoires de la rétine DMLA, nous avons évalué son expression par rapport à la iNOS. Nos résultats montrent une surexpression de la iNOS uniquement dans la DMLA exsudative, alors qu'elle était absente dans les coupes de DMLA atrophique. Ceci est en concordance avec des études précédentes montrant une expression de la iNOS dans la choroïde et la rétine de DMLA néovasculaire ou avec cicatrices disciformes actives, mais pas dans la choroïde ni dans la rétine de la DMLA atrophique ("Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Three-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group," 1986; Cherepanoff *et al.*, 2010). La dégénérescence des photorécepteurs associée à l'expression de la iNOS dans un modèle de CNV chez le rat et le singe est renversée par l'utilisation de l'inhibiteur des NOS (L-NAME) (She *et al.*, 2007). En effet, la production du NO par les macrophages est cytotoxique et stimule la néovascularisation dans la rétine et la choroïde (Ando *et al.*, 2002).

De plus, nos résultats montrent une coexpression de la iNOS avec le B1R dans la DMLA exsudative. Ceci nous permet d'énoncer l'hypothèse que le B1R puisse participer à la néovascularisation dans la DMLA en activant la voie de la iNOS, alors qu'il emprunterait d'autres voies pour déclencher et perpétuer l'inflammation dans la DMLA atrophique. Le rôle de la iNOS dans la néovascularisation pathologique a été mis en évidence dans un modèle de rétinopathie ischémique (OIR) (Sennlaub *et al.*, 2001, 2002; He *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2009). L'inhibition ou la délétion génétique de la iNOS bloque la néovascularisation intravitréenne (pathologique) et stimule la néovascularisation dans les zones ischémiques (Sennlaub *et al.*, 2001, 2002). En outre, l'inhibition de la iNOS était aussi efficace que le bevacizumab (anti-VEGF) dans la diminution de l'expression du VEGF et dans la suppression de la néovascularisation dans les rétines OIR (Zhang *et al.*, 2009). Collectivement, ces études appuient une implication de l'axe B1R-iNOS dans la DMLA exsudative, particulièrement dans la néovascularisation, alors que son implication dans la DMLA atrophique semble être peu ou pas importante.

#### 4.8. L'association du B1R avec les cellules gliales dans la DMLA

Il nous apparaissait important d'évaluer l'expression des cellules gliales et leur association avec le B1R dans la DMLA de patients, puisque nous avons montré une expression du B1R sur la macro- et la microglie dans les pathologies rétinienne chez le rat (Hachana *et al.*, 2018; Hachana *et al.*, 2020a). La macroglie comportant les astrocytes et les cellules de Müller joue un rôle primordial dans l'homéostasie, la fonction et le maintien de la rétine (Le, 2017). Les astrocytes sont localisés dans la couche des fibres nerveuses et de la GCL, alors que les cellules de Müller s'étalent sur toute la rétine (Coorey *et al.*, 2012; Reichenbach et Bringmann, 2013). Nos résultats montrent une remarquable augmentation de l'expression du GFAP, caractéristique de la macroglie (Anderson *et al.*, 2008), dans la rétine de patients atteints de DMLA. Cette augmentation était localisée dans la couche GCL et la partie interne de la rétine de DMLA atrophique, supportant une augmentation de la réactivité des astrocytes. Toutefois, l'augmentation de l'activité des cellules de Müller était plus visible dans la DMLA exsudative. Nos résultats montrent également une colocalisation du B1R avec le GFAP dans les rétines humaines atteintes de DMLA. Ces résultats sont en concordance avec des études précédentes de notre équipe montrant l'expression du B1R sur les astrocytes dans les maladies neurodégénératives touchant la rétine (modèle de CNV) (Hachana *et al.*, 2020a) et le cerveau (modèle d'Alzheimer) (Lacoste *et al.*, 2013), où l'inhibition du B1R était un atout pour protéger contre les lésions en réduisant l'activation de l'astroglie. En outre, l'inhibition du B1R réduit l'activation de l'astroglie chez la souris, protégeant ainsi contre les lésions cérébrales (Albert-Weissenberger *et al.*, 2012). Dans un modèle de douleur neuropathique induite par la ligature partielle du nerf sciatique, le B1R est exprimé sur les astrocytes de la moelle épinière et son inhibition réduit l'astroglie et le comportement de la douleur (Cernit *et al.*, 2020). En revanche, dans une tumeur de cerveau chez la souris, le B1R est exprimé sur les astrocytes et sa délétion cause une croissance de la tumeur, suggérant un rôle protecteur du B1R dans ce modèle (Nicoletti *et al.*, 2017). Par conséquent, nos données appuient fortement une implication du B1R dans la gliose chronique dans la DMLA humaine.

Notre étude montre également une colocalisation du B1R avec les cellules immunes de la rétine, la microglie, en concordance avec l'expression du B1R rapportée sur la microglie dans un modèle de DMLA pré-clinique (Hachana *et al.*, 2020a). L'expression du B1R sur la microglie dans la moelle épinière et sa contribution dans l'inflammation a été soulignée dans un modèle de neuropathie diabétique chez le rat STZ (Talbot *et al.*, 2010; Talbot et Couture, 2012), ainsi que



dans un modèle d'Alzheimer chez la souris (Lacoste *et al.*, 2013; Asraf *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2019). Par ailleurs, l'agoniste du B1R induit la migration, augmente la motilité et la chimiotaxie des cellules microgliales, alors que l'antagoniste du B1R inhibe cette réponse (Ifuku *et al.*, 2007). De plus, dans un modèle d'ischémie-reperfusion cérébrale chez la souris, l'effet neuroprotecteur de l'antagoniste du B1R est attribué à la suppression de la livraison de la signalisation de microglie aux cellules neuronales (Tang *et al.*, 2017). Fait intéressant, dans nos coupes DMLA exsudative le B1R est surtout colocalisé avec la microglie infiltrée dans la partie externe de la rétine, supportant un rôle de ce récepteur dans l'infiltration de la microglie. Ainsi, bloquer le B1R dans la rétine atteinte de DMLA pourrait contourner la neurodégénérescence et protéger la rétine. Ces données encouragent à poursuivre des essais cliniques permettant d'évaluer l'impact d'un traitement oculaire avec un antagoniste du B1R sur la réactivité macro- et microgliale dans la DMLA.

De plus, une colocalisation du B1R avec le collagène  $1\alpha$  et le  $\alpha$ -SMA supporte une association de la fibrose à l'expression du B1R dans la DMLA humaine. En effet, le B1R induit la fibrose dans les valves cardiaques humaines (Helske *et al.*, 2007) et au niveau rénal (Wang *et al.*, 2008; Klein *et al.*, 2009). Fait intéressant, l'antagoniste du B1R réduit la fibrose et le dépôt du collagène dans un modèle de remodelage cardiaque post-infarctus chez le rat (Lin *et al.*, 2016), et dans le rein des souris ayant subi une obstruction urétérale unilatérale (Klein *et al.*, 2009). Collectivement, ces données appuient un rôle pro-fibrotique pour le B1R (Couture *et al.*, 2014).

## 4.9. Perspectives

### 4.9.1. Projet de la rétinopathie diabétique

Les études poursuivies par notre équipe ont contribué à mettre en évidence un rôle pour le B1R dans la RD dans un modèle de diabète de type 1 (Abdouh *et al.*, 2003; Abdouh *et al.*, 2008; Pouliot *et al.*, 2011; Pouliot *et al.*, 2012; Hachana *et al.*, 2018), et de type 2 GOTO-Kakizaki (Hachana *et al.*, 2020b). Dans notre étude, on a montré que le B1R contribue à la pathogenèse de la RD par l'activation de la iNOS. Toutefois, on ignore le type cellulaire sur lequel le B1R et la iNOS sont co-exprimés et il serait donc intéressant de connaître leur co-localisation. Suite à cette étude, une invalidation conditionnelle pour la iNOS dans un seul compartiment (crelox; où la protéine est exprimée dans tout autre type cellulaire différent) chez la souris diabétique-STZ serait utile et nous permettrait d'identifier le type cellulaire ainsi que le type d'altération que le B1R est

responsable de produire via l'activation de la iNOS. En effet, il se peut que le B1R recrute d'autres voies de signalisation pour participer aux évènements inflammatoires.

Pour raffiner nos connaissances sur l'implication du B1R dans la perte de vision associée à la RD, il serait intéressant d'évaluer l'effet de l'antagoniste du B1R chez des souris wild-type et invalidées de façon conditionnelle pour la iNOS sur l'activité électrophysiologique dans la rétine des souris diabétiques. En effet, la délétion génétique de la iNOS n'a pas d'effet sur l'activité électrophysiologique de la rétine chez la souris diabétique-STZ (Zheng *et al.*, 2007). Il serait ainsi intéressant de mesurer l'activité électrophysiologique en absence de la iNOS pour voir si l'antagoniste du B1R maintient son effet thérapeutique. L'activité électrophysiologique peut être mesurée par électrorétinographie (ERG) pour évaluer la progression de la maladie, l'altération fonctionnelle et la perte de l'acuité visuelle (Bresnick et Palta, 1987; Ghirlanda *et al.*, 1991). L'ERG mesure deux activités : celle des photorécepteurs (onde a) et celle des cellules amacrines, bipolaires, et de Müller (onde b). Des tests de comportement peuvent être ajoutés à l'ERG, où l'animal doit répondre à un stimulus visuel, ce qui est plus proche de la réalité chez l'animal non anesthésié.

L'utilisation de cultures d'explants de rétine humaine serait également utile. Ce modèle *ex-vivo* est le plus approprié pour la recherche translationnelle. En effet, en utilisant une partie de la rétine humaine (enlevée suite à une rétinectomie ou rétinotomie), on peut observer les interactions entre les cellules rétiniennes, et reproduire précisément les réponses *in-vivo* chez l'humain (Murali *et al.*, 2019).

Pour terminer, l'objectif principal de cette thèse a visé à mieux comprendre l'implication et le mécanisme d'action du B1R dans le stade précoce de la RD qui demeure toujours non traitable. Il serait également utile d'évaluer un autre modèle de rat diabétique dans les stades tardifs de la RD. La néovascularisation intra-rétinienne et intravitréenne est le phénotype qui marque le plus le stade tardif de la RD. Toutefois, une étude publiée récemment par notre équipe chez le rat diabétique-STZ de six mois n'a montré aucune néovascularisation (Hachana *et al.*, 2018). Ceci signifie que la néovascularisation devra être étudiée chez un modèle de diabète autre que celui induit par la STZ (exemple : diabète de type 2) ou encore dans la rétinopathie induite par l'oxygène, appelée rétinopathie ischémique. Ces modèles peuvent être utilisés pour comprendre les stades tardifs de la RD (Sennlaub *et al.*, 2001, 2002). En se basant sur une étude précédente de notre

équipe, on pourrait prédire un effet positif de l'antagoniste du B1R sur la néovascularisation intra-rétinienne et intra-vitréenne. En effet, l'application en gouttes oculaires d'un antagoniste du B1R, R-954, diminue la néovascularisation choroïdienne induite par le laser chez le rat (Hachana *et al.*, 2020a). Ainsi, l'antagoniste du B1R devrait inhiber la néovascularisation au niveau rétinien dans la RD, toutefois cette hypothèse demeure à vérifier.

Par ailleurs, la iNOS est connue comme enzyme à la fois pro- et anti-angiogénique. Dans un modèle de rétinopathie induite par l'oxygène, la délétion génétique ou l'inhibition de la iNOS avec le 1400W a inhibé la néovascularisation pathologique et stimulé la néovascularisation physiologique (Sennlaub *et al.*, 2001, 2002). L'implication de la iNOS dans la néovascularisation a été également longuement étudiée dans plusieurs types de cancer. En effet, le NO peut induire les facteurs angiogéniques tels que le VEGF et ainsi promouvoir l'angiogenèse (Vannini *et al.*, 2015). Basé sur nos résultats appuyant l'implication du B1R en amont de la iNOS, on peut prédire une inhibition de la néovascularisation pathologique par une inhibition de la iNOS, toutefois cette hypothèse reste à valider. Il serait alors intéressant d'évaluer la néovascularisation dans la rétine des souris diabétiques invalidées conditionnellement pour la iNOS avec ou sans stimulation avec un agoniste du B1R.

Les effets bénéfiques de l'inhibition de la iNOS ont été montrés dans plusieurs pathologies notamment, l'athérosclérose, les maladies cardiovasculaires (Lind *et al.*, 2017), le cancer (Lechner *et al.*, 2005), le choc septique et les maladies neurologiques et neurodégénératives (Cinelli *et al.*, 2020). La iNOS est impliquée également dans la régulation de l'expression des gènes liés à l'inflammation, à l'infection et à l'apoptose (Zamora *et al.*, 2002), ainsi il est concevable que les maladies inflammatoires pourraient bénéficier de cette approche thérapeutique notamment la RD. L'inhibition de la iNOS dans la RD a inhibé le développement des lésions microvasculaires chez le rat, le chien et les souris diabétiques (Zheng et Kern, 2009). De plus, son inhibition ou sa délétion génique a prévenu les altérations structurelles (y compris la dégénérescence capillaire) et fonctionnelles (l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la diminution de l'expression des jonctions serrées), la leucostasie et l'amincissement de la rétine induits par le diabète dans la rétine de la souris (Leal *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010). Dans un modèle d'hypoxie rétinienne induit par le chlorure de cobalt II (CoCl<sub>2</sub>) in-vitro, la perte des cellules ganglionnaires, des cellules bipolaires ainsi que la surexpression du facteur HIF-1 $\alpha$  ont été renversées dans les

rétines porcine traitées par le 1400W in-vitro (Hurst *et al.*, 2020). Ainsi, l'inhibition de l'axe B1R-iNOS dans la RD représente une cible thérapeutique prometteuse.

#### 4.9.2. **Projet de la DMLA**

Dans un modèle de néovascularisation choroïdienne, la taille de la néovascularisation et l'expression des médiateurs inflammatoires (B1R, B2R, IL-1 $\beta$ , COX-2, TNF $\alpha$  et ICAM-1) sont diminuées par l'application topique de l'antagoniste du B1R (Hachana *et al.*, 2020a). Par contre, les anti-VEGF agissent sur des médiateurs inflammatoires différents de ceux affectés par l'antagoniste du B1R (TNF $\alpha$ , CCL2, VCAM-1, ICAM-1, HIF-1 $\alpha$ , VEGF-A, et VEGFR-2) et diminuent davantage la néovascularisation. Ainsi, le B1R serait impliqué dans la néovascularisation choroïdienne via une voie indépendante de l'axe VEGF-A/VEGFR-2. Comme perspective à ce projet, il serait intéressant de comparer l'effet d'une monothérapie utilisant soit un antagoniste du B1R ou soit un anti-VEGF-A avec l'effet d'une bithérapie (antagoniste du B1R + anti-VEGF-A). Une combinaison des deux inhibiteurs pourrait avoir des effets additifs ou synergiques, et diminuer davantage la réponse inflammatoire et la néovascularisation. Au niveau clinique, cette stratégie pourrait diminuer le nombre d'injections intravitréennes des anti-VEGF et/ou la dose administrée. Ceci pourrait alors préserver la fonction physiologie de ce facteur de croissance sur les cellules vasculaires et neuronales. Dans cette étude comparative entre la mono- et la bithérapie, il serait opportun d'ajouter les tests d'évaluation de l'activité électrophysiologique de la rétine par ERG et le test comportemental d'acuité visuelle. De plus, une transition entre les modèles de rongeur et l'humain serait également appropriée pour étudier le B1R dans la DMLA. Cela peut être réalisé en utilisant un modèle de primate 'non-humain' pour effectuer une CNV au laser, l'œil du singe se rapproche davantage de celui de l'homme.

Dans notre deuxième article, nous avons montré que les rétines humaines atteintes de DMLA atrophique expriment très faiblement le B1R. Les experts considèrent les deux formes de DMLA comme deux entités différentes. Néanmoins, il n'est pas clair si la DMLA atrophique peut progresser en DMLA exsudative. En effet, de l'atrophie géographique a été observée chez certains patients ayant la DMLA exsudative (Kaszubski *et al.*, 2016; Gemenetzi *et al.*, 2017). Les lésions atrophiques pourraient être une conséquence des injections intravitréennes, toutefois l'atrophie géographique est également observée chez des patients qui n'ont pas reçu de traitement. Dans ce contexte, deux hypothèses ont été émises; la première propose une progression de la DMLA

atrophique qui a progressé en DMLA exsudative, alors que la deuxième attribue la présence des lésions atrophiques à la néovascularisation choroïdienne qui peut endommager le tissu (Kaszubski *et al.*, 2016; Gemenetzi *et al.*, 2017). Le deuxième article de cette thèse montre une faible augmentation du B1R dans la DMLA atrophique qui est exacerbée dans la DMLA exsudative. Ainsi, il serait utile de tester dans un modèle de DMLA atrophique chez le rat, si l'activation du B1R avec un agoniste peut faire progresser la pathologie en DMLA exsudative.

Pour terminer, nos données montrent une très forte expression du B1R dans la DMLA exsudative chez l'humain. De plus, les récentes études pré-cliniques de notre laboratoire montrent que l'inhibition du B1R réduit la taille de la CNV. Notre étude montre une co-localisation du B1R avec la iNOS (ce que nous avons également observé dans la RD). Ainsi, et tel que proposé dans le modèle de RD une identification du type cellulaire sur lequel ces deux protéines sont exprimées et une invalidation conditionnelle pour la iNOS dans un modèle de souris CNV (induit par le laser) nous aiderait à mieux comprendre l'implication du B1R et de la iNOS dans la pathogenèse (le processus inflammatoire et la néovascularisation) de la DMLA.

#### **4.10. Dénominateur commun entre la rétinopathie diabétique et la DMLA et innovation du traitement oculaire**

L'activation du récepteur B1R est liée à la neuroinflammation et à la dégradation de la barrière hémato-encéphalique dans plusieurs pathologies neurodégénératives (Qadri et Bader, 2018; Mugisho *et al.*, 2019). Son activation dans la rétine, une partie intégrante du cerveau, participe aussi à l'inflammation et à l'ouverture de la BHR (Pouliot *et al.*, 2012; Hachana *et al.*, 2018). Les travaux réalisés dans cette thèse portent sur deux pathologies rétinienne qui sont déclenchées par des mécanismes différents, mais qui partagent quelques traits en commun dont le plus important est la cible thérapeutique. La RD et la DMLA exsudative sont souvent traitées par des injections intravitréennes d'anti-VEGF dans le but de diminuer la néovascularisation. Mes données ainsi que les données de notre équipe suggèrent fortement l'implication du B1R dans l'inflammation et la néovascularisation rétinienne dans ces deux pathologies. Par conséquent, le B1R peut représenter une cible thérapeutique commune de ces deux maladies rétinienne, la RD et la DMLA exsudative.

En ce qui concerne l'autre pathologie abordée dans cette thèse, la DMLA atrophique, une augmentation non significative du B1R est observée dans les coupes histologiques de rétine.

Toutefois, pour avoir plus de cohérence dans les résultats, il serait pertinent d'augmenter le nombre de patients par groupe, surtout que nous ignorons l'historique médical des patients. Un traitement efficace de la DMLA atrophique est toujours à l'étude et plusieurs essais cliniques ont utilisé le système du complément comme cible thérapeutique (Ambati *et al.*, 2013; Boyer, 2019). En effet, l'activation du complément C3 (a et b) et C5 (a et b) dans la DMLA atrophique est rapportée dans plusieurs études avec des modèles animaux et chez l'humain (Ambati *et al.*, 2013). Fait intéressant, l'inhibiteur du complément C3 (Pegcetacoplan) diminue la progression de l'atrophie géographique dans la phase II d'un essai clinique (Boyer, 2019). Il convient de noter que le SKK interagit également avec le système du complément, où le FXII (activateur de la kallikréine plasmatique) active les compléments C3 (a et b) et C5 (a et b). Ainsi, une investigation de l'interaction du SKK avec le système du complément dans la DMLA atrophique serait très pertinente.

Comme dernier élément, l'évolution des traitements à l'égard des pathologies oculaires vise une meilleure efficacité et une approche moins invasive. Dans ce contexte, plusieurs essais cliniques se sont penchés sur le remplacement des traitements actuels invasifs (injections intravitréennes) par l'application de gouttes topiques à la surface de la cornée. Par exemple, dans une phase II et III d'une étude clinique chez des patients diabétiques de type 2, l'application topique de la Brimonidine (antagoniste du récepteur  $\alpha$ -2 adrénergique) et de la Somatostatine (inhibiteur de l'hormone de croissance) avait des effets bénéfiques sur les stades précoces de la RD (Grauslund *et al.*, 2019). Il convient de noter que plusieurs études effectuées dans des modèles animaux ont mis en évidence les effets bénéfiques des gouttes topiques de la somatostatine sur la RD, en améliorant la fonction visuelle et en diminuant l'activation gliale et l'apoptose (Hernandez *et al.*, 2013). Par ailleurs, dans une autre étude clinique, l'application de gouttes topiques de dexaméthasone-cyclodextrine (corticostéroïde) a montré une efficacité dans le traitement de l'œdème maculaire diabétique qui se manifeste par une diminution de l'épaississement de la macula et par une amélioration de l'acuité visuelle (Tanito *et al.*, 2011). Des gouttes topiques de Nepafenac 0.3% (anti-inflammatoire non stéroïdien) ont diminué le risque de développer un œdème maculaire secondaire à la chirurgie des cataractes chez les patients ayant une RD (Singh *et al.*, 2017). Bien que la perméabilité membranaire soit un obstacle dans l'évolution de cette stratégie, l'administration des traitements par voie topique constitue une stratégie thérapeutique à grand intérêt pour traiter les pathologies oculaires. Nous avons exploité et validé cette approche avec un antagoniste du B1R.

#### 4.11. Conclusion

Nos résultats ont permis de mieux comprendre le rôle pathophysiologique et le mécanisme d'action du B1R dans la rétinopathie diabétique. Nous avons, entre autres, mis en évidence une nouvelle voie d'intervention du B1R dans le processus inflammatoire et dans les altérations vasculaires, et cela via l'activation de la iNOS. Ainsi, en activant la iNOS et en augmentant son expression, le B1R augmente la formation du peroxy-nitrite qui contribue à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, responsable de la transcription de plusieurs gènes codants pour des immunomodulateurs, incluant le B1R. Cette boucle de rétroactivation positive déclenchée par le B1R peut par ailleurs être enrayée par l'inhibition de la iNOS. Mieux connaître la signalisation du B1R dans la RD permet de faire progresser le développement de nouvelles thérapies pour le traitement de la RD. De plus, notre étude sur les rétines humaines atteintes de DMLA montre pour la première fois une expression du B1R dans cette pathologie, et pointe vers une implication de ce récepteur dans la DMLA humaine. Conséquemment, le B1R représente une cible thérapeutique prometteuse et potentielle dans le traitement des pathologies oculaires associées à l'inflammation et aux altérations vasculaires telles que la DMLA et la rétinopathie diabétique.

## Chapitre 5 **Références bibliographiques**



- Abdouh, M., Khanjari, A., Abdelazziz, N., Ongali, B., Couture, R. et Hassessian, H. M. (2003). Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *British Journal of Pharmacology*, 140(1), 33-40. doi: 10.1038/sj.bjp.0705210
- Abdouh, M., Talbot, S., Couture, R. et Hassessian, H. M. (2008). Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *British Journal of Pharmacology*, 154(1), 136-143. doi: 10.1038/bjp.2008.48
- Abu El-Asrar, A. M., Desmet, S., Meersschaert, A., Dralands, L., Missotten, L. et Geboes, K. (2001). Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the retinas of human subjects with diabetes mellitus. *American Journal of Ophthalmology*, 132(4), 551-556.
- Abu El-Asrar, A. M., Meersschaert, A., Dralands, L., Missotten, L. et Geboes, K. (2004). Inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor are colocalized in the retinas of human subjects with diabetes. *Eye (London, England)*, 18(3), 306-313. doi: 10.1038/sj.eye.6700642
- Afonina, I. S., Muller, C., Martin, S. J. et Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. *Immunity*, 42(6), 991-1004. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.003
- Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., et al. (1994). Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *New England Journal of Medicine*, 331(22), 1480-1487. doi: 10.1056/NEJM199412013312203
- Aiello, L. P., Northrup, J. M., Keyt, B. A., Takagi, H. et Iwamoto, M. A. (1995). Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Archives of Ophthalmology*, 113(12), 1538-1544. doi: 10.1001/archophth.1995.01100120068012
- Aiello, L. P., Vignati, L., Sheetz, M. J., Zhi, X., Girach, A., Davis, M. D., Wolka, A. M., Shahri, N., et al. (2011). Oral protein kinase c beta inhibition using ruboxistaurin: efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the Protein Kinase C beta Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study and the Protein Kinase C beta Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study 2. *Retina*, 31(10), 2084-2094. doi: 10.1097/IAE.0b013e3182111669
- Al-Shabrawey, M., Bartoli, M., El-Remessy, A. B., Ma, G., Matragoon, S., Lemtalsi, T., Caldwell, R. W. et Caldwell, R. B. (2008a). Role of NADPH oxidase and Stat3 in statin-mediated protection against diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(7), 3231-3238. doi: 10.1167/iovs.08-1754
- Al-Shabrawey, M., Rojas, M., Sanders, T., Behzadian, A., El-Remessy, A., Bartoli, M., Parpia, A. K., Liou, G. et Caldwell, R. B. (2008b). Role of NADPH oxidase in retinal vascular inflammation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(7), 3239-3244. doi: 10.1167/iovs.08-1755
- Albert-Weissenberger, C., Stetter, C., Meuth, S. G., Gobel, K., Bader, M., Siren, A. L. et Kleinschnitz, C. (2012). Blocking of bradykinin receptor B1 protects from focal closed head injury in mice by reducing axonal damage and astroglia activation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32(9), 1747-1756. doi: 10.1038/jcbfm.2012.62
- Amadio, M., Govoni, S. et Pascale, A. (2016). Targeting VEGF in eye neovascularization: What's new?: A comprehensive review on current therapies and oligonucleotide-based interventions under development. *Pharmacological Research*, 103, 253-269. doi: 10.1016/j.phrs.2015.11.027

- Ambati, J., Atkinson, J. P. et Gelfand, B. D. (2013). Immunology of age-related macular degeneration. *Nature Reviews: Immunology*, 13(6), 438-451. doi: 10.1038/nri3459
- American Diabetes Association: clinical practice recommendations 1997. (1997). *Diabetes Care*, 20 Suppl 1, S1-70.
- Anderson, A. A., Ushakov, D. S., Ferenczi, M. A., Mori, R., Martin, P. et Saffell, J. L. (2008). Morphoregulation by acetylcholinesterase in fibroblasts and astrocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 215(1), 82-100. doi: 10.1002/jcp.21288
- Ando, A., Yang, A., Mori, K., Yamada, H., Yamada, E., Takahashi, K., Saikia, J., Kim, M., et al. (2002). Nitric oxide is proangiogenic in the retina and choroid. *Journal of Cellular Physiology*, 191(1), 116-124. doi: 10.1002/jcp.10083
- Antonetti, D. A., Klein, R. et Gardner, T. W. (2012). Diabetic retinopathy. *New England Journal of Medicine*, 366(13), 1227-1239. doi: 10.1056/NEJMra1005073
- Antonetti, D. A., Lieth, E., Barber, A. J. et Gardner, T. W. (1999). Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy. *Seminars in Ophthalmology*, 14(4), 240-248. doi: 10.3109/08820539909069543
- Ardeljan, D. et Chan, C. C. (2013). Aging is not a disease: distinguishing age-related macular degeneration from aging. *Progress in Retinal and Eye Research*, 37, 68-89. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.07.003
- Argon laser photocoagulation for neovascular maculopathy. Three-year results from randomized clinical trials. Macular Photocoagulation Study Group. (1986). *Archives of Ophthalmology*, 104(5), 694-701.
- Asraf, K., Torika, N., Danon, A. et Fleisher-Berkovich, S. (2017). Involvement of the Bradykinin B1 Receptor in Microglial Activation: In Vitro and In Vivo Studies. *Frontiers in Endocrinology*, 8, 82. doi: 10.3389/fendo.2017.00082
- Austin, C. E., Faussner, A., Robinson, H. E., Chakravarty, S., Kyle, D. J., Bathon, J. M. et Proud, D. (1997). Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. *Journal of Biological Chemistry*, 272(17), 11420-11425. doi: 10.1074/jbc.272.17.11420
- Avogaro, A. et Fadini, G. P. (2019). Microvascular complications in diabetes: A growing concern for cardiologists. *International Journal of Cardiology*, 291, 29-35. doi: 10.1016/j.ijcard.2019.02.030
- Balda, M. S. et Matter, K. (2016). Tight junctions as regulators of tissue remodelling. *Current Opinion in Cell Biology*, 42, 94-101. doi: 10.1016/j.ceb.2016.05.006
- Balser, C., Wolf, A., Herb, M. et Langmann, T. (2019). Co-inhibition of PGF and VEGF blocks their expression in mononuclear phagocytes and limits neovascularization and leakage in the murine retina. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 26. doi: 10.1186/s12974-019-1419-2
- Barres, B. A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 60(3), 430-440. doi: 10.1016/j.neuron.2008.10.013
- Bascands, J. L., Schanstra, J. P., Couture, R. et Girolami, J. P. (2003). [Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles]. *Médecine Sciences*, 19(11), 1093-1100. doi: 10.1051/medsci/200319111093
- Bastian, S., Loillier, B., Paquet, J. L. et Pruneau, D. (1997). Stable expression of human kinin B1 receptor in 293 cells: pharmacological and functional characterization. *British Journal of Pharmacology*, 122(2), 393-399. doi: 10.1038/sj.bjp.0701380
- Bathon, J. M., Manning, D. C., Goldman, D. W., Towns, M. C. et Proud, D. (1992). Characterization of kinin receptors on human synovial cells and upregulation of receptor

- number by interleukin-1. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 260(1), 384-392.
- Bazzoni, G. et Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological Reviews*, 84(3), 869-901. doi: 10.1152/physrev.00035.2003
- Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D. et Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Survey of Ophthalmology*, 45(2), 115-134. doi: 10.1016/s0039-6257(00)00140-5
- Beavers, C. J., Dunn, S. P. et Macaulay, T. E. (2011). The role of angiotensin receptor blockers in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. *Annals of Pharmacotherapy*, 45(4), 520-524. doi: 10.1345/aph.1P630
- Bela Anand-Apte, J. (2011). *Developmental anatomy of the retinal and choroidal vasculature*. Oxford: Academic Press.
- Bellver-Landete, V., Bretheau, F., Mailhot, B., Vallieres, N., Lessard, M., Janelle, M. E., Vernoux, N., Tremblay, M. E., et al. (2019). Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury. *Nat Commun*, 10(1), 518. doi: 10.1038/s41467-019-08446-0
- Berka, J. L., Stubbs, A. J., Wang, D. Z., DiNicolantonio, R., Alcorn, D., Campbell, D. J. et Skinner, S. L. (1995). Renin-containing Muller cells of the retina display endocrine features. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 36(7), 1450-1458.
- Bezalel, S., Mahlab-Guri, K., Asher, I., Werner, B. et Sthoeger, Z. M. (2015). Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. *American Journal of Medicine*, 128(2), 120-125. doi: 10.1016/j.amjmed.2014.07.011
- Bhat, M., Pouliot, M., Couture, R. et Vaucher, E. (2014). The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy. *Progress in Drug Research*, 69, 111-143.
- Bhutto, I. A., McLeod, D. S., Hasegawa, T., Kim, S. Y., Merges, C., Tong, P. et Luty, G. A. (2006). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 82(1), 99-110. doi: 10.1016/j.exer.2005.05.007
- Blais, C., Jr., Marceau, F., Rouleau, J. L. et Adam, A. (2000). The kallikrein-kininogen-kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides*, 21(12), 1903-1940. doi: 10.1016/s0196-9781(00)00348-x
- Blaukat, A., Herzer, K., Schroeder, C., Bachmann, M., Nash, N. et Muller-Esterl, W. (1999). Overexpression and functional characterization of kinin receptors reveal subtype-specific phosphorylation. *Biochemistry*, 38(4), 1300-1309. doi: 10.1021/bi981727r
- Bodeutsch, N. et Thanos, S. (2000). Migration of phagocytotic cells and development of the murine intraretinal microglial network: an in vivo study using fluorescent dyes. *Glia*, 32(1), 91-101. doi: 10.1002/1098-1136(200010)32:1<91::aid-glia90>3.0.co;2-x
- Bolinger, M. T. et Antonetti, D. A. (2016). Moving Past Anti-VEGF: Novel Therapies for Treating Diabetic Retinopathy. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). doi: 10.3390/ijms17091498
- Boyd, A., Casselini, C., Vinik, E. et Vinik, A. (2011). Quality of life and objective measures of diabetic neuropathy in a prospective placebo-controlled trial of ruboxistaurin and topiramate. *Journal of Diabetes Science and Technology*, 5(3), 714-722. doi: 10.1177/193229681100500326
- Boyer, D. S., ROSENFELD, P. J. (2019). New Pathways for Dry AMD Treatment. *Several potential therapies are in clinical trials*, 16(November/December 2019), 24, 25.

- Boyer, D. S., Schmidt-Erfurth, U., van Lookeren Campagne, M., Henry, E. C. et Brittain, C. (2017). The Pathophysiology of Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration and the Complement Pathway as a Therapeutic Target. *Retina*, 37(5), 819-835. doi: 10.1097/IAE.0000000000001392
- Brambilla, G., Carlo, P., Finollo, R. et Sciaba, L. (1987). Dose-response curves for liver DNA fragmentation induced in rats by sixteen N-nitroso compounds as measured by viscometric and alkaline elution analyses. *Cancer Research*, 47(13), 3485-3491.
- Bresnick, G. H. et Palta, M. (1987). Predicting progression to severe proliferative diabetic retinopathy. *Archives of Ophthalmology*, 105(6), 810-814. doi: 10.1001/archophth.1987.01060060096041
- Bressler, N. M., Beaulieu, W. T., Glassman, A. R., Blinder, K. J., Bressler, S. B., Jampol, L. M., Melia, M., Wells, J. A., 3rd et Diabetic Retinopathy Clinical Research, N. (2018). Persistent Macular Thickening Following Intravitreal Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Central-Involved Diabetic Macular Edema With Vision Impairment: A Secondary Analysis of a Randomized Clinical Trial. *JAMA Ophthalmol*, 136(3), 257-269. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2017.6565
- Bressler, N. M., Beck, R. W. et Ferris, F. L., 3rd. (2011). Panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. *New England Journal of Medicine*, 365(16), 1520-1526. doi: 10.1056/NEJMct0908432
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N. et Reichenbach, A. (2006). Muller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(4), 397-424. doi: 10.1016/j.preteyeres.2006.05.003
- Bringmann, A. et Reichenbach, A. (2001). Role of Muller cells in retinal degenerations. *Frontiers in Bioscience*, 6, E72-92. doi: 10.2741/bringman
- Brovkovich, V., Zhang, Y., Brovkovich, S., Minshall, R. D. et Skidgel, R. A. (2011). A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(2), 258-269. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00992.x
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414(6865), 813-820. doi: 10.1038/414813a
- Calippe, B., Augustin, S., Beguier, F., Charles-Messance, H., Poupel, L., Conart, J. B., Hu, S. J., Lavalette, S., et al. (2017). Complement Factor H Inhibits CD47-Mediated Resolution of Inflammation. *Immunity*, 46(2), 261-272. doi: 10.1016/j.immuni.2017.01.006
- Cameron, N. E., Gibson, T. M., Nangle, M. R. et Cotter, M. A. (2005). Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043, 784-792. doi: 10.1196/annals.1333.091
- Campos, M. M., Ongali, B., De Souza Buck, H., Schanstra, J. P., Girolami, J. P., Chabot, J. G. et 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. doi: 10.1002/syn.20150
- Canto, A., Olivar, T., Romero, F. J. et Miranda, M. (2019). Nitrosative Stress in Retinal Pathologies: Review. *Antioxidants (Basel)*, 8(11). doi: 10.3390/antiox8110543
- Carr, B. C., Emigh, C. E., Bennett, L. D., Pansick, A. D., Birch, D. G. et Nguyen, C. (2017). TOWARDS A TREATMENT FOR DIABETIC RETINOPATHY: Intravitreal Toxicity and Preclinical Safety Evaluation of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors. *Retina*, 37(1), 22-31. doi: 10.1097/IAE.0000000000001133
- Catanzaro, O., Labal, E., Andornino, A., Capponi, J. A., Di Martino, I. et 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), 349-352. doi: 10.1016/j.peptides.2012.02.008
- Catanzaro, O. L., Capponi, J. A., Di Martino, I., Labal, E. S. et Sirois, P. (2017). Oxidative stress in the optic nerve and cortical visual area of streptozotocin-induced diabetic Wistar rats: Blockade with a selective bradykinin B1 receptor antagonist. *Neuropeptides*, 66, 97-102. doi: 10.1016/j.npep.2017.10.003
- Catanzaro, O. L., Dziubecki, D., Obregon, P., Rodriguez, R. R. et Sirois, P. (2010). Antidiabetic efficacy of bradykinin antagonist R-954 on glucose tolerance test in diabetic type 1 mice. *Neuropeptides*, 44(2), 187-189. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.010
- Cernit, V., Senecal, J., Othman, R. et Couture, R. (2020). Reciprocal Regulatory Interaction between TRPV1 and Kinin B1 Receptor in a Rat Neuropathic Pain Model. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(3). doi: 10.3390/ijms21030821
- Chai, K. X., Ni, A., Wang, D., Ward, D. C., Chao, J. et Chao, L. (1996). Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene BDKRB1. *Genomics*, 31(1), 51-57. doi: 10.1006/geno.1996.0008
- Chan, C. K., Pham, L. N., Zhou, J., Spee, C., Ryan, S. J. et Hinton, D. R. (2005). Differential expression of pro- and antiangiogenic factors in mouse strain-dependent hypoxia-induced retinal neovascularization. *Laboratory Investigation*, 85(6), 721-733. doi: 10.1038/labinvest.3700277
- Chatziralli, I., Sergentanis, T. N., Crosby-Nwaobi, R., Winkley, K., Eleftheriadis, H., Ismail, K., Amiel, S. A. et Sivaprasad, S. (2017). Model for Risk-Based Screening of Diabetic Retinopathy in People With Newly-Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(6), BIO99-BIO105. doi: 10.1167/iovs.17-21713
- Chen, J., Liu, C.-H. et Sapielha, P. (2016). Retinal Vascular Development. Dans A. Stahl (dir.), *Anti-Angiogenic Therapy in Ophthalmology* (p. 1-19). Cham: Springer International Publishing.
- Chen, M., Luo, C., Zhao, J., Devarajan, G. et Xu, H. (2019). Immune regulation in the aging retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 69, 159-172. doi: 10.1016/j.preteyeres.2018.10.003
- Cherepanoff, S., McMenamin, P., Gillies, M. C., Kettle, E. et Sarks, S. H. (2010). Bruch's membrane and choroidal macrophages in early and advanced age-related macular degeneration. *British Journal of Ophthalmology*, 94(7), 918-925. doi: 10.1136/bjo.2009.165563
- Choudhary, R., Kapoor, M. S., Singh, A. et Bodakhe, S. H. (2017). Therapeutic targets of renin-angiotensin system in ocular disorders. *J Curr Ophthalmol*, 29(1), 7-16. doi: 10.1016/j.joco.2016.09.009
- Chow, B. W. et Gu, C. (2017). Gradual Suppression of Transcytosis Governs Functional Blood-Retinal Barrier Formation. *Neuron*, 93(6), 1325-1333 e1323. doi: 10.1016/j.neuron.2017.02.043
- Christiansen, S. C., Eddleston, J., Woessner, K. M., Chambers, S. S., Ye, R., Pan, Z. K. et Zuraw, B. L. (2002). Up-regulation of functional kinin B1 receptors in allergic airway inflammation. *Journal of Immunology*, 169(4), 2054-2060. doi: 10.4049/jimmunol.169.4.2054
- Cinelli, M. A., Do, H. T., Miley, G. P. et Silverman, R. B. (2020). Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Medicinal Research Reviews*, 40(1), 158-189. doi: 10.1002/med.21599
- Clark, B. D., Collins, K. L., Gandy, M. S., Webb, A. C. et Auron, P. E. (1986). Genomic sequence for human interleukin 1 beta: possible evolution from a reverse transcribed

- prointerleukin 1 alpha gene. *Nucleic Acids Research*, 14(20), 7897-7914. doi: 10.1093/nar/14.20.7897
- Clermont, A., Chilcote, T. J., Kita, T., Liu, J., Riva, P., Sinha, S. et Feener, E. P. (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., Evans, D. M., Aiello, L. P. et Feener, E. P. (2016). Plasma Kallikrein Mediates Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Retinal Dysfunction and Thickening. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(6), 2390-2399. doi: 10.1167/iovs.15-18272
- Colman, R. W., Pixley, R. A., Sainz, I. M., Song, J. S., Isordia-Salas, I., Muhamed, S. N., Powell, J. A., Jr. et Mousa, S. A. (2003). Inhibition of angiogenesis by antibody blocking the action of proangiogenic high-molecular-weight kininogen. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(1), 164-170. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00025.x
- Combadiere, C., Feumi, C., Raoul, W., Keller, N., Rodero, M., Pezard, A., Lavalette, S., Houssier, M., et al. (2007). CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *Journal of Clinical Investigation*, 117(10), 2920-2928. doi: 10.1172/JCI31692
- Coorey, N. J., Shen, W., Chung, S. H., Zhu, L. et Gillies, M. C. (2012). The role of glia in retinal vascular disease. *Clinical & Experimental Optometry*, 95(3), 266-281. doi: 10.1111/j.1444-0938.2012.00741.x
- Coughlan, M. T., Thorburn, D. R., Penfold, S. A., Laskowski, A., Harcourt, B. E., Sourris, K. C., Tan, A. L., Fukami, K., et al. (2009). RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20(4), 742-752. doi: 10.1681/ASN.2008050514
- Couture, R., Blaes, N. et Girolami, J. P. (2014). Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Current Vascular Pharmacology*, 12(2), 223-248.
- Couture, R. et Girolami, J. P. (2004). Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *European Journal of Pharmacology*, 500(1-3), 467-485. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.045
- Couture, R., Harriison, M., Vianna, R. M. et Cloutier, F. (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *European Journal of Pharmacology*, 429(1-3), 161-176.
- Couture, R., Mizrahi, J., Regoli, D. et Devroede, G. (1981). Peptides and the human colon: an in vitro pharmacological study. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 59(9), 957-964.
- Crabb, J. W., Miyagi, M., Gu, X., Shadrach, K., West, K. A., Sakaguchi, H., Kamei, M., Hasan, A., et al. (2002). Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(23), 14682-14687. doi: 10.1073/pnas.222551899
- Cuenca, N., Fernandez-Sanchez, L., Campello, L., Maneu, V., De la Villa, P., Lax, P. et Pinilla, I. (2014). Cellular responses following retinal injuries and therapeutic approaches for neurodegenerative diseases. *Progress in Retinal and Eye Research*, 43, 17-75. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.07.001
- Cunha-Vaz, J. G., Shakib, M. et Ashton, N. (1966). Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. I. On the existence, development, and site of a blood-retinal barrier. *British Journal of Ophthalmology*, 50(8), 441-453. doi: 10.1136/bjo.50.8.441
- Cunha, T. M., Verri, W. A., Jr., Fukada, S. Y., Guerrero, A. T., Santodomingo-Garzon, T., Poole, S., Parada, C. A., Ferreira, S. H. et Cunha, F. Q. (2007). TNF-alpha and IL-1beta mediate

- inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. *European Journal of Pharmacology*, 573(1-3), 221-229. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.07.007
- Cunningham, F., Van Bergen, T., Canning, P., Lengyel, I., Feyen, J. H. M. et Stitt, A. W. (2019). The Placental Growth Factor Pathway and Its Potential Role in Macular Degenerative Disease. *Current Eye Research*, 44(8), 813-822. doi: 10.1080/02713683.2019.1614197
- da Costa, P. L. N., Wynne, D., Fifis, T., Nguyen, L., Perini, M. et Christophi, C. (2018). The kallikrein-Kinin system modulates the progression of colorectal liver metastases in a mouse model. *BMC Cancer*, 18(1), 382. doi: 10.1186/s12885-018-4260-6
- Danaei, G., Finucane, M. M., Lu, Y., Singh, G. M., Cowan, M. J., Paciorek, C. J., Lin, J. K., Farzadfar, F., et al. (2011). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, 378(9785), 31-40. doi: 10.1016/S0140-6736(11)60679-X
- Danser, A. H., Derkx, F. H., Admiraal, P. J., Deinum, J., de Jong, P. T. et Schalekamp, M. A. (1994). Angiotensin levels in the eye. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 35(3), 1008-1018.
- Danser, A. H., van den Dorpel, M. A., Deinum, J., Derkx, F. H., Franken, A. A., Peperkamp, E., de Jong, P. T. et Schalekamp, M. A. (1989). Renin, prorenin, and immunoreactive renin in vitreous fluid from eyes with and without diabetic retinopathy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 68(1), 160-167. doi: 10.1210/jcem-68-1-160
- Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L. et Handa, J. T. (2017). The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Progress in Retinal and Eye Research*, 60, 201-218. doi: 10.1016/j.preteyeres.2017.03.002
- Davies, J. L., Kawaguchi, Y., Bennett, S. T., Copeman, J. B., Cordell, H. J., Pritchard, L. E., Reed, P. W., Gough, S. C., et al. (1994). A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*, 371(6493), 130-136. doi: 10.1038/371130a0
- Davis, M. D., Sheetz, M. J., Aiello, L. P., Milton, R. C., Danis, R. P., Zhi, X., Girach, A., Jimenez, M. C., et al. (2009). Effect of ruboxistaurin on the visual acuity decline associated with long-standing diabetic macular edema. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50(1), 1-4. doi: 10.1167/iovs.08-2473
- de Hoz, R., Rojas, B., Ramirez, A. I., Salazar, J. J., Gallego, B. I., Trivino, A. et Ramirez, J. M. (2016). Retinal Macrogial Responses in Health and Disease. *Biomed Res Int*, 2016, 2954721. doi: 10.1155/2016/2954721
- deBlois, D. et Horlick, R. A. (2001). Endotoxin sensitization to kinin B(1) receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects. *British Journal of Pharmacology*, 132(1), 327-335. doi: 10.1038/sj.bjp.0703748
- Desposito, D., Potier, L., Chollet, C., Gobeil, F., Jr., Roussel, R., Alhenc-Gelas, F., Bouby, N. et Waeckel, L. (2015). Kinin receptor agonism restores hindlimb postischemic neovascularization capacity in diabetic mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 352(2), 218-226. doi: 10.1124/jpet.114.219196
- Di Marco, S., Carnicelli, V., Franceschini, N., Di Paolo, M., Piccardi, M., Bisti, S. et Falsini, B. (2019). Saffron: A Multitask Neuroprotective Agent for Retinal Degenerative Diseases. *Antioxidants (Basel)*, 8(7). doi: 10.3390/antiox8070224
- Dias, J. P. et Couture, R. (2012a). Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 14(3), 244-253. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01521.x

- Dias, J. P. et Couture, R. (2012b). Suppression of vascular inflammation by kinin B1 receptor antagonism in a rat model of insulin resistance. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 60(1), 61-69. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182576277
- Dias, J. P., Talbot, S., Senecal, J., Carayon, P. et 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. doi: 10.1371/journal.pone.0012622
- Diaz-Coranguez, M., Ramos, C. et Antonetti, D. A. (2017). The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Research*, 139, 123-137. doi: 10.1016/j.visres.2017.05.009
- Dinarello, C. A. (2011). Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*, 117(14), 3720-3732. doi: 10.1182/blood-2010-07-273417
- Dinarello, C. A. (2018). Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological Reviews*, 281(1), 8-27. doi: 10.1111/imr.12621
- Ding, X., Patel, M. et Chan, C. C. (2009). Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 28(1), 1-18. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.10.001
- Dlamini, Z. et Bhoola, K. D. (2005). Upregulation of tissue kallikrein, kinin B1 receptor, and kinin B2 receptor in mast and giant cells infiltrating oesophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*, 58(9), 915-922. doi: 10.1136/jcp.2004.021444
- Drel, V. R., Pacher, P., Stavniichuk, R., Xu, W., Zhang, J., Kuchmerovska, T. M., Slusher, B. et Obrosova, I. G. (2011). Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition counteracts renal hypertrophy and multiple manifestations of peripheral neuropathy in diabetic Akita mice. *International Journal of Molecular Medicine*, 28(4), 629-635. doi: 10.3892/ijmm.2011.709
- Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J. et Brownlee, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12222-12226. doi: 10.1073/pnas.97.22.12222
- Du, Y., Smith, M. A., Miller, C. M. et Kern, T. S. (2002). Diabetes-induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *Journal of Neurochemistry*, 80(5), 771-779. doi: 10.1046/j.0022-3042.2001.00737.x
- Ebrahimian, T. G., Tamarat, R., Clergue, M., Duriez, M., Levy, B. I. et Silvestre, J. S. (2005). Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(1), 65-70. doi: 10.1161/01.ATV.0000149377.90852.d8
- El-Remessy, A. B., Abou-Mohamed, G., Caldwell, R. W. et Caldwell, R. B. (2003a). High glucose-induced tyrosine nitration in endothelial cells: role of eNOS uncoupling and aldose reductase activation. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(7), 3135-3143. doi: 10.1167/iovs.02-1022
- El-Remessy, A. B., Al-Shabrawey, M., Khalifa, Y., Tsai, N. T., Caldwell, R. B. et Liou, G. I. (2006). Neuroprotective and blood-retinal barrier-preserving effects of cannabidiol in experimental diabetes. *American Journal of Pathology*, 168(1), 235-244. doi: 10.2353/ajpath.2006.050500
- el-Remessy, A. B., Bartoli, M., Platt, D. H., Fulton, D. et Caldwell, R. B. (2005). Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 1), 243-252. doi: 10.1242/jcs.01612
- El-Remessy, A. B., Behzadian, M. A., Abou-Mohamed, G., Franklin, T., Caldwell, R. W. et Caldwell, R. B. (2003b). Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular



- endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor. *American Journal of Pathology*, 162(6), 1995-2004. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64332-5
- El Midaoui, A., Haddad, Y., Filali-Zegzouti, Y. et Couture, R. (2017). Argan Oil as an Effective Nutri-Therapeutic Agent in Metabolic Syndrome: A Preclinical Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11). doi: 10.3390/ijms18112492
- Ellis, E. A., Guberski, D. L., Hutson, B. et Grant, M. B. (2002). Time course of NADH oxidase, inducible nitric oxide synthase and peroxynitrite in diabetic retinopathy in the BBZ/WOR rat. *Nitric Oxide*, 6(3), 295-304. doi: 10.1006/niox.2001.0419
- Elman, M. J., Bressler, N. M., Qin, H., Beck, R. W., Ferris, F. L., 3rd, Friedman, S. M., Glassman, A. R., Scott, I. U., et al. (2011). Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 118(4), 609-614. doi: 10.1016/j.ophtha.2010.12.033
- Emamaullee, J. A., Merani, S., Toso, C., Kin, T., Al-Saif, F., Truong, W., Pawlick, R., Davis, J., et al. (2009). Porcine marginal mass islet autografts resist metabolic failure over time and are enhanced by early treatment with liraglutide. *Endocrinology*, 150(5), 2145-2152. doi: 10.1210/en.2008-1116
- Emanuelli, C., Bonaria Salis, M., Stacca, T., Pintus, G., Kirchmair, R., Isner, J. M., Pinna, A., Gaspa, L., et al. (2002). Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation*, 105(3), 360-366. doi: 10.1161/hc0302.102142
- Ennis, S., Jomary, C., Mullins, R., Cree, A., Chen, X., Macleod, A., Jones, S., Collins, A., et al. (2008). Association between the SERPING1 gene and age-related macular degeneration: a two-stage case-control study. *Lancet*, 372(9652), 1828-1834. doi: 10.1016/S0140-6736(08)61348-3
- Eshaq, R. S., Aldalati, A. M. Z., Alexander, J. S. et Harris, N. R. (2017). Diabetic retinopathy: Breaking the barrier. *Pathophysiology*, 24(4), 229-241. doi: 10.1016/j.pathophys.2017.07.001
- Feener, E. P. (2010). Plasma kallikrein and diabetic macular edema. *Current Diabetes Reports*, 10(4), 270-275. doi: 10.1007/s11892-010-0127-1
- Fernandes, A., Miller-Fleming, L. et Pais, T. F. (2014). Microglia and inflammation: conspiracy, controversy or control? *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(20), 3969-3985. doi: 10.1007/s00018-014-1670-8
- Fernandes, L., Ceravolo, G. S., Fortes, Z. B., Tostes, R., Santos, R. A., Santos, J. A., Mori, M. A., Pesquero, J. B. et de Carvalho, M. H. (2006). Modulation of kinin B1 receptor expression by endogenous angiotensin II in hypertensive rats. *Regulatory Peptides*, 136(1-3), 92-97. doi: 10.1016/j.regpep.2006.04.018
- Ferrara, N. (2002). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Seminars in Oncology*, 29(6 Suppl 16), 10-14. doi: 10.1053/sonc.2002.37264
- Fiacco, T. A., Agulhon, C. et McCarthy, K. D. (2009). Sorting out astrocyte physiology from pharmacology. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 49, 151-174. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145602
- Figueroa-Romero, C., Sadidi, M. et Feldman, E. L. (2008). Mechanisms of disease: the oxidative stress theory of diabetic neuropathy. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 9(4), 301-314. doi: 10.1007/s11154-008-9104-2
- Fisher, S. J., Shi, Z. Q., Lickley, H. L., Efendic, S., Vranic, M. et Giacca, A. (2001). Low-dose IGF-I has no selective advantage over insulin in regulating glucose metabolism in hyperglycemic depancreatized dogs. *Journal of Endocrinology*, 168(1), 49-58. doi: 10.1677/joe.0.1680049

- Fleckenstein, M., Mitchell, P., Freund, K. B., Sadda, S., Holz, F. G., Brittain, C., Henry, E. C. et Ferrara, D. (2018). The Progression of Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*, 125(3), 369-390. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.08.038
- Fogli, S., Del Re, M., Rofi, E., Posarelli, C., Figus, M. et Danesi, R. (2018). Clinical pharmacology of intravitreal anti-VEGF drugs. *Eye (London, England)*, 32(6), 1010-1020. doi: 10.1038/s41433-018-0021-7
- Fong, D. S., Girach, A. et Boney, A. (2007). Visual side effects of successful scatter laser photocoagulation surgery for proliferative diabetic retinopathy: a literature review. *Retina*, 27(7), 816-824. doi: 10.1097/IAE.0b013e318042d32c
- Forbes, J. M. et Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, 93(1), 137-188. doi: 10.1152/physrev.00045.2011
- Forstermann, U., Gath, I., Schwarz, P., Closs, E. I. et Kleinert, H. (1995). Isoforms of nitric oxide synthase. Properties, cellular distribution and expressional control. *Biochemical Pharmacology*, 50(9), 1321-1332. doi: 10.1016/0006-2952(95)00181-6
- Frank, R. N. (2004). Diabetic retinopathy. *New England Journal of Medicine*, 350(1), 48-58. doi: 10.1056/NEJMra021678
- Friedman, D. S., O'Colmain, B. J., Munoz, B., Tomany, S. C., McCarty, C., de Jong, P. T., Nemesure, B., Mitchell, P., et al. (2004). Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Archives of Ophthalmology*, 122(4), 564-572. doi: 10.1001/archophth.122.4.564
- Fukuhara, J., Noda, K., Murata, M., Namba, S., Kinoshita, S., Dong, Z., Ando, R., Lennikov, A., et al. (2013). Tissue kallikrein attenuates choroidal neovascularization via cleavage of vascular endothelial growth factor. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(1), 274-279. doi: 10.1167/iovs.12-10512
- Gabay, C., Lamacchia, C. et Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature Reviews: Rheumatology*, 6(4), 232-241. doi: 10.1038/nrrheum.2010.4
- Gabra, B. H., Couture, R. et Sirois, P. (2003). [Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]. *Médecine Sciences*, 19(11), 1101-1110. doi: 10.1051/medsci/200319111101
- Gao, B. B., Chen, X., Timothy, N., Aiello, L. P. et Feener, E. P. (2008). Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *Journal of Proteome Research*, 7(6), 2516-2525. doi: 10.1021/pr800112g
- Gao, B. B., Clermont, A., Rook, S., Fonda, S. J., Srinivasan, V. J., Wojtkowski, M., Fujimoto, J. G., Avery, R. L., et al. (2007). Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nature Medicine*, 13(2), 181-188. doi: 10.1038/nm1534
- Gao, G., Li, Y., Zhang, D., Gee, S., Crosson, C. et Ma, J. (2001). Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS Letters*, 489(2-3), 270-276. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02110-x
- Gao, G., Shao, C., Zhang, S. X., Dudley, A., Fant, J. et Ma, J. X. (2003). Kallikrein-binding protein inhibits retinal neovascularization and decreases vascular leakage. *Diabetologia*, 46(5), 689-698. doi: 10.1007/s00125-003-1085-9
- Gao, L. et Yu, D. M. (2008). Molecular mechanism of limbs' postischemic revascularization improved by perindopril in diabetic rats. *Chinese Medical Journal (Engl.)*, 121(21), 2129-2133.

- Gao, Y., Yu, T., Zhang, Y. et Dang, G. (2018). Anti-VEGF Monotherapy Versus Photodynamic Therapy and Anti-VEGF Combination Treatment for Neovascular Age-Related Macular Degeneration: A Meta-Analysis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 59(10), 4307-4317. doi: 10.1167/iovs.17-23747
- Gao, Y. J. et Ji, R. R. (2010). Targeting astrocyte signaling for chronic pain. *Neurotherapeutics*, 7(4), 482-493. doi: 10.1016/j.nurt.2010.05.016
- Gastinger, M. J., Singh, R. S. et Barber, A. J. (2006). Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(7), 3143-3150. doi: 10.1167/iovs.05-1376
- Gavard, J. et Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nature Cell Biology*, 8(11), 1223-1234. doi: 10.1038/ncb1486
- Gemenetzi, M., Lotery, A. J. et Patel, P. J. (2017). Risk of geographic atrophy in age-related macular degeneration patients treated with intravitreal anti-VEGF agents. *Eye (London, England)*, 31(1), 1-9. doi: 10.1038/eye.2016.208
- Gertig, U. et Hanisch, U. K. (2014). Microglial diversity by responses and responders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 101. doi: 10.3389/fncel.2014.00101
- Ghazi, N. G. (2002). Retinal angiomatous proliferation in age-related macular degeneration. *Retina*, 22(4), 509-511; author reply 512. doi: 10.1097/00006982-200208000-00023
- Ghirlanda, G., Di Leo, M. A., Caputo, S., Falsini, B., Porciatti, V., Marietti, G. et Greco, A. V. (1991). Detection of inner retina dysfunction by steady-state focal electroretinogram pattern and flicker in early IDDM. *Diabetes*, 40(9), 1122-1127. doi: 10.2337/diab.40.9.1122
- Gilbert, R. E., Kelly, D. J., Cox, A. J., Wilkinson-Berka, J. L., Rumble, J. R., Osicka, T., Panagiotopoulos, S., Lee, V., et al. (2000). Angiotensin converting enzyme inhibition reduces retinal overexpression of vascular endothelial growth factor and hyperpermeability in experimental diabetes. *Diabetologia*, 43(11), 1360-1367. doi: 10.1007/s001250051539
- Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y. et Neufeld, G. (2000). Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]. *Journal of Biological Chemistry*, 275(24), 18040-18045. doi: 10.1074/jbc.M909259199
- Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Shibuya, M. et Neufeld, G. (2001). Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 18688-18694. doi: 10.1074/jbc.M006909200
- Goldman, D. (2014). Muller glial cell reprogramming and retina regeneration. *Nature Reviews: Neuroscience*, 15(7), 431-442. doi: 10.1038/nrn3723
- Goodman, L., Gilman, A., Brunton, LL., Lazo, JS., Parker, KL (2006). *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th edn.* New York: McGraw-Hill.
- Gorusupudi, A., Nelson, K. et Bernstein, P. S. (2017). The Age-Related Eye Disease 2 Study: Micronutrients in the Treatment of Macular Degeneration. *Advances in Nutrition*, 8(1), 40-53. doi: 10.3945/an.116.013177
- Goureau, O., Hicks, D., Courtois, Y. et De Kozak, Y. (1994). Induction and regulation of nitric oxide synthase in retinal Muller glial cells. *Journal of Neurochemistry*, 63(1), 310-317. doi: 10.1046/j.1471-4159.1994.63010310.x
- Goureau, O., Regnier-Ricard, F. et Courtois, Y. (1999). Requirement for nitric oxide in retinal neuronal cell death induced by activated Muller glial cells. *Journal of Neurochemistry*, 72(6), 2506-2515.

- Grauslund, J., Frydkjaer-Olsen, U., Peto, T., Fernandez-Carneado, J., Ponsati, B., Hernandez, C., Cunha-Vaz, J., Simo, R. et Eurocondor. (2019). Topical Treatment With Brimonidine and Somatostatin Causes Retinal Vascular Dilation in Patients With Early Diabetic Retinopathy From the EUROCONDOR. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 60(6), 2257-2262. doi: 10.1167/iovs.18-26487
- Gray, H. (2008). *Gray's anatomy*. Philadelphia: Elsevier.
- Grigsby, J. G., Cardona, S. M., Pouw, C. E., Muniz, A., Mendiola, A. S., Tsin, A. T., Allen, D. M. et Cardona, A. E. (2014). The role of microglia in diabetic retinopathy. *J Ophthalmol*, 2014, 705783. doi: 10.1155/2014/705783
- Grossniklaus, H. E., Geisert, E. E. et Nickerson, J. M. (2015). Introduction to the Retina. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 134, 383-396. doi: 10.1016/bs.pmbts.2015.06.001
- Guillonneau, X., Eandi, C. M., Paques, M., Sahel, J. A., Sapiaha, P. et Sennlaub, F. (2017). On phagocytes and macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 61, 98-128. doi: 10.1016/j.preteyeres.2017.06.002
- Gupta, N., Brown, K. E. et Milam, A. H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 76(4), 463-471. doi: 10.1016/s0014-4835(02)00332-9
- Hachana, S., Bhat, M., Senecal, J., Huppe-Gourgues, F., Couture, R. et Vaucher, E. (2018). Expression, distribution and function of kinin B1 receptor in the rat diabetic retina. *British Journal of Pharmacology*, 175(6), 968-983. doi: 10.1111/bph.14138
- Hachana, S., Fontaine, O., Sapiaha, P., Lesk, M., Couture, R. et Vaucher, E. (2020a). The effects of anti-VEGF and kinin B1 receptor blockade on retinal inflammation in laser-induced choroidal neovascularization. *British Journal of Pharmacology*, 177(9), 1949-1966. doi: 10.1111/bph.14962
- Hachana, S., Pouliot, M., Couture, R. et Vaucher, E. (2020b). Diabetes-Induced Inflammation and Vascular Alterations in the Goto-Kakizaki Rat Retina. *Current Eye Research*, 1-10. doi: 10.1080/02713683.2020.1712730
- Haddad, Y. et Couture, R. (2016). Interplay between the kinin B1 receptor and inducible nitric oxide synthase in insulin resistance. *British Journal of Pharmacology*, 173(12), 1988-2000. doi: 10.1111/bph.13491
- Haddad, Y. et Couture, R. (2017a). Kininase 1 As a Preclinical Therapeutic Target for Kinin B1 Receptor in Insulin Resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 509. doi: 10.3389/fphar.2017.00509
- Haddad, Y. et Couture, R. (2017b). Localization and Interaction between Kinin B1 Receptor and NADPH Oxidase in the Vascular System of Diabetic Rats. *Frontiers in Physiology*, 8, 861. doi: 10.3389/fphys.2017.00861
- Hageman, G. S., Luthert, P. J., Victor Chong, N. H., Johnson, L. V., Anderson, D. H. et Mullins, R. F. (2001). An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20(6), 705-732. doi: 10.1016/s1350-9462(01)00010-6
- Han, E. D., MacFarlane, R. C., Mulligan, A. N., Scafidi, J. et Davis, A. E., 3rd. (2002). Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 109(8), 1057-1063. doi: 10.1172/JCI14211
- Hancock, H. A. et Kraft, T. W. (2004). Oscillatory potential analysis and ERGs of normal and diabetic rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 45(3), 1002-1008. doi: 10.1167/iovs.03-1080

- Hanus, J., Zhang, H., Wang, Z., Liu, Q., Zhou, Q. et Wang, S. (2013). Induction of necrotic cell death by oxidative stress in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death & Disease*, 4, e965. doi: 10.1038/cddis.2013.478
- Hartnett, M. (2013). *Pediatric Retina*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Hartnett, M. E., Lappas, A., Darland, D., McColm, J. R., Lovejoy, S. et D'Amore, P. A. (2003). Retinal pigment epithelium and endothelial cell interaction causes retinal pigment epithelial barrier dysfunction via a soluble VEGF-dependent mechanism. *Experimental Eye Research*, 77(5), 593-599. doi: 10.1016/s0014-4835(03)00189-1
- Hatcher, H. C., Ma, J. X., Chao, J., Chao, L. et Ottlecz, A. (1997). Kallikrein-binding protein levels are reduced in the retinas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 38(3), 658-664.
- Hattenbach, L. O., Falk, B., Nurnberger, F., Koch, F. H. et Ohrloff, C. (2002). Detection of inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in choroidal neovascular membranes. *Ophthalmologica*, 216(3), 209-214. doi: 10.1159/000059634
- Hayreh, S. S. (2006). Orbital vascular anatomy. *Eye*, 20(10), 1130-1144. doi: 10.1038/sj.eye.6702377
- He, T., Xing, Y. Q., Zhao, X. H. et Ai, M. (2007). Interaction between iNOS and COX-2 in hypoxia-induced retinal neovascularization in mice. *Archives of Medical Research*, 38(8), 807-815. doi: 10.1016/j.arcmed.2007.05.003
- Heesterbeek, T. J., Lores-Motta, L., Hoyng, C. B., Lechanteur, Y. T. E. et den Hollander, A. I. (2020). Risk factors for progression of age-related macular degeneration. *Ophthalmic and Physiological Optics*. doi: 10.1111/opo.12675
- Helske, S., Laine, M., Kupari, M., Lommi, J., Turto, H., Nurmi, L., Tikkanen, I., Werkkala, K., et al. (2007). Increased expression of profibrotic neutral endopeptidase and bradykinin type 1 receptors in stenotic aortic valves. *European Heart Journal*, 28(15), 1894-1903. doi: 10.1093/eurheartj/ehm129
- Hempel, A., Maasch, C., Heintze, U., Lindschau, C., Dietz, R., Luft, F. C. et Haller, H. (1997). High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circulation Research*, 81(3), 363-371. doi: 10.1161/01.res.81.3.363
- Henkind, P., Hansen, R.L., Szalay, J., Editors. (1979). *Ocular circulation*. In: *Physiology of the human eye and visual system*. . New York: Harper & Row.
- Hernandez, C., Simo, R. et European Consortium for the Early Treatment of Diabetic, R. (2013). Somatostatin replacement: a new strategy for treating diabetic retinopathy. *Current Medicinal Chemistry*, 20(26), 3251-3257. doi: 10.2174/09298673113209990024
- Herold, K. C., Vezys, V., Sun, Q., Viktora, D., Seung, E., Reiner, S. et Brown, D. R. (1996). Regulation of cytokine production during development of autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. *Journal of Immunology*, 156(9), 3521-3527.
- Hess, J. F., Borkowski, J. A., Macneil, T., Stonesifer, G. Y., Fraher, J., Strader, C. D. et Ransom, R. W. (1994). Differential pharmacology of cloned human and mouse B2 bradykinin receptors. *Molecular Pharmacology*, 45(1), 1-8.
- Hess, J. F., Hey, P. J., Chen, T. B., O'Brien, J., Omalley, S. S., Pettibone, D. J. et Chang, R. S. (2001). Molecular cloning and pharmacological characterization of the canine B1 and B2 bradykinin receptors. *Biological Chemistry*, 382(1), 123-129. doi: 10.1515/BC.2001.018
- Hippert, C., Graca, A. B., Barber, A. C., West, E. L., Smith, A. J., Ali, R. R. et Pearson, R. A. (2015). Muller glia activation in response to inherited retinal degeneration is highly varied and disease-specific. *PloS One*, 10(3), e0120415. doi: 10.1371/journal.pone.0120415

- Hirai, F. E., Tielsch, J. M., Klein, B. E. et Klein, R. (2011). Ten-year change in vision-related quality of life in type 1 diabetes: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, 118(2), 353-358. doi: 10.1016/j.ophtha.2010.06.022
- Hollyfield, J. G., Salomon, R. G. et Crabb, J. W. (2003). Proteomic approaches to understanding age-related macular degeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 533, 83-89. doi: 10.1007/978-1-4615-0067-4\_11
- Holz, F. G., Sadda, S. R., Busbee, B., Chew, E. Y., Mitchell, P., Tufail, A., Brittain, C., Ferrara, D., et al. (2018). Efficacy and Safety of Lampalizumab for Geographic Atrophy Due to Age-Related Macular Degeneration: Chroma and Spectri Phase 3 Randomized Clinical Trials. *JAMA Ophthalmol*, 136(6), 666-677. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2018.1544
- Honjo, M., Tanihara, H., Kido, N., Inatani, M., Okazaki, K. et Honda, Y. (2000). Expression of ciliary neurotrophic factor activated by retinal Muller cells in eyes with NMDA- and kainic acid-induced neuronal death. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(2), 552-560.
- Hoon, M., Okawa, H., Della Santina, L. et Wong, R. O. (2014). Functional architecture of the retina: development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 42, 44-84. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.06.003
- Huang, S. et Czech, M. P. (2007). The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metabolism*, 5(4), 237-252. doi: 10.1016/j.cmet.2007.03.006
- Hurst, J., Mueller-Buehl, A. M., Hofmann, L., Kuehn, S., Herms, F., Schnichels, S. et Joachim, S. C. (2020). iNOS-inhibitor driven neuroprotection in a porcine retina organ culture model. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 24(7), 4312-4323. doi: 10.1111/jcmm.15091
- Ida, H., Tobe, T., Nambu, H., Matsumura, M., Uyama, M. et Campochiaro, P. A. (2003). RPE cells modulate subretinal neovascularization, but do not cause regression in mice with sustained expression of VEGF. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(12), 5430-5437. doi: 10.1167/iovs.03-0609
- Ifuku, M., Farber, K., Okuno, Y., Yamakawa, Y., Miyamoto, T., Nolte, C., Merrino, V. F., Kita, S., et al. (2007). Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca<sup>2+</sup> influx via reverse-mode activity of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Journal of Neuroscience*, 27(48), 13065-13073. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3467-07.2007
- Igic, R. (2018). Four decades of ocular renin-angiotensin and kallikrein-kinin systems (1977-2017). *Experimental Eye Research*, 166, 74-83. doi: 10.1016/j.exer.2017.05.007
- Ikeda, Y., Hayashi, I., Kamoshita, E., Yamazaki, A., Endo, H., Ishihara, K., Yamashina, S., Tsutsumi, Y., et al. (2004). Host stromal bradykinin B2 receptor signaling facilitates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Cancer Research*, 64(15), 5178-5185. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3589
- Inoguchi, T., Li, P., Umeda, F., Yu, H. Y., Kakimoto, M., Imamura, M., Aoki, T., Etoh, T., et al. (2000). High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 49(11), 1939-1945. doi: 10.2337/diabetes.49.11.1939
- Inokuchi, J. et Nagamatsu, A. (1981). Tripeptidyl carboxypeptidase activity of kininase II (angiotensin-converting enzyme). *Biochimica et Biophysica Acta*, 662(2), 300-307. doi: 10.1016/0005-2744(81)90042-5
- Ishida, S., Usui, T., Yamashiro, K., Kaji, Y., Ahmed, E., Carrasquillo, K. G., Amano, S., Hida, T., et al. (2003). VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(5), 2155-2162. doi: 10.1167/iovs.02-0807

- Ishii, H., Jirousek, M. R., Koya, D., Takagi, C., Xia, P., Clermont, A., Bursell, S. E., Kern, T. S., *et al.* (1996). Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science*, 272(5262), 728-731. doi: 10.1126/science.272.5262.728
- Ismael, M. A., Talbot, S., Carbonneau, C. L., Beausejour, C. M. et 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. *European Journal of Pharmacology*, 589(1-3), 66-72. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.05.006
- Jaidane, H., Sane, F., Gharbi, J., Aouni, M., Romond, M. B. et Hober, D. (2009). Cocksackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 25(7), 591-603. doi: 10.1002/dmrr.995
- Javanmard, S. H., Nematbakhsh, M., Mahmoodi, F. et Mohajeri, M. R. (2009). l-Arginine supplementation enhances eNOS expression in experimental model of hypercholesterolemic rabbits aorta. *Pathophysiology*, 16(1), 9-13. doi: 10.1016/j.pathophys.2008.11.003
- Jeon, C. J., Strettoi, E. et Masland, R. H. (1998). The major cell populations of the mouse retina. *Journal of Neuroscience*, 18(21), 8936-8946.
- Jessen, K. R. et Mirsky, R. (1980). Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature*, 286(5774), 736-737. doi: 10.1038/286736a0
- Jha, M. K., Seo, M., Kim, J. H., Kim, B. G., Cho, J. Y. et Suk, K. (2013). The secretome signature of reactive glial cells and its pathological implications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1834(11), 2418-2428. doi: 10.1016/j.bbapap.2012.12.006
- Ji, B., Wang, Q., Xue, Q., Li, W., Li, X. et Wu, Y. (2019). The Dual Role of Kinin/Kinin Receptors System in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 234. doi: 10.3389/fnmol.2019.00234
- Jiang, X., Yang, L. et Luo, Y. (2015). Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Current Eye Research*, 40(8), 761-771. doi: 10.3109/02713683.2014.964415
- Johnston, A. P., Campbell, J. E., Found, J. G., Riddell, M. C. et Hawke, T. J. (2007). Streptozotocin induces G2 arrest in skeletal muscle myoblasts and impairs muscle growth in vivo. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, 292(3), C1033-1040. doi: 10.1152/ajpcell.00338.2006
- Ju, H., Venema, V. J., Marrero, M. B. et Venema, R. C. (1998). Inhibitory interactions of the bradykinin B2 receptor with endothelial nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(37), 24025-24029. doi: 10.1074/jbc.273.37.24025
- Kalfa, T. A., Gerritsen, M. E., Carlson, E. C., Binstock, A. J. et Tsilibary, E. C. (1995). Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycated matrix. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 36(12), 2358-2367.
- Kaneki, M., Shimizu, N., Yamada, D. et Chang, K. (2007). Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*, 9(3), 319-329. doi: 10.1089/ars.2006.1464
- Kant, S., Seth, G. et Anthony, K. (2009). Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Ann Ophthalmol (Skokie)*, 41(3-4), 170-173.
- Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W. T., Provis, J. M. et Langmann, T. (2015). Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Progress in Retinal and Eye Research*, 45, 30-57. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.11.004
- Kashani, A. H., Lebkowski, J. S., Rahhal, F. M., Avery, R. L., Salehi-Had, H., Dang, W., Lin, C. M., Mitra, D., *et al.* (2018). A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration. *Science Translational Medicine*, 10(435). doi: 10.1126/scitranslmed.aao4097

- Kaszubski, P., Ben Ami, T., Saade, C. et Smith, R. T. (2016). Geographic Atrophy and Choroidal Neovascularization in the Same Eye: A Review. *Ophthalmic Research*, 55(4), 185-193. doi: 10.1159/000443209
- Keenan, H. A., Sun, J. K., Levine, J., Doria, A., Aiello, L. P., Eisenbarth, G., Bonner-Weir, S. et King, G. L. (2010). Residual insulin production and pancreatic  $\beta$ -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. *Diabetes*, 59(11), 2846-2853. doi: 10.2337/db10-0676
- Keogh, R. J., Dunlop, M. E. et Larkins, R. G. (1997). Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 46(1), 41-47. doi: 10.1016/s0026-0495(97)90165-7
- Kerbel, R. S. (2008). Tumor angiogenesis. *New England Journal of Medicine*, 358(19), 2039-2049. doi: 10.1056/NEJMra0706596
- Kern, T. S. et Engerman, R. L. (2001). Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy: aminoguanidine and aspirin. *Diabetes*, 50(7), 1636-1642. doi: 10.2337/diabetes.50.7.1636
- Kern, T. S., Miller, C. M., Du, Y., Zheng, L., Mohr, S., Ball, S. L., Kim, M., Jamison, J. A. et Bingaman, D. P. (2007). Topical administration of nepafenac inhibits diabetes-induced retinal microvascular disease and underlying abnormalities of retinal metabolism and physiology. *Diabetes*, 56(2), 373-379. doi: 10.2337/db05-1621
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M. et Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461-553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010
- Kiire, C. A., Porta, M. et Chong, V. (2013). Medical management for the prevention and treatment of diabetic macular edema. *Survey of Ophthalmology*, 58(5), 459-465. doi: 10.1016/j.survophthal.2012.10.002
- Kim, T., Kim, S. J., Kim, K., Kang, U. B., Lee, C., Park, K. S., Yu, H. G. et Kim, Y. (2007). Profiling of vitreous proteomes from proliferative diabetic retinopathy and nondiabetic patients. *Proteomics*, 7(22), 4203-4215. doi: 10.1002/pmic.200700745
- Kimura, H., Spee, C., Sakamoto, T., Hinton, D. R., Ogura, Y., Tabata, Y., Ikada, Y. et Ryan, S. J. (1999). Cellular response in subretinal neovascularization induced by bFGF-impregnated microspheres. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 40(2), 524-528.
- King, A. J. (2012). The use of animal models in diabetes research. *British Journal of Pharmacology*, 166(3), 877-894. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x
- Klein, J., Gonzalez, J., Duchene, J., Esposito, L., Pradere, J. P., Neau, E., Delage, C., Calise, D., et al. (2009). Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB Journal*, 23(1), 134-142. doi: 10.1096/fj.08-115600
- Klein, R., Klein, B. E., Moss, S. E. et Cruickshanks, K. J. (1995). The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. XV. The long-term incidence of macular edema. *Ophthalmology*, 102(1), 7-16. doi: 10.1016/s0161-6420(95)31052-4
- Klein, R., Klein, B. E., Moss, S. E., Davis, M. D. et DeMets, D. L. (1984). The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Archives of Ophthalmology*, 102(4), 520-526. doi: 10.1001/archophth.1984.01040030398010
- Klein, R., Peto, T., Bird, A. et Vannewkirk, M. R. (2004). The epidemiology of age-related macular degeneration. *American Journal of Ophthalmology*, 137(3), 486-495. doi: 10.1016/j.ajo.2003.11.069
- Knott, A. B. et Bossy-Wetzel, E. (2009). Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxid Redox Signal*, 11(3), 541-554. doi: 10.1089/ARS.2008.2234



- Knowles, R. G. et Moncada, S. (1994). Nitric oxide synthases in mammals. *Biochemical Journal*, 298 ( Pt 2), 249-258. doi: 10.1042/bj2980249
- Kociok, N. et Jousseaume, A. M. (2007). Varied expression of functionally important genes of RPE and choroid in the macula and in the periphery of normal human eyes. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 245(1), 101-113. doi: 10.1007/s00417-006-0266-x
- Kohler, K., Wheeler-Schilling, T., Jurklics, B., Guenther, E. et Zrenner, E. (1997). Angiotensin II in the rabbit retina. *Visual Neuroscience*, 14(1), 63-71. doi: 10.1017/s0952523800008762
- Kohzaki, K., Vingrys, A. J. et Bui, B. V. (2008). Early inner retinal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(8), 3595-3604. doi: 10.1167/iovs.08-1679
- Kolb, H., Fernandez, E., Ammermuller, J. et Cuenca, N. (1995). Substance P: a neurotransmitter of amacrine and ganglion cells in the vertebrate retina. *Histology and Histopathology*, 10(4), 947-968.
- Kollias, A. N. et Ulbig, M. W. (2010). Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 107(5), 75-83; quiz 84. doi: 10.3238/arztebl.2010.0075
- Kolm-Litty, V., Sauer, U., Nerlich, A., Lehmann, R. et Schleicher, E. D. (1998). High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *Journal of Clinical Investigation*, 101(1), 160-169. doi: 10.1172/JCI119875
- Kolomeyer, A. M., Maguire, M. G., Pan, W. et VanderBeek, B. L. (2019). Systemic Beta-Blockers and Risk of Progression to Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Retina*, 39(5), 918-925. doi: 10.1097/IAE.0000000000002059
- Kowluru, R. A. (2001). Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta Diabetologica*, 38(4), 179-185. doi: 10.1007/s592-001-8076-6
- Kowluru, R. A., Engerman, R. L., Case, G. L. et Kern, T. S. (2001a). Retinal glutamate in diabetes and effect of antioxidants. *Neurochemistry International*, 38(5), 385-390. doi: 10.1016/s0197-0186(00)00112-1
- Kowluru, R. A., Engerman, R. L. et Kern, T. S. (2000). Diabetes-induced metabolic abnormalities in myocardium: effect of antioxidant therapy. *Free Radical Research*, 32(1), 67-74. doi: 10.1080/10715760000300071
- Kowluru, R. A. et Kennedy, A. (2001). Therapeutic potential of anti-oxidants and diabetic retinopathy. *Expert Opin Investig Drugs*, 10(9), 1665-1676. doi: 10.1517/13543784.10.9.1665
- Kowluru, R. A. et Odenbach, S. (2004). Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes*, 53(12), 3233-3238. doi: 10.2337/diabetes.53.12.3233
- Kowluru, R. A., Tang, J. et Kern, T. S. (2001b). Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes*, 50(8), 1938-1942. doi: 10.2337/diabetes.50.8.1938
- Koya, D. et King, G. L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, 47(6), 859-866. doi: 10.2337/diabetes.47.6.859
- Kuhlencordt, P. J., Chen, J., Han, F., Astern, J. et Huang, P. L. (2001). Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*, 103(25), 3099-3104. doi: 10.1161/01.cir.103.25.3099

- Kuhr, F., Lowry, J., Zhang, Y., Brovkovich, V. et Skidgel, R. A. (2010). Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*, 44(2), 145-154. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.004
- Kumar-Singh, R. (2019). The role of complement membrane attack complex in dry and wet AMD - From hypothesis to clinical trials. *Experimental Eye Research*, 184, 266-277. doi: 10.1016/j.exer.2019.05.006
- Kumar, V., Abbas, AK., Fausto, N., Robbins, SL., Cotran, RS (2005). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th edn.* Philadelphia, USA: Elsevier Saunders.
- Labbé, A. (2014). *Anatomie de la tête et de la portion antérieure du nerf optique - Rapport SFO 2014.* France.
- Lacoste, B., Tong, X. K., Lahjouji, K., Couture, R. et Hamel, E. (2013). Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroinflammation*, 10, 57. doi: 10.1186/1742-2094-10-57
- Lambert, N. G., ElShelmani, H., Singh, M. K., Mansergh, F. C., Wride, M. A., Padilla, M., Keegan, D., Hogg, R. E. et Ambati, B. K. (2016). Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 54, 64-102. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.04.003
- Lavalette, S., Raoul, W., Houssier, M., Camelo, S., Levy, O., Calippe, B., Jonet, L., Behar-Cohen, F., et al. (2011). Interleukin-1beta inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *American Journal of Pathology*, 178(5), 2416-2423. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.013
- Le, Y. Z. (2017). VEGF production and signaling in Muller glia are critical to modulating vascular function and neuronal integrity in diabetic retinopathy and hypoxic retinal vascular diseases. *Vision Research*, 139, 108-114. doi: 10.1016/j.visres.2017.05.005
- Leal, E. C., Manivannan, A., Hosoya, K., Terasaki, T., Cunha-Vaz, J., Ambrosio, A. F. et Forrester, J. V. (2007). Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(11), 5257-5265. doi: 10.1167/iovs.07-0112
- Lechner, M., Lirk, P. et Rieder, J. (2005). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Seminars in Cancer Biology*, 15(4), 277-289. doi: 10.1016/j.semcancer.2005.04.004
- Lee, H., Jeon, H. L., Park, S. J. et Shin, J. Y. (2019). Effect of Statins, Metformin, Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors, and Angiotensin II Receptor Blockers on Age-Related Macular Degeneration. *Yonsei Medical Journal*, 60(7), 679-686. doi: 10.3349/ymj.2019.60.7.679
- Leeb-Lundberg, L. M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D. J. et Zuraw, B. L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacological Reviews*, 57(1), 27-77. doi: 10.1124/pr.57.1.2
- Leveillard, T., Philp, N. J. et Sennlaub, F. (2019). Is Retinal Metabolic Dysfunction at the Center of the Pathogenesis of Age-related Macular Degeneration? *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). doi: 10.3390/ijms20030762
- Levy, O., Calippe, B., Lavalette, S., Hu, S. J., Raoul, W., Dominguez, E., Housset, M., Paques, M., et al. (2015a). Apolipoprotein E promotes subretinal mononuclear phagocyte survival and chronic inflammation in age-related macular degeneration. *EMBO Molecular Medicine*, 7(2), 211-226. doi: 10.15252/emmm.201404524
- Levy, O., Lavalette, S., Hu, S. J., Housset, M., Raoul, W., Eandi, C., Sahel, J. A., Sullivan, P. M., et al. (2015b). APOE Isoforms Control Pathogenic Subretinal Inflammation in Age-Related

- Macular Degeneration. *Journal of Neuroscience*, 35(40), 13568-13576. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2468-15.2015
- Li, C. M., Clark, M. E., Chimento, M. F. et Curcio, C. A. (2006). Apolipoprotein localization in isolated drusen and retinal apolipoprotein gene expression. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(7), 3119-3128. doi: 10.1167/iovs.05-1446
- Li, P., Kondo, T., Numaguchi, Y., Kobayashi, K., Aoki, M., Inoue, N., Okumura, K. et Murohara, T. (2008). Role of bradykinin, nitric oxide, and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension*, 51(2), 252-258. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.097394
- Li, Q., Verma, A., Han, P. Y., Nakagawa, T., Johnson, R. J., Grant, M. B., Campbell-Thompson, M., Jarajapu, Y. P., et al. (2010). Diabetic eNOS-knockout mice develop accelerated retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(10), 5240-5246. doi: 10.1167/iovs.09-5147
- Lim, L. S., Mitchell, P., Seddon, J. M., Holz, F. G. et Wong, T. Y. (2012). Age-related macular degeneration. *Lancet*, 379(9827), 1728-1738. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60282-7
- Lin, X., Bernloehr, C., Hildebrandt, T., Stadler, F. J., Doods, H. et Wu, D. (2016). Kinin B1 receptor blockade and ACE inhibition attenuate cardiac postinfarction remodeling and heart failure in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 305, 153-160. doi: 10.1016/j.taap.2016.06.005
- Lind, M., Hayes, A., Caprnda, M., Petrovic, D., Rodrigo, L., Kruzliak, P. et Zulli, A. (2017). Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93, 370-375. doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.036
- Liu, J. et Feener, E. P. (2013). Plasma kallikrein-kinin system and diabetic retinopathy. *Biological Chemistry*, 394(3), 319-328. doi: 10.1515/hsz-2012-0316
- Lorenzi, M. (2007). The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Experimental Diabetes Research*, 2007, 61038. doi: 10.1155/2007/61038
- Luckoff, A., Caramoy, A., Scholz, R., Prinz, M., Kalinke, U. et Langmann, T. (2016). Interferon-beta signaling in retinal mononuclear phagocytes attenuates pathological neovascularization. *EMBO Molecular Medicine*, 8(6), 670-678. doi: 10.15252/emmm.201505994
- Luckoff, A., Scholz, R., Sennlaub, F., Xu, H. et Langmann, T. (2017). Comprehensive analysis of mouse retinal mononuclear phagocytes. *Nature Protocols*, 12(6), 1136-1150. doi: 10.1038/nprot.2017.032
- Luna, G., Lewis, G. P., Banna, C. D., Skalli, O. et Fisher, S. K. (2010). Expression profiles of nestin and synemin in reactive astrocytes and Muller cells following retinal injury: a comparison with glial fibrillar acidic protein and vimentin. *Molecular Vision*, 16, 2511-2523.
- Lupien, C., Brenner, M., Guerin, S. L. et Salesse, C. (2004). Expression of glial fibrillary acidic protein in primary cultures of human Muller cells. *Experimental Eye Research*, 79(3), 423-429. doi: 10.1016/j.exer.2004.05.008
- Ma, J. X., King, L. P., Yang, Z., Crouch, R. K., Chao, L. et Chao, J. (1996a). Kallistatin in human ocular tissues: reduced levels in vitreous fluids from patients with diabetic retinopathy. *Current Eye Research*, 15(11), 1117-1123. doi: 10.3109/02713689608995143
- Ma, J. X., Song, Q., Hatcher, H. C., Crouch, R. K., Chao, L. et Chao, J. (1996b). Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Experimental Eye Research*, 63(1), 19-26. doi: 10.1006/exer.1996.0087

- Ma, W., Zhao, L., Fontainhas, A. M., Fariss, R. N. et 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
- Ma, W., Zhao, L. et Wong, W. T. (2012). Microglia in the outer retina and their relevance to pathogenesis of age-related macular degeneration. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 723, 37-42. doi: 10.1007/978-1-4614-0631-0\_6
- MacMicking, J., Xie, Q. W. et Nathan, C. (1997). Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, 15, 323-350. doi: 10.1146/annurev.immunol.15.1.323
- Madeira, M. H., Rashid, K., Ambrosio, A. F., Santiago, A. R. et Langmann, T. (2018). Blockade of microglial adenosine A2A receptor impacts inflammatory mechanisms, reduces ARPE-19 cell dysfunction and prevents photoreceptor loss in vitro. *Scientific Reports*, 8(1), 2272. doi: 10.1038/s41598-018-20733-2
- Maminishkis, A., Chen, S., Jalickee, S., Banzon, T., Shi, G., Wang, F. E., Ehalt, T., Hammer, J. A. et Miller, S. S. (2006). Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 47(8), 3612-3624. doi: 10.1167/iovs.05-1622
- Marceau, F. et Bachvarov, D. R. (1998). Kinin receptors. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 16(4), 385-401. doi: 10.1007/BF02737658
- Marceau, F., Hess, J. F. et Bachvarov, D. R. (1998). The B1 receptors for kinins. *Pharmacological Reviews*, 50(3), 357-386.
- Marceau, F. et Regoli, D. (2004). Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov*, 3(10), 845-852. doi: 10.1038/nrd1522
- Martinez-Ruiz, A., Cadenas, S. et Lamas, S. (2011). Nitric oxide signaling: classical, less classical, and nonclassical mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(1), 17-29. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.010
- Mathews, C. E., Langley, S. H. et Leiter, E. H. (2002). New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Transplantation*, 73(8), 1333-1336. doi: 10.1097/00007890-200204270-00024
- Matyash, V. et Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews*, 63(1-2), 2-10. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.12.001
- Mauer, M., Zinman, B., Gardiner, R., Suissa, S., Sinaiko, A., Strand, T., Drummond, K., Donnelly, S., et al. (2009). Renal and retinal effects of enalapril and losartan in type 1 diabetes. *New England Journal of Medicine*, 361(1), 40-51. doi: 10.1056/NEJMoa0808400
- McEachern, A. E., Shelton, E. R., Bhakta, S., Obernolte, R., Bach, C., Zuppan, P., Fujisaki, J., Aldrich, R. W. et Jarnagin, K. (1991). Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(17), 7724-7728. doi: 10.1073/pnas.88.17.7724
- McLeod, D. S., Grebe, R., Bhutto, I., Merges, C., Baba, T. et Luty, G. A. (2009). Relationship between RPE and choriocapillaris in age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50(10), 4982-4991. doi: 10.1167/iovs.09-3639
- Mejia, A. J., Matus, C. E., Pavicic, F., Concha, M., Ehrenfeld, P. et Figueroa, C. D. (2015). Intracellular signaling pathways involved in the release of IL-4 and VEGF from human keratinocytes by activation of kinin B1 receptor: functional relevance to angiogenesis. *Archives for Dermatological Research. Archiv für Dermatologische Forschung*, 307(9), 803-817. doi: 10.1007/s00403-015-1595-6

- Mellert, J., Hering, B. J., Liu, X., Brandhorst, D., Brandhorst, H., Brendel, M., Ernst, E., Gramberg, D., *et al.* (1998). Successful islet auto- and allotransplantation in diabetic pigs. *Transplantation*, *66*(2), 200-204. doi: 10.1097/00007890-199807270-00010
- Menke, J. G., Borkowski, J. A., Bierilo, K. K., MacNeil, T., Derrick, A. W., Schneck, K. A., Ransom, R. W., Strader, C. D., *et al.* (1994). Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(34), 21583-21586.
- Mesquita, J., Castro-de-Sousa, J. P., Vaz-Pereira, S., Neves, A., Passarinha, L. A. et Tomaz, C. T. (2018). Vascular endothelial growth factors and placenta growth factor in retinal vasculopathies: Current research and future perspectives. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *39*, 102-115. doi: 10.1016/j.cytogfr.2017.11.005
- Miclescu, A. et Gordh, T. (2009). Nitric oxide and pain: 'Something old, something new'. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, *53*(9), 1107-1120. doi: 10.1111/j.1399-6576.2009.02054.x
- Miller, J. W., Adamis, A. P. et Aiello, L. P. (1997). Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes/Metabolism Reviews*, *13*(1), 37-50. doi: 10.1002/(sici)1099-0895(199703)13:1<37::aid-dmr174>3.0.co;2-k
- Miranda, M. et Romero, F. J. (2019). Antioxidants and Retinal Diseases. *Antioxidants (Basel)*, *8*(12). doi: 10.3390/antiox8120604
- Mishra, A. et Newman, E. A. (2010). Inhibition of inducible nitric oxide synthase reverses the loss of functional hyperemia in diabetic retinopathy. *Glia*, *58*(16), 1996-2004. doi: 10.1002/glia.21068
- Mitchell, P., Bandello, F., Schmidt-Erfurth, U., Lang, G. E., Massin, P., Schlingemann, R. O., Sutter, F., Simader, C., *et al.* (2011). The RESTORE study: ranibizumab monotherapy or combined with laser versus laser monotherapy for diabetic macular edema. *Ophthalmology*, *118*(4), 615-625. doi: 10.1016/j.optha.2011.01.031
- Mohamed, Q., Gillies, M. C. et Wong, T. Y. (2007). Management of diabetic retinopathy: a systematic review. *JAMA*, *298*(8), 902-916. doi: 10.1001/jama.298.8.902
- Molinaro, G., Cugno, M., Perez, M., Lepage, Y., Gervais, N., Agostoni, A. et Adam, A. (2002). Angiotensin-converting enzyme inhibitor-associated angioedema is characterized by a slower degradation of des-arginine(9)-bradykinin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *303*(1), 232-237. doi: 10.1124/jpet.102.038067
- Morand-Contant, M., Anand-Srivastava, M. B. et Couture, R. (2010). Kinin B1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: receptors and mechanisms. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, *299*(5), H1625-1632. doi: 10.1152/ajpheart.00735.2009
- Mott, J. D., Khalifah, R. G., Nagase, H., Shield, C. F., 3rd, Hudson, J. K. et Hudson, B. G. (1997). Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility. *Kidney International*, *52*(5), 1302-1312. doi: 10.1038/ki.1997.455
- Mugisho, O. O., Robilliard, L. D., Nicholson, L. F. B., Graham, E. S. et O'Carroll, S. J. (2019). Bradykinin receptor-1 activation induces inflammation and increases the permeability of human brain microvascular endothelial cells. *Cell Biology International*. doi: 10.1002/cbin.11232
- Muller, G. et Morawietz, H. (2009). Nitric oxide, NAD(P)H oxidase, and atherosclerosis. *Antioxid Redox Signal*, *11*(7), 1711-1731. doi: 10.1089/ARS.2008.2403
- Munoz, C. M. et Leeb-Lundberg, L. M. (1992). Receptor-mediated internalization of bradykinin. DDT1 MF-2 smooth muscle cells process internalized bradykinin via multiple degradative pathways. *Journal of Biological Chemistry*, *267*(1), 303-309.

- Murali, A., Ramlogan-Steel, C. A., Andrzejewski, S., Steel, J. C. et Layton, C. J. (2019). Retinal explant culture: A platform to investigate human neuro-retina. *Clin Exp Ophthalmol*, 47(2), 274-285. doi: 10.1111/ceo.13434
- Nagai, N., Oike, Y., Izumi-Nagai, K., Koto, T., Satofuka, S., Shinoda, H., Noda, K., Ozawa, Y., et al. (2007). Suppression of choroidal neovascularization by inhibiting angiotensin-converting enzyme: minimal role of bradykinin. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(5), 2321-2326. doi: 10.1167/iovs.06-1296
- Nagai, N., Oike, Y., Izumi-Nagai, K., Urano, T., Kubota, Y., Noda, K., Ozawa, Y., Inoue, M., et al. (2006). Angiotensin II type 1 receptor-mediated inflammation is required for choroidal neovascularization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(10), 2252-2259. doi: 10.1161/01.ATV.0000240050.15321.fe
- Naidoo, S. et Raidoo, D. M. (2006). Tissue kallikrein and kinin receptor expression in an angiogenic co-culture neuroblastoma model. *Metabolic Brain Disease*, 21(2-3), 253-265. doi: 10.1007/s11011-006-9008-3
- Naidu, N., Botha, J. H. et Naidoo, S. (2014). B1 but not B2 bradykinin receptor agonists promote DU145 prostate cancer cell proliferation and migration. *African Health Sciences*, 14(3), 657-662. doi: 10.4314/ahs.v14i3.22
- Nakamura, S., Morimoto, N., Tsuruma, K., Izuta, H., Yasuda, Y., Kato, N., Ikeda, T., Shimazawa, M. et Hara, H. (2011). Tissue kallikrein inhibits retinal neovascularization via the cleavage of vascular endothelial growth factor-165. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(5), 1041-1048. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.223594
- Natoli, R., Fernando, N., Jiao, H., Racic, T., Madigan, M., Barnett, N. L., Chu-Tan, J. A., Valter, K., et al. (2017). Retinal Macrophages Synthesize C3 and Activate Complement in AMD and in Models of Focal Retinal Degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 58(7), 2977-2990. doi: 10.1167/iovs.17-21672
- Nauck, M., Karakiulakis, G., Perruchoud, A. P., Papakonstantinou, E. et Roth, M. (1998). Corticosteroids inhibit the expression of the vascular endothelial growth factor gene in human vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 341(2-3), 309-315. doi: 10.1016/s0014-2999(97)01464-7
- Ndengele, M. M., Cuzzocrea, S., Esposito, E., Mazzon, E., Di Paola, R., Matuschak, G. M. et Salvemini, D. (2008). Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. *FASEB Journal*, 22(9), 3154-3164. doi: 10.1096/fj.08-108159
- Nebel, C., Aslanidis, A., Rashid, K. et Langmann, T. (2017). Activated microglia trigger inflammasome activation and lysosomal destabilization in human RPE cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 484(3), 681-686. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.176
- Nerup, J., Mandrup-Poulsen, T., Helqvist, S., Andersen, H. U., Pociot, F., Reimers, J. I., Cuartero, B. G., Karlsen, A. E., et al. (1994). On the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia*, 37 Suppl 2, S82-89. doi: 10.1007/bf00400830
- Newman, A. M., Gallo, N. B., Hancox, L. S., Miller, N. J., Radeke, C. M., Maloney, M. A., Cooper, J. B., Hageman, G. S., et al. (2012). Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Medicine*, 4(2), 16. doi: 10.1186/gm315
- Nguyen, Q. D., Brown, D. M., Marcus, D. M., Boyer, D. S., Patel, S., Feiner, L., Gibson, A., Sy, J., et al. (2012). Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE. *Ophthalmology*, 119(4), 789-801. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.12.039

- Nickla, D. L. et Wallman, J. (2010). The multifunctional choroid. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(2), 144-168. doi: 10.1016/j.preteyeres.2009.12.002
- Nicoletti, N. F., Senecal, J., da Silva, V. D., Roxo, M. R., Ferreira, N. P., de Morais, R. L. T., Pesquero, J. B., Campos, M. M., et al. (2017). Primary Role for Kinin B1 and B2 Receptors in Glioma Proliferation. *Molecular Neurobiology*, 54(10), 7869-7882. doi: 10.1007/s12035-016-0265-9
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. et Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308(5726), 1314-1318. doi: 10.1126/science.1110647
- Nishijima, K., Ng, Y. S., Zhong, L., Bradley, J., Schubert, W., Jo, N., Akita, J., Samuelsson, S. J., et al. (2007). Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *American Journal of Pathology*, 171(1), 53-67. doi: 10.2353/ajpath.2007.061237
- Obrosova, I. G. (2005). Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*, 7(11-12), 1543-1552. doi: 10.1089/ars.2005.7.1543
- Obrosova, I. G., Mabley, J. G., Zsengeller, Z., Charniauskaia, T., Abatan, O. I., Groves, J. T. et Szabo, C. (2005). Role for nitrosative stress in diabetic neuropathy: evidence from studies with a peroxynitrite decomposition catalyst. *FASEB Journal*, 19(3), 401-403. doi: 10.1096/fj.04-1913fje
- Okamoto, H. et Greenbaum, L. M. (1983). Isolation and structure of T-kinin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 112(2), 701-708. doi: 10.1016/0006-291x(83)91519-x
- Olivares, A. M., Althoff, K., Chen, G. F., Wu, S., Morrisson, M. A., DeAngelis, M. M. et Haider, N. (2017). Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Current Diabetes Reports*, 17(10), 93. doi: 10.1007/s11892-017-0913-0
- Ongali, B., Campos, M. M., Petcu, M., Rodi, D., Cloutier, F., Chabot, J. G., Thibault, G. et Couture, R. (2004). Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport*, 15(16), 2463-2466. doi: 10.1097/00001756-200411150-00006
- Ozaki, H., Seo, M. S., Ozaki, K., Yamada, H., Yamada, E., Okamoto, N., Hofmann, F., Wood, J. M. et Campochiaro, P. A. (2000). Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *American Journal of Pathology*, 156(2), 697-707. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64773-6
- Palm, E. (1947). On the occurrence in the retina of conditions corresponding to the blood-brain barrier. *Acta Ophthalmologica*, 25(1), 29-35. doi: 10.1111/j.1755-3768.1947.tb07542.x
- Parekh, R. U., Robidoux, J. et Sriramula, S. (2019). Kinin B1 Receptor Blockade Prevents Angiotensin II-induced Neuroinflammation and Oxidative Stress in Primary Hypothalamic Neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*. doi: 10.1007/s10571-019-00778-1
- Parenti, A., Morbidelli, L., Ledda, F., Granger, H. J. et 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 Journal*, 15(8), 1487-1489.
- Paul, M., Poyan Mehr, A. et Kreutz, R. (2006). Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiological Reviews*, 86(3), 747-803. doi: 10.1152/physrev.00036.2005
- Paul Riordan-Eva, E. (2011). *Vaughan & Asbury's general ophthalmology*. New York: McGraw-Hill Professional.
- Peichl, L. et Gonzalez-Soriano, J. (1994). Morphological types of horizontal cell in rodent retinae: a comparison of rat, mouse, gerbil, and guinea pig. *Visual Neuroscience*, 11(3), 501-517. doi: 10.1017/s095252380000242x

- Pekny, M., Wilhelmsson, U. et Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience Letters*, 565, 30-38. doi: 10.1016/j.neulet.2013.12.071
- Penn, J. S., Madan, A., Caldwell, R. B., Bartoli, M., Caldwell, R. W. et Hartnett, M. E. (2008). Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(4), 331-371. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.05.001
- Petzold, G. L. et Swenberg, J. A. (1978). Detection of DNA damage induced in vivo following exposure of rats to carcinogens. *Cancer Research*, 38(6), 1589-1594.
- Phagoo, S. B., Reddi, K., Anderson, K. D., Leeb-Lundberg, L. M. et Warburton, D. (2001). Bradykinin B1 receptor up-regulation by interleukin-1beta and B1 agonist occurs through independent and synergistic intracellular signaling mechanisms in human lung fibroblasts. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298(1), 77-85.
- Phipps, J. A., Clermont, A. C., Sinha, S., Chilcote, T. J., Bursell, S. E. et Feener, E. P. (2009). Plasma kallikrein mediates angiotensin II type 1 receptor-stimulated retinal vascular permeability. *Hypertension*, 53(2), 175-181. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.117663
- Phipps, J. A. et Feener, E. P. (2008). The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy: lessons for the kidney. *Kidney International*, 73(10), 1114-1119. doi: 10.1038/ki.2008.9
- Pieper, G. M. et Riaz ul, H. (1997). Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 30(4), 528-532. doi: 10.1097/00005344-199710000-00019
- Pons, M., Cousins, S. W., Alcazar, O., Striker, G. E. et Marin-Castano, M. E. (2011). Angiotensin II-induced MMP-2 activity and MMP-14 and basigin protein expression are mediated via the angiotensin II receptor type 1-mitogen-activated protein kinase 1 pathway in retinal pigment epithelium: implications for age-related macular degeneration. *American Journal of Pathology*, 178(6), 2665-2681. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.02.006
- Pouliot, M., Hetu, S., Lahjouji, K., Couture, R. et Vaucher, E. (2011). Modulation of retinal blood flow by kinin B(1) receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Experimental Eye Research*, 92(6), 482-489. doi: 10.1016/j.exer.2011.03.007
- Pouliot, M., Talbot, S., Senecal, J., Dotigny, F., Vaucher, E. et 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
- Qadri, F. et Bader, M. (2018). Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 22(1), 31-44. doi: 10.1080/14728222.2018.1409724
- Qaum, T., Xu, Q., Jousen, A. M., Clemens, M. W., Qin, W., Miyamoto, K., Hassessian, H., Wiegand, S. J., et al. (2001). VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(10), 2408-2413.
- Radi, Z. A., Kehrl, M. E., Jr. et Ackermann, M. R. (2001). Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 15(6), 516-529. doi: 10.1892/0891-6640(2001)015<0516:camlta>2.3.co;2
- Rajendram, R., Fraser-Bell, S., Kaines, A., Michaelides, M., Hamilton, R. D., Esposti, S. D., Peto, T., Egan, C., et al. (2012). A 2-year prospective randomized controlled trial of intravitreal bevacizumab or laser therapy (BOLT) in the management of diabetic macular edema: 24-month data: report 3. *Archives of Ophthalmology*, 130(8), 972-979. doi: 10.1001/archophthamol.2012.393
- Ramirez, J. M., Ramirez, A. I., Salazar, J. J., de Hoz, R. et Trivino, A. (2001). Changes of astrocytes in retinal ageing and age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 73(5), 601-615. doi: 10.1006/exer.2001.1061



- Ramírez, J. M., Triviño, A., Ramírez, A.I., Salazar, J.J. (1998). *Organization and Function of Astrocytes in Human Retina*. In: Castellano B., González B., Nieto-Sampedro M. (eds) *Understanding Glial Cells*. Boston, MA: Springer.
- Rashid, K., Akhtar-Schaefer, I. et Langmann, T. (2019). Microglia in Retinal Degeneration. *Frontiers in Immunology*, 10, 1975. doi: 10.3389/fimmu.2019.01975
- Regoli, D. et Barabe, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacological Reviews*, 32(1), 1-46.
- Regoli, D. et Gobeil, F. (2017). Kallikrein-kinin system as the dominant mechanism to counteract hyperactive renin-angiotensin system. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(10), 1117-1124. doi: 10.1139/cjpp-2016-0619
- Regoli, D., Rhaleb, N. E., Drapeau, G. et Dion, S. (1990). Kinin receptor subtypes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 15 Suppl 6, S30-38.
- Regoli, D., Rizzi, A., Perron, S. I. et Gobeil, F., Jr. (2001). Classification of kinin receptors. *Biological Chemistry*, 382(1), 31-35. doi: 10.1515/BC.2001.005
- Reichenbach, A. et Bringmann, A. (2013). New functions of Muller cells. *Glia*, 61(5), 651-678. doi: 10.1002/glia.22477
- Reichenbach, A., Fuchs, U., Kasper, M., el-Hifnawi, E. et Eckstein, A. K. (1995). Hepatic retinopathy: morphological features of retinal glial (Muller) cells accompanying hepatic failure. *Acta Neuropathologica*, 90(3), 273-281. doi: 10.1007/bf00296511
- Reichenbach, A., Robinson, S.R., (1995). *The involvement of Müller cells in the outer retina*. Dordrecht: Springer.
- Rezar-Dreindl, S., Sacu, S., Eibenberger, K., Pollreisz, A., Buhl, W., Georgopoulos, M., Krall, C., Weigert, G. et Schmidt-Erfurth, U. (2016). The Intraocular Cytokine Profile and Therapeutic Response in Persistent Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 57(10), 4144-4150. doi: 10.1167/iovs.16-19772
- Rieke, F. (2000). Mechanisms of single-photon detection in rod photoreceptors. *Methods in Enzymology*, 316, 186-202. doi: 10.1016/s0076-6879(00)16724-2
- Robbins, S. G., Conaway, J. R., Ford, B. L., Roberto, K. A. et Penn, J. S. (1997). Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in vascular and non-vascular cells of the normal and oxygen-injured rat retina. *Growth Factors*, 14(4), 229-241. doi: 10.3109/08977199709021522
- Rosales, M. A., Silva, K. C., Lopes de Faria, J. B. et Lopes de Faria, J. M. (2010). Exogenous SOD mimetic tempol ameliorates the early retinal changes reestablishing the redox status in diabetic hypertensive rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(8), 4327-4336. doi: 10.1167/iovs.09-4690
- Rossini, A. A., Appel, M. C., Williams, R. M. et Like, A. A. (1977). Genetic influence of the streptozotocin-induced insulinitis and hyperglycemia. *Diabetes*, 26(10), 916-920. doi: 10.2337/diab.26.10.916
- Rungger-Brandl, E., Dosso, A. A. et Leuenberger, P. M. (2000). Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 41(7), 1971-1980.
- Saito, S. (2001). Cytokine cross-talk between mother and the embryo/placenta. *Journal of Reproductive Immunology*, 52(1-2), 15-33. doi: 10.1016/s0165-0378(01)00112-7
- Sampath, A. P. et Rieke, F. (2004). Selective transmission of single photon responses by saturation at the rod-to-rod bipolar synapse. *Neuron*, 41(3), 431-443. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00005-4
- Sardi, S. P., Rey-Ares, V., Pujol-Lereis, V. A., Serrano, S. A. et Rothlin, R. P. (2002). Further pharmacological evidence of nuclear factor-kappa B pathway involvement in bradykinin

- B1 receptor-sensitized responses in human umbilical vein. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 301(3), 975-980. doi: 10.1124/jpet.301.3.975
- Sasaki, M., Ozawa, Y., Kurihara, T., Kubota, S., Yuki, K., Noda, K., Kobayashi, S., Ishida, S. et Tsubota, K. (2010). Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia*, 53(5), 971-979. doi: 10.1007/s00125-009-1655-6
- Satofuka, S., Ichihara, A., Nagai, N., Noda, K., Ozawa, Y., Fukamizu, A., Tsubota, K., Itoh, H., et al. (2008). (Pro)renin receptor promotes choroidal neovascularization by activating its signal transduction and tissue renin-angiotensin system. *American Journal of Pathology*, 173(6), 1911-1918. doi: 10.2353/ajpath.2008.080457
- Sayeski, P. P. et Kudlow, J. E. (1996). Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*, 271(25), 15237-15243. doi: 10.1074/jbc.271.25.15237
- Schaal, K. B., Rosenfeld, P. J., Gregori, G., Yehoshua, Z. et Feuer, W. J. (2016). Anatomic Clinical Trial Endpoints for Nonexudative Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*, 123(5), 1060-1079. doi: 10.1016/j.ophtha.2016.01.034
- Schafers, M. et Sorkin, L. (2008). Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neuroscience Letters*, 437(3), 188-193. doi: 10.1016/j.neulet.2008.03.052
- Schanstra, J. P., Marin-Castano, M. E., Alric, C., Pesquero, J. B., Claire, M., Girolami, J. P. et Bascands, J. L. (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. doi: 10.1016/s0162-3109(99)00054-5
- Schmetterer, L. et Polak, K. (2001). Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20(6), 823-847. doi: 10.1016/s1350-9462(01)00014-3
- Schmucker, C., Ehlken, C., Agostini, H. T., Antes, G., Ruecker, G., Lelgemann, M. et Loke, Y. K. (2012). A safety review and meta-analyses of bevacizumab and ranibizumab: off-label versus goldstandard. *PloS One*, 7(8), e42701. doi: 10.1371/journal.pone.0042701
- Schnedl, W. J., Ferber, S., Johnson, J. H. et Newgard, C. B. (1994). STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*, 43(11), 1326-1333. doi: 10.2337/diab.43.11.1326
- Scholz, J. et Woolf, C. J. (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1361-1368. doi: 10.1038/nn1992
- Scholz, R., Sobotka, M., Caramoy, A., Stempf, T., Moehle, C. et Langmann, T. (2015). Minocycline counter-regulates pro-inflammatory microglia responses in the retina and protects from degeneration. *Journal of Neuroinflammation*, 12, 209. doi: 10.1186/s12974-015-0431-4
- Schwesinger, C., Yee, C., Rohan, R. M., Jousen, A. M., Fernandez, A., Meyer, T. N., Poulaki, V., Ma, J. J., et al. (2001). Intrachoroidal neovascularization in transgenic mice overexpressing vascular endothelial growth factor in the retinal pigment epithelium. *American Journal of Pathology*, 158(3), 1161-1172. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64063-1
- Scuderi, S., D'Amico A, G., Federico, C., Saccone, S., Magro, G., Bucolo, C., Drago, F. et D'Agata, V. (2015). Different Retinal Expression Patterns of IL-1alpha, IL-1beta, and Their Receptors in a Rat Model of Type 1 STZ-Induced Diabetes. *Journal of Molecular Neuroscience*, 56(2), 431-439. doi: 10.1007/s12031-015-0505-x
- Seah, I., Zhao, X., Lin, Q., Liu, Z., Su, S. Z. Z., Yuen, Y. S., Hunziker, W., Lingam, G., et al. (2020). Use of biomaterials for sustained delivery of anti-VEGF to treat retinal diseases. *Eye (London, England)*. doi: 10.1038/s41433-020-0770-y

- Seddon, J. M., Cote, J., Page, W. F., Aggen, S. H. et Neale, M. C. (2005). The US twin study of age-related macular degeneration: relative roles of genetic and environmental influences. *Archives of Ophthalmology*, 123(3), 321-327. doi: 10.1001/archophth.123.3.321
- Seddon, J. M., George, S., Rosner, B. et Klein, M. L. (2006). CFH gene variant, Y402H, and smoking, body mass index, environmental associations with advanced age-related macular degeneration. *Human Heredity*, 61(3), 157-165. doi: 10.1159/000094141
- Seddon, J. M., Silver, R. E., Kwong, M. et Rosner, B. (2015). Risk Prediction for Progression of Macular Degeneration: 10 Common and Rare Genetic Variants, Demographic, Environmental, and Macular Covariates. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(4), 2192-2202. doi: 10.1167/iovs.14-15841
- Sennlaub, F., Auvynet, C., Calippe, B., Lavalette, S., Poupel, L., Hu, S. J., Dominguez, E., Camelo, S., et al. (2013). CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Molecular Medicine*, 5(11), 1775-1793. doi: 10.1002/emmm.201302692
- Sennlaub, F., Courtois, Y. et Goureau, O. (2001). Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 107(6), 717-725. doi: 10.1172/JCI10874
- Sennlaub, F., Courtois, Y. et Goureau, O. (2002). Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy. *Journal of Neuroscience*, 22(10), 3987-3993. doi: 20026405
- Shakib, M. et Cunha-Vaz, J. G. (1966). Studies on the permeability of the blood-retinal barrier. IV. Junctional complexes of the retinal vessels and their role in the permeability of the blood-retinal barrier. *Experimental Eye Research*, 5(3), 229-234. doi: 10.1016/s0014-4835(66)80011-8
- Shaw, J. E., Sicree, R. A. et Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 87(1), 4-14. doi: 10.1016/j.diabres.2009.10.007
- Shaw, P. X., Zhang, L., Zhang, M., Du, H., Zhao, L., Lee, C., Grob, S., Lim, S. L., et al. (2012). Complement factor H genotypes impact risk of age-related macular degeneration by interaction with oxidized phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(34), 13757-13762. doi: 10.1073/pnas.1121309109
- She, H., Nakazawa, T., Matsubara, A., Hisatomi, T., Young, T. A., Michaud, N., Connolly, E., Hafezi-Moghadam, A., et al. (2007). Reduced photoreceptor damage after photodynamic therapy through blockade of nitric oxide synthase in a model of choroidal neovascularization. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(5), 2268-2277. doi: 10.1167/iovs.06-0979
- Sheetz, M. J. et King, G. L. (2002). Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*, 288(20), 2579-2588. doi: 10.1001/jama.288.20.2579
- Shimizu, F., Sano, Y., Haruki, H. et Kanda, T. (2011). Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF-beta and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. *Diabetologia*, 54(6), 1517-1526. doi: 10.1007/s00125-011-2107-7
- Simo, R., Carrasco, E., Garcia-Ramirez, M. et Hernandez, C. (2006). Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Current Diabetes Reviews*, 2(1), 71-98. doi: 10.2174/157339906775473671

- Simo, R. et Hernandez, C. (2015). Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence. *Progress in Retinal and Eye Research*, 48, 160-180. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.04.003
- Simo, R., Stitt, A. W. et Gardner, T. W. (2018). Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia*, 61(9), 1902-1912. doi: 10.1007/s00125-018-4692-1
- Simo, R., Sundstrom, J. M. et Antonetti, D. A. (2014). Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, 37(4), 893-899. doi: 10.2337/dc13-2002
- Simo, R., Villarroel, M., Corraliza, L., Hernandez, C. et Garcia-Ramirez, M. (2010). The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 190724. doi: 10.1155/2010/190724
- Singh, R. P., Lehmann, R., Martel, J., Jong, K., Pollack, A., Tsorbatzoglou, A., Staurengi, G., Cervantes-Coste Cervantes, G., et al. (2017). Nepafenac 0.3% after Cataract Surgery in Patients with Diabetic Retinopathy: Results of 2 Randomized Phase 3 Studies. *Ophthalmology*, 124(6), 776-785. doi: 10.1016/j.ophtha.2017.01.036
- Singh, S. R., Stewart, M. W., Chattannavar, G., Ashraf, M., Souka, A., ElDardeery, M., Wadhwa, N., Sarvaiya, C., et al. (2019). Safety of 5914 intravitreal ziv-aflibercept injections. *British Journal of Ophthalmology*, 103(6), 805-810. doi: 10.1136/bjophthalmol-2018-312453
- Sjolie, A. K., Klein, R., Porta, M., Orchard, T., Fuller, J., Parving, H. H., Bilous, R., Aldington, S. et Chaturvedi, N. (2011). Retinal microaneurysm count predicts progression and regression of diabetic retinopathy. Post-hoc results from the DIRECT Programme. *Diabetic Medicine*, 28(3), 345-351. doi: 10.1111/j.1464-5491.2010.03210.x
- Sobrin, L. et Seddon, J. M. (2014). Nature and nurture- genes and environment- predict onset and progression of macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 40, 1-15. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.004
- Sone, H., Kawakami, Y., Okuda, Y., Kondo, S., Hanatani, M., Suzuki, H. et Yamashita, K. (1996). Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 221(1), 193-198. doi: 10.1006/bbrc.1996.0568
- Soubrier, F., Alhenc-Gelas, F., Hubert, C., Allegrini, J., John, M., Tregear, G. et Corvol, P. (1988). Two putative active centers in human angiotensin I-converting enzyme revealed by molecular cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(24), 9386-9390. doi: 10.1073/pnas.85.24.9386
- Spaide, R. F. (2013). Outer retinal atrophy after regression of subretinal drusenoid deposits as a newly recognized form of late age-related macular degeneration. *Retina*, 33(9), 1800-1808. doi: 10.1097/IAE.0b013e31829c3765
- Sriramula, S. (2020). Kinin B1 receptor: A target for neuroinflammation in hypertension. *Pharmacological Research*, 155, 104715. doi: 10.1016/j.phrs.2020.104715
- Stadnicki, A. (2011). Intestinal tissue kallikrein-kinin system in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 17(2), 645-654. doi: 10.1002/ibd.21337
- Stein, C. A. et Castanotto, D. (2017). FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Molecular Therapy*, 25(5), 1069-1075. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.023
- Stewart, M. W. (2012). The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(1), 77-88. doi: 10.1016/j.mayocp.2011.10.001

- Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T. et Keshet, E. (1995). Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *Journal of Neuroscience*, *15*(7 Pt 1), 4738-4747.
- Strain, W. D. et Chaturvedi, N. (2002). The renin-angiotensin-aldosterone system and the eye in diabetes. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, *3*(4), 243-246. doi: 10.3317/jraas.2002.045
- Stringham, J. M. et Stringham, N. T. (2015). Nitric Oxide and Lutein: Function, Performance, and Protection of Neural Tissue. *Foods*, *4*(4), 678-689. doi: 10.3390/foods4040678
- Stuehr, D. J. (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *37*, 339-359. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.37.1.339
- Sugiyama, T., Okuno, T., Fukuhara, M., Oku, H., Ikeda, T., Obayashi, H., Ohta, M., Fukui, M., et al. (2007). Angiotensin II receptor blocker inhibits abnormal accumulation of advanced glycation end products and retinal damage in a rat model of type 2 diabetes. *Experimental Eye Research*, *85*(3), 406-412. doi: 10.1016/j.exer.2007.06.008
- Sun, J. K., Maturi, R. K., Boyer, D. S., Wells, J. A., Gonzalez, V. H., Tansley, R., Hernandez, H., Maetzel, A., et al. (2019). One-Time Intravitreal Injection of KVD001, a Plasma Kallikrein Inhibitor, in Patients with Central-Involved Diabetic Macular Edema and Reduced Vision: An Open-Label Phase 1B Study. *Ophthalmol Retina*, *3*(12), 1107-1109. doi: 10.1016/j.oret.2019.07.006
- Sutton, C. E., Lator, S. J., Sweeney, C. M., Brereton, C. F., Lavelle, E. C. et Mills, K. H. (2009). Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*, *31*(2), 331-341. doi: 10.1016/j.immuni.2009.08.001
- Suzuma, K., Takahara, N., Suzuma, I., Isshiki, K., Ueki, K., Leitges, M., Aiello, L. P. et King, G. L. (2002). Characterization of protein kinase C beta isoform's action on retinoblastoma protein phosphorylation, vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell proliferation, and retinal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(2), 721-726. doi: 10.1073/pnas.022644499
- Szel, A. et Rohlich, P. (1992). Two cone types of rat retina detected by anti-visual pigment antibodies. *Experimental Eye Research*, *55*(1), 47-52. doi: 10.1016/0014-4835(92)90090-f
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological Research*, *50*(6), 537-546.
- Takeda, H., Kimura, Y., Higashida, H. et Yokoyama, S. (1999). Localization of B2 bradykinin receptor mRNA in the rat retina and sclerocornea. *Immunopharmacology*, *45*(1-3), 51-55. doi: 10.1016/s0162-3109(99)00057-0
- Talbot, S., Chahmi, E., Dias, J. P. et Couture, R. (2010). Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *Journal of Neuroinflammation*, *7*(1), 36. doi: 10.1186/1742-2094-7-36
- Talbot, S. et Couture, R. (2012). Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy. *Experimental Neurology*, *234*(2), 373-381. doi: 10.1016/j.expneurol.2011.11.032
- Talbot, S., Lin, J. C., Lahjouji, K., Roy, J. P., Senecal, J., Morin, A. et Couture, R. (2011). Cigarette smoke-induced kinin B1 receptor promotes NADPH oxidase activity in cultured human alveolar epithelial cells. *Peptides*, *32*(7), 1447-1456. doi: 10.1016/j.peptides.2011.05.005
- Talbot, S., Theberge-Turmel, P., Liazoghli, D., Senecal, J., Gaudreau, P. et 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. *Journal of Neuroinflammation*, *6*, 11. doi: 10.1186/1742-2094-6-11

- Tang, J. et Kern, T. S. (2011). Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 30(5), 343-358. doi: 10.1016/j.preteyeres.2011.05.002
- Tang, M., Liu, P., Li, X., Wang, J. W., Zhu, X. C. et He, F. P. (2017). Protective action of B1R antagonist against cerebral ischemia-reperfusion injury through suppressing miR-200c expression of Microglia-derived microvesicles. *Neurological Research*, 39(7), 612-620. doi: 10.1080/01616412.2016.1275096
- Tanito, M., Hara, K., Takai, Y., Matsuoka, Y., Nishimura, N., Jansook, P., Loftsson, T., Stefansson, E. et Ohira, A. (2011). Topical dexamethasone-cyclodextrin microparticle eye drops for diabetic macular edema. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(11), 7944-7948. doi: 10.1167/iovs.11-8178
- Terzuoli, E., Morbidelli, L., Nannelli, G., Giachetti, A., Donnini, S. et Ziche, M. (2018). Involvement of Bradykinin B2 Receptor in Pathological Vascularization in Oxygen-Induced Retinopathy in Mice and Rabbit Cornea. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2). doi: 10.3390/ijms19020330
- Thakkinstian, A., Bowe, S., McEvoy, M., Smith, W. et Attia, J. (2006). Association between apolipoprotein E polymorphisms and age-related macular degeneration: A HuGE review and meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 164(9), 813-822. doi: 10.1093/aje/kwj279
- Thomas, A. S., Redd, T. et Hwang, T. (2015). Effect of Systemic Beta-Blockers, Ace Inhibitors, and Angiotensin Receptor Blockers on Development of Choroidal Neovascularization in Patients with Age-Related Macular Degeneration. *Retina*, 35(10), 1964-1968. doi: 10.1097/IAE.0000000000000603
- Tidjane, N., Gaboury, L. et 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. *Biological Chemistry*, 397(4), 323-336. doi: 10.1515/hsz-2015-0230
- Toda, R., Kawazu, K., Oyabu, M., Miyazaki, T. et Kiuchi, Y. (2011). Comparison of drug permeabilities across the blood-retinal barrier, blood-aqueous humor barrier, and blood-brain barrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(9), 3904-3911. doi: 10.1002/jps.22610
- Toledo, C., Matus, C. E., Barraza, X., Arroyo, P., Ehrenfeld, P., Figueroa, C. D., Bhoola, K. D., Del Pozo, M. et Poblete, M. T. (2012). Expression of HER2 and bradykinin B(1) receptors in precursor lesions of gallbladder carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*, 18(11), 1208-1215. doi: 10.3748/wjg.v18.i11.1208
- Tonussi, C. R. et Ferreira, S. H. (1997). Bradykinin-induced knee joint incapacitation involves bradykinin B2 receptor mediated hyperalgesia and bradykinin B1 receptor-mediated nociception. *European Journal of Pharmacology*, 326(1), 61-65. doi: 10.1016/s0014-2999(97)00153-2
- Tornquist, P. et Alm, A. (1979). Retinal and choroidal contribution to retinal metabolism in vivo. A study in pigs. *Acta Physiologica Scandinavica*, 106(3), 351-357. doi: 10.1111/j.1748-1716.1979.tb06409.x
- Tsutsumi, Y., Matsubara, H., Masaki, H., Kurihara, H., Murasawa, S., Takai, S., Miyazaki, M., Nozawa, Y., et al. (1999). Angiotensin II type 2 receptor overexpression activates the vascular kinin system and causes vasodilation. *Journal of Clinical Investigation*, 104(7), 925-935. doi: 10.1172/JCI7886
- van der Werf, N., Kroese, F. G., Rozing, J. et Hillebrands, J. L. (2007). Viral infections as potential triggers of type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 23(3), 169-183. doi: 10.1002/dmrr.695

- van Eeden, P. E., Tee, L., Shen, W. Y., Lukehurst, S., Lai, C. M., Rakoczy, P. E., Beazley, L. D. et Dunlop, S. A. (2006). Characterisation of a model for retinal neovascularisation. VEGF model characterisation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 572, 163-168. doi: 10.1007/0-387-32442-9\_24
- Vannini, F., Kashfi, K. et Nath, N. (2015). The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol*, 6, 334-343. doi: 10.1016/j.redox.2015.08.009
- Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X. et Sharma, S. C. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 51, 1-40. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.003
- Vejakama, P., Thakkinstian, A., Lertrattananon, D., Ingsathit, A., Ngarmukos, C. et Attia, J. (2012). Reno-protective effects of renin-angiotensin system blockade in type 2 diabetic patients: a systematic review and network meta-analysis. *Diabetologia*, 55(3), 566-578. doi: 10.1007/s00125-011-2398-8
- Viallard, C. et Larrivee, B. (2017). Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, 20(4), 409-426. doi: 10.1007/s10456-017-9562-9
- Vielma, A. H., Retamal, M. A. et Schmachtenberg, O. (2012). Nitric oxide signaling in the retina: what have we learned in two decades? *Brain Research*, 1430, 112-125. doi: 10.1016/j.brainres.2011.10.045
- Walker, K., Dray, A. et Perkins, M. (1996). Hyperalgesia in rats following intracerebroventricular administration of endotoxin: effect of bradykinin B1 and B2 receptor antagonist treatment. *Pain*, 65(2-3), 211-219. doi: 10.1016/0304-3959(95)00195-6
- Wang, B., Wang, F., Zhang, Y., Zhao, S. H., Zhao, W. J., Yan, S. L. et Wang, Y. G. (2015). Effects of RAS inhibitors on diabetic retinopathy: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 3(4), 263-274. doi: 10.1016/S2213-8587(14)70256-6
- Wang, P. H., Campanholle, G., Cenedeze, M. A., Feitoza, C. Q., Goncalves, G. M., Landgraf, R. G., Jancar, S., Pesquero, J. B., et al. (2008). Bradykinin [corrected] B1 receptor antagonism is beneficial in renal ischemia-reperfusion injury. *PloS One*, 3(8), e3050. doi: 10.1371/journal.pone.0003050
- Wang, X., Zhao, L., Zhang, J., Fariss, R. N., Ma, W., Kretschmer, F., Wang, M., Qian, H. H., et al. (2016). Requirement for Microglia for the Maintenance of Synaptic Function and Integrity in the Mature Retina. *Journal of Neuroscience*, 36(9), 2827-2842. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3575-15.2016
- Wang, Y., Wang, V. M. et Chan, C. C. (2011). The role of anti-inflammatory agents in age-related macular degeneration (AMD) treatment. *Eye (London, England)*, 25(2), 127-139. doi: 10.1038/eye.2010.196
- Wassle, H. et Boycott, B. B. (1991). Functional architecture of the mammalian retina. *Physiological Reviews*, 71(2), 447-480. doi: 10.1152/physrev.1991.71.2.447
- Watanabe, T., Mio, Y., Hoshino, F. B., Nagamatsu, S., Hirose, K. et Nakahara, K. (1994). GLUT2 expression in the rat retina: localization at the apical ends of Muller cells. *Brain Research*, 655(1-2), 128-134. doi: 10.1016/0006-8993(94)91606-3
- Webb, J. G. (2011). The kallikrein/kinin system in ocular function. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 27(6), 539-543. doi: 10.1089/jop.2011.0187
- Weber, B. H., Charbel Issa, P., Pauly, D., Herrmann, P., Grassmann, F. et Holz, F. G. (2014). The role of the complement system in age-related macular degeneration. *Dtsch Arztebl Int*, 111(8), 133-138. doi: 10.3238/arztebl.2014.0133
- Wei, L., Alhenc-Gelas, F., Soubrier, F., Michaud, A., Corvol, P. et Clauser, E. (1991). Expression and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for

- a C-terminal transmembrane anchor and for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 266(9), 5540-5546.
- Wendt, T. M., Tanji, N., Guo, J., Kislinger, T. R., Qu, W., Lu, Y., Bucciarelli, L. G., Rong, L. L., et al. (2003). RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *American Journal of Pathology*, 162(4), 1123-1137. doi: 10.1016/S0002-9440(10)63909-0
- Wheeler-Schilling, T. H., Kohler, K., Sautter, M. et Guenther, E. (1999). Angiotensin II receptor subtype gene expression and cellular localization in the retina and non-neuronal ocular tissues of the rat. *European Journal of Neuroscience*, 11(10), 3387-3394. doi: 10.1046/j.1460-9568.1999.00787.x
- White, A. J., Cheruvu, S. C., Sarris, M., Liyanage, S. S., Lumbers, E., Chui, J., Wakefield, D. et McCluskey, P. J. (2015). Expression of classical components of the renin-angiotensin system in the human eye. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System*, 16(1), 59-66. doi: 10.1177/1470320314549791
- Wilkinson-Berka, J. L. et Fletcher, E. L. (2004). Angiotensin and bradykinin: targets for the treatment of vascular and neuro-glial pathology in diabetic retinopathy. *Current Pharmaceutical Design*, 10(27), 3313-3330.
- Wilkinson-Berka, J. L., Suphapimol, V., Jerome, J. R., Deliyanti, D. et Allingham, M. J. (2019). Angiotensin II and aldosterone in retinal vasculopathy and inflammation. *Experimental Eye Research*, 187, 107766. doi: 10.1016/j.exer.2019.107766
- Williams, B., Gallacher, B., Patel, H. et 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), 1497-1503. doi: 10.2337/diab.46.9.1497
- Wink, D. A. et Mitchell, J. B. (1998). Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 25(4-5), 434-456. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00092-6
- Witkovsky, P., Stone, S. et Ripps, H. (1985). Pharmacological modification of the light-induced responses of Muller (glial) cells in the amphibian retina. *Brain Research*, 328(1), 111-120. doi: 10.1016/0006-8993(85)91329-0
- Wong, T. Y., Cheung, C. M., Larsen, M., Sharma, S. et Simo, R. (2016). Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers*, 2, 16012. doi: 10.1038/nrdp.2016.12
- Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M., Klein, R., Cheng, C. Y. et Wong, T. Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*, 2(2), e106-116. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70145-1
- Wooff, Y., Man, S. M., Aggio-Bruce, R., Natoli, R. et Fernando, N. (2019). IL-1 Family Members Mediate Cell Death, Inflammation and Angiogenesis in Retinal Degenerative Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, 1618. doi: 10.3389/fimmu.2019.01618
- Wu, K. H., Madigan, M. C., Billson, F. A. et Penfold, P. L. (2003). Differential expression of GFAP in early v late AMD: a quantitative analysis. *British Journal of Ophthalmology*, 87(9), 1159-1166. doi: 10.1136/bjo.87.9.1159
- Xu, J., Chen, L. J., Yu, J., Wang, H. J., Zhang, F., Liu, Q. et Wu, J. (2018). Involvement of Advanced Glycation End Products in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48(2), 705-717. doi: 10.1159/000491897
- Xu, X., Liu, X., Wang, X., Clark, M. E., McGwin, G., Jr., Owsley, C., Curcio, C. A. et Zhang, Y. (2017). Retinal Pigment Epithelium Degeneration Associated With Subretinal Drusenoid



- Deposits in Age-Related Macular Degeneration. *American Journal of Ophthalmology*, 175, 87-98. doi: 10.1016/j.ajo.2016.11.021
- Xu, Y. et Tan, C. S. (2017). Safety and complications of intravitreal injections performed in an Asian population in Singapore. *International Ophthalmology*, 37(2), 325-332. doi: 10.1007/s10792-016-0241-4
- Yamada, Y., Ishibashi, K., Ishibashi, K., Bhutto, I. A., Tian, J., Luty, G. A. et Handa, J. T. (2006). The expression of advanced glycation endproduct receptors in rpe cells associated with basal deposits in human maculas. *Experimental Eye Research*, 82(5), 840-848. doi: 10.1016/j.exer.2005.10.005
- Yamagishi, S. et Matsui, T. (2011). Nitric oxide, a janus-faced therapeutic target for diabetic microangiopathy-Friend or foe? *Pharmacological Research*, 64(3), 187-194. doi: 10.1016/j.phrs.2011.05.009
- Yamagishi, S., Takeuchi, M., Matsui, T., Nakamura, K., Imaizumi, T. et Inoue, H. (2005). Angiotensin II augments advanced glycation end product-induced pericyte apoptosis through RAGE overexpression. *FEBS Letters*, 579(20), 4265-4270. doi: 10.1016/j.febslet.2005.06.058
- Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J. et Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801), 242-248. doi: 10.1038/35025215
- Yang, H. Y., Erdos, E. G. et Levin, Y. (1970). A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 214(2), 374-376. doi: 10.1016/0005-2795(70)90017-6
- Yang, H. Y., Erdos, E. G. et Levin, Y. (1971). Characterization of a dipeptide hydrolase (kininase II: angiotensin I converting enzyme). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 177(1), 291-300.
- Yang, Y. et Santamaria, P. (2006). Lessons on autoimmune diabetes from animal models. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 110(6), 627-639. doi: 10.1042/CS20050330
- Yerneni, K. K., Bai, W., Khan, B. V., Medford, R. M. et Natarajan, R. (1999). Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*, 48(4), 855-864. doi: 10.2337/diabetes.48.4.855
- Yonekura, H., Sakurai, S., Liu, X., Migita, H., Wang, H., Yamagishi, S., Nomura, M., Abedin, M. J., et al. (1999). Placenta growth factor and vascular endothelial growth factor B and C expression in microvascular endothelial cells and pericytes. Implication in autocrine and paracrine regulation of angiogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 274(49), 35172-35178. doi: 10.1074/jbc.274.49.35172
- Zamora, R., Vodovotz, Y., Aulak, K. S., Kim, P. K., Kane, J. M., 3rd, Alarcon, L., Stuehr, D. J. et Billiar, T. R. (2002). A DNA microarray study of nitric oxide-induced genes in mouse hepatocytes: implications for hepatic heme oxygenase-1 expression in ischemia/reperfusion. *Nitric Oxide*, 7(3), 165-186. doi: 10.1016/s1089-8603(02)00104-0
- Zarbin, M. A. (2004). Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Archives of Ophthalmology*, 122(4), 598-614. doi: 10.1001/archopht.122.4.598
- Zelawski, W., Machnik, G., Nowaczyk, G., Plewka, D., Lorenc, Z., Sosada, K. et Stadnicki, A. (2006). Expression and localisation of kinin receptors in colorectal polyps. *International Immunopharmacology*, 6(6), 997-1002. doi: 10.1016/j.intimp.2006.01.016
- Zeng, S., Hernandez, J. et Mullins, R. F. (2012). Effects of antioxidant components of AREDS vitamins and zinc ions on endothelial cell activation: implications for macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(2), 1041-1047. doi: 10.1167/iovs.11-8531

- Zeng, X. X., Ng, Y. K. et Ling, E. A. (2000). Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Visual Neuroscience*, 17(3), 463-471. doi: 10.1017/s0952523800173122
- Zhang, J., Wu, Y., Jin, Y., Ji, F., Sinclair, S. H., Luo, Y., Xu, G., Lu, L., et al. (2008). Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 49(2), 732-742. doi: 10.1167/iov.07-0721
- Zhang, Q., Zhang, J., Guan, Y., Zhang, S., Zhu, C., Xu, G. T. et Wang, L. (2009). Suppression of retinal neovascularization by the iNOS inhibitor aminoguanidine in mice of oxygen-induced retinopathy. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 247(7), 919-927. doi: 10.1007/s00417-009-1066-x
- Zhang, S. X., Wang, J. J., Gao, G., Parke, K. et Ma, J. X. (2006a). Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy. *Journal of Molecular Endocrinology*, 37(1), 1-12. doi: 10.1677/jme.1.02008
- Zhang, S. X., Wang, J. J., Gao, G., Shao, C., Mott, R. et Ma, J. X. (2006b). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) is an endogenous antiinflammatory factor. *FASEB Journal*, 20(2), 323-325. doi: 10.1096/fj.05-4313fje
- Zhang, Y., Brovkovich, V., Brovkovich, S., Tan, F., Lee, B. S., Sharma, T. et Skidgel, R. A. (2007). Dynamic receptor-dependent activation of inducible nitric-oxide synthase by ERK-mediated phosphorylation of Ser745. *Journal of Biological Chemistry*, 282(44), 32453-32461. doi: 10.1074/jbc.M706242200
- Zhao, L., Zabel, M. K., Wang, X., Ma, W., Shah, P., Fariss, R. N., Qian, H., Parkhurst, C. N., et al. (2015a). Microglial phagocytosis of living photoreceptors contributes to inherited retinal degeneration. *EMBO Molecular Medicine*, 7(9), 1179-1197. doi: 10.15252/emmm.201505298
- Zhao, M., Bai, Y., Xie, W., Shi, X., Li, F., Yang, F., Sun, Y., Huang, L. et Li, X. (2015b). Interleukin-1beta Level Is Increased in Vitreous of Patients with Neovascular Age-Related Macular Degeneration (nAMD) and Polypoidal Choroidal Vasculopathy (PCV). *PloS One*, 10(5), e0125150. doi: 10.1371/journal.pone.0125150
- Zheng, L., Du, Y., Miller, C., Gubitosi-Klug, R. A., Kern, T. S., Ball, S. et Berkowitz, B. A. (2007). Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 50(9), 1987-1996. doi: 10.1007/s00125-007-0734-9
- Zheng, L. et Kern, T. S. (2009). Role of nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14, 3974-3987. doi: 10.2741/3505
- Zhou, C., Pridgen, B., King, N., Xu, J. et Breslow, J. L. (2011). Hyperglycemic Ins2AkitaLdlr(-)/(-) mice show severely elevated lipid levels and increased atherosclerosis: a model of type 1 diabetic macrovascular disease. *Journal of Lipid Research*, 52(8), 1483-1493. doi: 10.1194/jlr.M014092



# Bradykinin Type 1 Receptor – Inducible Nitric Oxide Synthase: A New Axis Implicated in Diabetic Retinopathy

Rahmeh Othman<sup>1,2</sup>, Elvire Vaucher<sup>1</sup> and Réjean Couture<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> School of Optometry, University of Montreal, Montreal, QC, Canada, <sup>2</sup> Department of Pharmacology and Physiology, University of Montreal, Montreal, QC, Canada

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Stefania Tacconelli,  
Università degli Studi G. d'Annunzio  
Chieti e Pescara, Italy

### Reviewed by:

Tapas C. Nag,  
All India Institute of Medical Sciences,  
India  
Federica Finetti,  
University of Siena, Italy

### \*Correspondence:

Réjean Couture  
rejean.couture@umontreal.ca

### Specialty section:

This article was submitted to  
Inflammation Pharmacology,  
a section of the journal  
Frontiers in Pharmacology

Received: 19 December 2018

Accepted: 11 March 2019

Published: 29 March 2019

### Citation:

Othman R, Vaucher E and  
Couture R (2019) Bradykinin Type 1  
Receptor – Inducible Nitric Oxide  
Synthase: A New Axis Implicated in  
Diabetic Retinopathy.  
Front. Pharmacol. 10:300.  
doi: 10.3389/fphar.2019.00300

Compelling evidence suggests a role for the inducible nitric oxide synthase, iNOS, and the bradykinin type 1 receptor (B1R) in diabetic retinopathy, including a possible control of the expression and activity of iNOS by B1R. In diabetic retina, both iNOS and B1R contribute to inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction. The present study investigated whether inhibition of iNOS has any impact on inflammatory/oxidative stress markers and on the B1R-iNOS expression, distribution, and action in a model of type I diabetes. Diabetes was induced in 6-week-old Wistar rats by streptozotocin (65 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p.). The selective iNOS inhibitor 1400W (150 μg.10 μl<sup>-1</sup>) was administered twice a day by eye-drops during the second week of diabetes. The retinae were collected 2 weeks after diabetes induction to assess the protein and gene expression of markers by Western blot and qRT-PCR, the distribution of iNOS and B1R by fluorescence immunocytochemistry, and the vascular permeability by the Evans Blue dye technique. Diabetic retinae showed enhanced expression of iNOS, B1R, carboxypeptidase M (involved in the biosynthesis of B1R agonists), IL-1β, TNF-α, vascular endothelium growth factor A (VEGF-A) and its receptor, VEGF-R2, nitrosylated proteins and increased vascular permeability. All those changes were reversed by treatment with 1400W. Moreover, the additional increase in vascular permeability in diabetic retina induced by intravitreal injection of R-838, a B1R agonist, was also prevented by 1400W. Immunofluorescence staining highlighted strong colocalization of iNOS and B1R in several layers of the diabetic retina, which was prevented by 1400W. This study suggests a critical role for iNOS and B1R in the early stage of diabetic retinopathy. B1R and iNOS appear to partake in a mutual auto-induction and amplification loop to enhance nitrogen species formation and inflammation in diabetic retina. Hence, B1R-iNOS axis deserves closer scrutiny in targeting diabetic retinopathy.

**Keywords:** diabetic retinopathy, bradykinin type 1 receptor, inducible nitric oxide synthase, kallikrein-kinin system, inflammation, oxidative stress

**Abbreviations:** 1400W, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine; BK, bradykinin; B1R, bradykinin type 1 receptor; B2R, bradykinin type 2 receptor; CRL, Cones and rods layer; CPM, carboxypeptidase M; DR, diabetic retinopathy; GCL, ganglion cell layer; IL-1β, interleukin-1β; INL, inner nuclear layer; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IPL, inner plexiform layer; KD, kallidin; NO, nitric oxide; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; RPE, retinal pigmented epithelium; R-838, Sar-[D-Phe<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-BK; STZ, streptozotocin; TNF-α, tumor necrosis factor-α; VEGF-A, vascular endothelial growth factor; VEGF-R2, receptor type 2 of VEGF.

## INTRODUCTION

DR is a major complication of diabetes mellitus and the leading cause of blindness in working-age adults (Fong et al., 2004). Most patients with type I diabetes develop retinopathy in the first two decades of the disease (Fong et al., 2004). In its early stage, DR is asymptomatic even though the development of vascular bed damage involving changes in retinal vessel diameter, alterations in retinal hemodynamics, increase in leakage of the blood-retinal barrier, overexpression, and accumulation of vascular endothelial growth factor, VEGF (Cheung et al., 2010). This vascular damage progresses into retinal hemorrhage, hard exudates and the appearance of microaneurysms.

Current therapeutic interventions are used only for the late stage of DR when microvascular complications have already resulted in irreversible structural changes. These treatments, including the intravitreal injections of anti-VEGF and laser photocoagulation, are invasive, need to be repeated regularly and are only able to stop the progression of DR without restoring the loss of vision (Fong et al., 2004). Therefore, more effective treatments are needed to intervene in an early stage of DR. Many studies have shown an implication of several pro-inflammatory and oxidative stress mediators in the early stage of this ocular disease (Bhat et al., 2014). Among them, the inducible isoform of NO synthase (iNOS) is overexpressed and activated in ischemic and diabetic rodent retinae (Carmo et al., 2000; Sennlaub et al., 2001, 2002; Ellis et al., 2002; Yuasa et al., 2008; Rosales et al., 2010; Silva et al., 2010) and in diabetic human retina (Abu El-Asrar et al., 2001, 2004). NO is a potent vasodilatory gas and is considered as a free radical due to the presence of an unpaired electron in its valence shell. Being highly reactive, especially with the superoxide anions, NO largely contributes to the oxidative stress, inducing retinal cells damage. Thus, compelling evidence suggests that iNOS is implicated in the onset of DR (Zheng et al., 2007; Mishra and Newman, 2010).

Under physiological situation, NO produced at low amounts by the constitutive isoforms of NOS, endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS), plays, however, an important role in ocular hemodynamics and cell viability (Toda and Nakanishi-Toda, 2007), being involved in vasodilation, neurotransmission and host cell defense (Christopherson and Brecht, 1997). However, NO produced at high concentrations by iNOS, leads to tissue injury, neurodegeneration, cell apoptosis (Christopherson and Brecht, 1997; Toda and Nakanishi-Toda, 2007), and inflammatory responses (Korhonen et al., 2005; Ricciardolo et al., 2006). Moreover, excess of NO can lead to the formation of peroxynitrite (Goureau et al., 1999; Ellis et al., 2002; Rosales et al., 2010; Hao et al., 2012), which is associated with DR and degenerative diseases.

Earlier studies have shown that the iNOS inhibitor, aminoguanidine, inhibited NO production, protein nitration, iNOS expression, vascular dysfunction, and retinal cell death in diabetic rats (Corbett et al., 1992; Du et al., 2002, 2004). Aminoguanidine also prevented the development of microvascular lesions (retinal microaneurysms, acellular

capillaries, and pericyte ghosts) in type 1 diabetic dogs over a period of 5 years (Kern and Engerman, 2001). In streptozotocin (STZ)-induced diabetes in Long-Evans rats, aminoguanidine and 1400W (a more selective and potent iNOS inhibitor) restored light- and glial-evoked vasodilation in the retina, suggesting a role for iNOS in the loss of functional hyperemia due to aberrant glia-to-vessel signaling (Mishra and Newman, 2010). In a mouse model of oxygen-induced retinopathy, genetic deletion of iNOS or its blockade with 1400W increased physiological neovascularization and blunted the pathological intravitreal neovascularization (Sennlaub et al., 2001). In the same murine model, authors showed that iNOS is implicated in retinal degeneration through apoptosis (Sennlaub et al., 2002).

The kallikrein-kinin system is also involved in the development of DR (Wilkinson-Berka and Fletcher, 2004; Feener, 2010; Bhat et al., 2014). BK and KD are the agonists of the constitutive B2 receptor (B2R) while their metabolites produced by the CPM (Des-Arg<sup>9</sup>-BK and Des-Arg<sup>10</sup>-KD) are the preferred agonists of the inducible B1 receptor (B1R) (Regoli and Barabe, 1980; Regoli et al., 1998). Kinin receptors play an important role in the regulation of local blood flow, tissue edema, vasodilation, and leukocytes infiltration (Couture et al., 2001). B2R plays a vasodilator and vasoprotector role through activation of eNOS and prostanoids. B1R is undetectable in physiological conditions; it is induced in pathological conditions by pro-inflammatory cytokines and by oxidative stress associated with hyperglycemia (Leeb-Lundberg et al., 2005; Couture et al., 2014). The inducible B1R is implicated in complications of type 1 and type 2 diabetes (Couture et al., 2014), notably in DR. B1R was upregulated by an oxidative stress mechanism in the retina of STZ-diabetic rats (Abdoun et al., 2003, 2008; Pouliot et al., 2012) and its ocular blockade prevented the development of the pathogenesis of DR (Pouliot et al., 2012; Hachana et al., 2018). It was also shown that B1R is associated with the oxidative stress in the optic nerve and cortical visual area of 1 and 4 weeks STZ-diabetic rats (Catanzaro et al., 2017). It is worth noting that B1R activates iNOS through G $\alpha$ i/ERK/MAPK signaling pathways in HEK293 cells (Brovkovich et al., 2011) and B1R antagonism reverses iNOS overexpression in the retina and pancreas of STZ-diabetic rats (Pouliot et al., 2012; Tidjane et al., 2016). These studies suggested that B1R is located upstream to iNOS activation and expression in diabetes.

To better understand the B1R-iNOS relationship in DR, we investigated the expression and distribution of B1R and iNOS in 2 weeks STZ-diabetic retinae to enable comparison with previous studies using B1R antagonists (Pouliot et al., 2012; Hachana et al., 2018). The impact of the iNOS inhibitor 1400W was determined on the expression of inflammatory mediators, notably iNOS, kallikrein-kinin system molecules, including carboxypeptidase M (CPM) which controls the activation of B1R, and VEGF which is involved in many aspects of vascular damage (Hoebe et al., 2004). The effect of 1400W on diabetes-induced nitrosative stress and retinal vascular permeability and on vascular hyperpermeability induced by a B1R agonist was also evaluated. This study highlights a partnership between B1R and iNOS in DR.

## MATERIALS AND METHODS

### Model of STZ-Diabetic Rat

All experimental methods and animal care procedures were approved by the animal care committee of the Université de Montréal (Protocols 15-063, 16-059, and 17-057), 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). Six-week-old male Wistar rats weighing between 200 and 225 g were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada) and housed two per cage in a room under standard conditions (22.5°C and 42.5% humidity, on a 12 h/12 h light-dark cycle), with a standard chow diet (Charles River Rodent) and water provided *ad libitum*. Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of Streptozotocin (STZ, Zanosar 65 mg.kg<sup>-1</sup>, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, United States). Age-matched control rats were injected with vehicle used to solubilize STZ; 0.1M citrate buffer pH 5.

Glucose concentrations and body weight were recorded every 3 days and on the day of the experiments. Diabetes was confirmed by the measurement of a blood glucose concentration greater than 20 mmol.L<sup>-1</sup> with a commercial blood glucose analyzer (Accusoft; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) (Pouliot et al., 2012).

### Topical Ocular Treatment With the iNOS Selective Inhibitor 1400W

One week after diabetes induction, rats were treated twice a day (8 AM and 5 PM) with one eye drop application of the selective iNOS inhibitor 1400W for a 7-day period. N-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide (1400W, Cayman Chemical, Ann Arbor, United States) is an extremely slowly reversible inhibitor for human and rat iNOS with a 5000-fold selectivity for iNOS *versus* eNOS and nNOS (Garvey et al., 1997). In a previous study,

we reported that 1400W can prevent the deleterious effects of B1R in insulin resistance and peripheral inflammation by blocking the formation of peroxynitrite (Haddad and Couture, 2016). In a model of ischemic retinopathy, 1400W also inhibited the pathological neovascularization (Sennlaub et al., 2001, 2002). For our study, fresh solution (15 mg.mL<sup>-1</sup>) was prepared daily with sterile saline 0.9% and filtered (0.20 μm mesh). This dosage was chosen based on a pilot dose-response study where 10 μL of 5 mg.mL<sup>-1</sup> failed to affect the increase of vascular permeability in STZ-retina. The latter inflammatory response was slightly decreased with 10 μL of 10 mg.mL<sup>-1</sup>, and completely reversed with 10 μL of 15 mg.mL<sup>-1</sup>. In the present study, 10 μL of the 15 mg.mL<sup>-1</sup> solution (i.e., 150 μg in 10 μL) was administered twice a day on the surface of the eye using a pipette. To make sure that the drop effectively remained on the surface of the eye, animals were hand-restrained for 60 s. The presence of ocular irritation such as redness, porphyrin secretion or corneal opacity was verified daily.

### Intravitreal Injection of the B1R Agonist R-838

To assess the contribution of iNOS in B1R-induced vascular permeability, twenty rats were randomly divided into two control groups and two STZ-diabetic groups of 5 rats per group. Control groups and STZ-diabetic groups were treated either with the vehicle or with 1400W by eye-drops. Pupils of isoflurane anesthetized rats were dilated with 0.5% tropicamide to allow intravitreal injections on day 10 and 12. Under a dissecting microscope, a small incision of 1mm was done behind the limbus using a 30-gauge needle to facilitate the intravitreal injections. A sterile solution of the B1R agonist R-838 synthesized at the Research Institute of Biotechnology, National Research Council of Canada (Montreal, QC, Canada) (100 ng in 5 μL of 0.9% saline) was injected into the vitreous through the incision using a glass micropipette sealed at the tip of the Hamilton microsyringe (10 μL) (Hamilton, Reno, NV, United States) according to

**TABLE 1** | List of primers designed by vector NTI software and used in qRT-PCR analysis.

Gene			Sequence		Position	GenBank accession no
B1R	Forward	5'	GCAGCGCTTAACCATAGCGGAAAT	3'	367–390	NM_030851
	Reverse	5'	CCAGTTGAAACGGTTCCCGATGTT	3'	454–431	
B2R	Forward	5'	AGGTGCTGAGGAACAACGAGATGA	3'	882–905	NM_173100
	Reverse	5'	TCCAGGAAGGTGCTGATCTGGAAA	3'	990–967	
iNOS	Forward	5'	TGATCTTGTGCTGGAGGTGACCAT	3'	1150–1173	NM_012611
	Reverse	5'	TGTAGCGCTGTGTGTACAGAAGT	3'	1349–1326	
VEGF-A	Forward	5'	TCACCAAAGCCAGCACATAGGAGA	3'	1219–1242	BC168708
	Reverse	5'	TTACACGTCTGCGGATCTTGACA	3'	1371–1348	
VEGF-R2	Forward	5'	AGTGGCTAAGGGCATGGAGTTCTT	3'	3269–3292	U93306
	Reverse	5'	GGGCCAAGCCAAAGTCACAGATTT	3'	3387–3364	
IL-1β	Forward	5'	TGTCACCTATTGTGGCTGTGGAGA	3'	247–270	NM_031512
	Reverse	5'	TGGGAACATCACACACTAGCAGGT	3'	411–388	
TNF-α	Forward	5'	ACGGAAAGCATGATCCGAGATGTG	3'	151–174	NM_012675
	Reverse	5'	TTGGAACTTCTCCTCCTTGTGG	3'	340–317	
18S	Forward	5'	TCAAATTTTCGATGGTAGTCGCCGT	3'	363–386	X01117
	Reverse	5'	TCCTGGATGTGGTAGCCGTTTCT	3'	470–447	

**TABLE 2** | Effects of diabetes, B1R agonist (R-838) and iNOS inhibitor (1400W) on body weight and glycaemia.

Groups	Body weight (g)	Glycaemia (mmol.L <sup>-1</sup> )
Control (n = 12)	382 ± 5	5.0 ± 0.1
Control + R-838/vehicle (n = 5)	373 ± 7	5.1 ± 0.1
Control + R-838/vehicle + 1400W (n = 5)	379 ± 9	5.2 ± 0.1
STZ (n = 12)	314 ± 9*	27.8 ± 0.7*
STZ + 1400W (n = 12)	300 ± 10*	27.7 ± 0.7*
STZ + R-838/vehicle (n = 5)	291 ± 6*	29.2 ± 1.2*
STZ + R-838/vehicle + 1400W (n = 5)	292 ± 7*	28.8 ± 0.9*

Values represent the mean ± S.E.M of five to twelve rats per group (as indicated by n). R-838 was administered in one eye and the effect compared to the opposite eye treated with the vehicle. Statistical significance was determined with one-way ANOVA followed by the Tukey Test. \*P < 0.05 significantly different from the corresponding control. STZ, streptozotocin-treated rats.

our previous study (Hachana et al., 2018). The contralateral eye received intravitreal injection of the vehicle (saline) for comparison. Retina samples were collected at day 15 to measure the vascular permeability using the Evans blue dye technique.

## Measurement of Retinal Vascular Permeability

Retinal vascular permeability was measured using Evans blue dye extravasation technique as previously described (Abdoun et al., 2008; Pouliot et al., 2012). Rats underwent general anesthesia by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (60 mg.kg<sup>-1</sup>). A catheter (Micro-Renathane, I.D. 0.040", O.D. 0.020", Braintree Scientific, Braintree, MA, United States) was inserted into the right femoral vein and Evans blue dye (45 mg.mL<sup>-1</sup> in 0.9% saline) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was injected i.v. over 10 s. The rats were kept on a heating pad for 2 h to allow the dye to circulate, while the body temperature was monitored at every 10 min. Thereafter, the rats were infused with a 25 mL of sterile saline 0.9% through the left heart ventricle, to wash out intravascular dye. Both eyes were then enucleated, and the retinae were dissected out and immediately weighed.

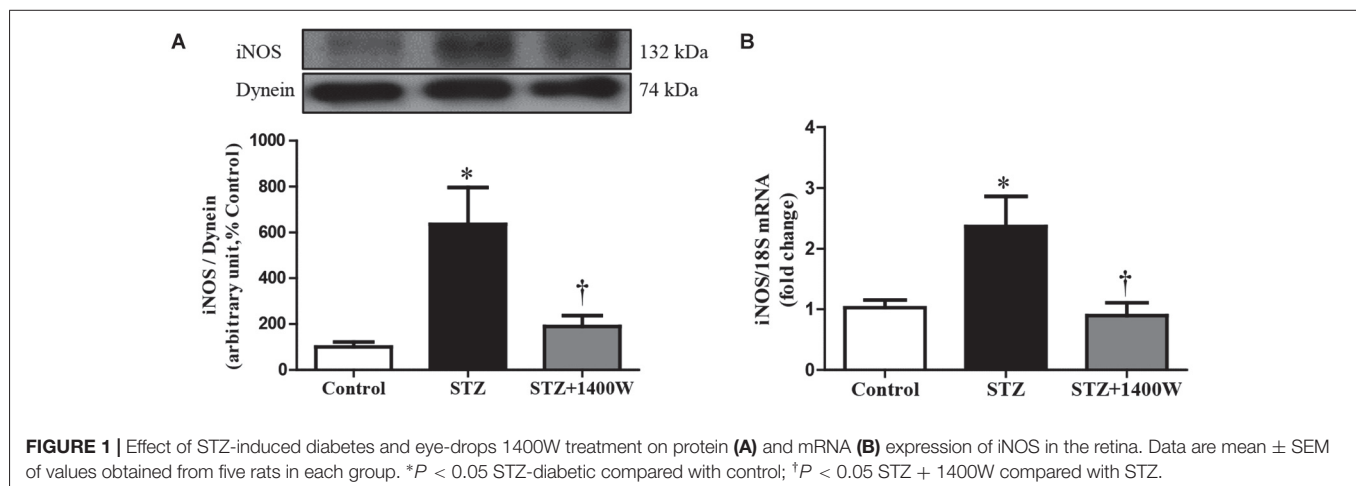
Evans blue dye was extracted by incubating each retina in 1 mL formamide (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) for 18 h at 70–75°C. The fluorescence of Evans blue was measured using a spectrofluorometer (Spex 1681 0.22 m, Horiba JobinYvon Inc, Edison, NJ, United States) at 620 nm (excitation) and 680 nm (emission). Based on a standard curve, data were calculated in µg of Evans blue and then expressed per g of fresh tissue.

## Measurement of Retinal Inflammatory Mediators by Quantitative RT-PCR

As previously described (Pouliot et al., 2012), rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p.) and the retinae were dissected out and put in RNAlater stabilization reagent (QIAGEN, Valencia, CA, United States). Total RNA was extracted from retinae using a commercial kit (QIAGEN, Valencia, CA, United States). First-strand cDNA synthesized from 400 ng total RNA with random hexamer primers was used as 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, United States) was performed as previously described (Abdoun et al., 2008; Pouliot et al., 2012). PCR was performed in SYBR Green Master mix (QIAGEN) with 300 nM of each primer. The primer pairs designed by Vector NTI software are shown in Table 1. For standardization and quantification, rat 18S was amplified simultaneously. 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 cycle threshold (Ct) value represents the cycle number at which a fluorescent signal rises statistically above background. The relative quantification of gene expression was analyzed by the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method.

## Measurement of Retinal Inflammatory Mediators by Western Blot

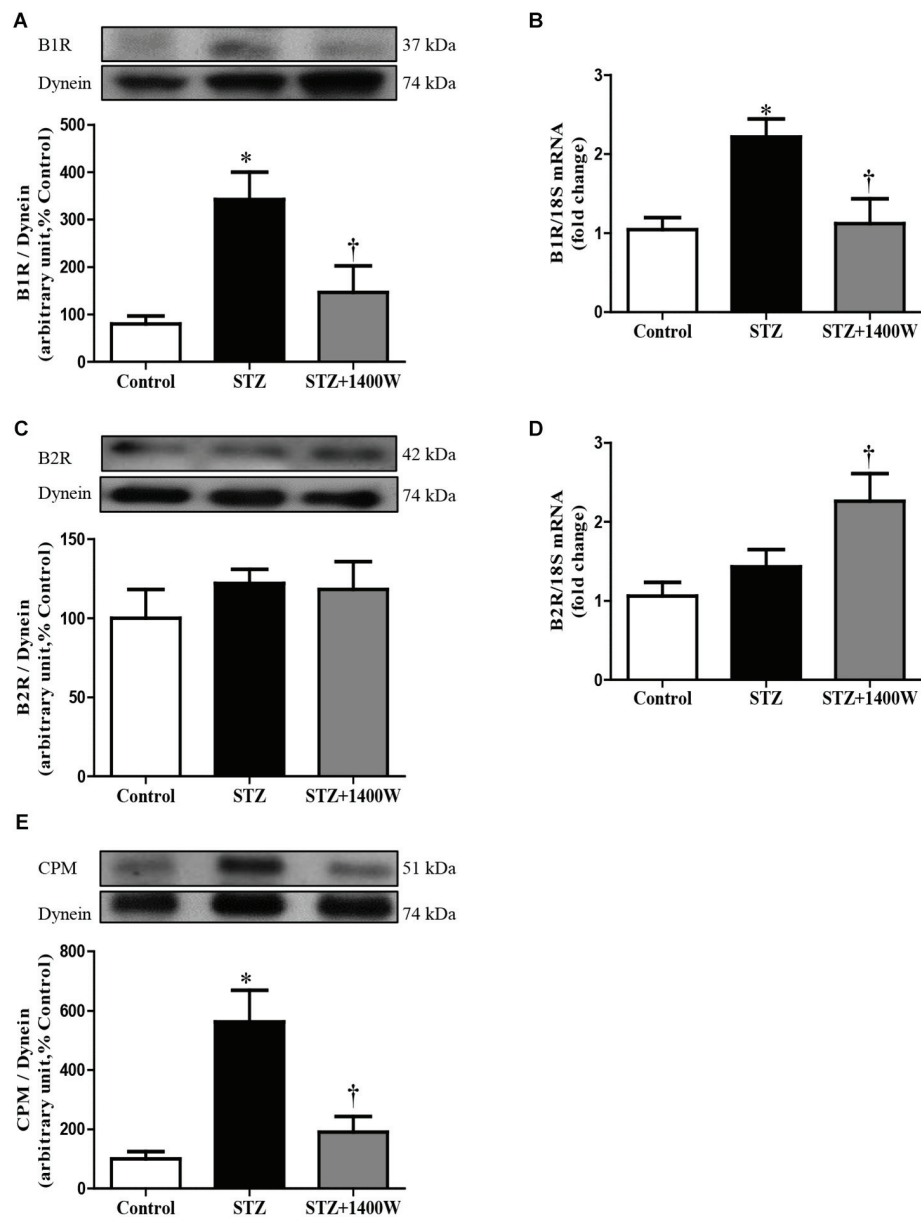
The measurement of protein expression of retinal inflammatory mediators was done using the Western Blot technique as previously described (Pouliot et al., 2011; Haddad and Couture, 2016). 40 µg of protein were loaded in each well of 10% SDS-PAGE and separated electrophoretically at 100 V for



125 min. Proteins were then transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Montreal, QC, Canada) at 100 V for 1 h. After 3 sets of 5 min washing in phosphate-buffered saline (PBS), the membranes were incubated in a blocking solution with PBS-Tween 20 containing 5% of dehydrated skimmed milk at 4°C for 1 h. The membranes were then incubated with specific primary antibody in 5% skimmed milk overnight at 4°C. Dynein and  $\beta$ -actin were used as standard proteins. The membranes were washed again  $3 \times 10$  min with PBS-Tween 20. The antibody-antigen complexes were detected by adding secondary antibody in 1% skimmed milk at room

temperature for 1 h and protein bands were visualized by enhanced chemiluminescence improved for the western blot (Super-Signal<sup>®</sup>; Thermo Scientific, Rockford, IL, United States). Quantitative analysis of specific bands was performed by densitometry using the MCID-M1 system (Imaging Research, St. Catharines, ON, Canada).

As described previously (Haddad and Couture, 2016), the detection of BK receptor proteins was made with selective polyclonal rabbit antiserum for B1R (1:1000), and B2R (1:1000) (Biotechnology Research Institute, Montreal, QC, Canada). Specificity of both antisera was determined in B1 and B2



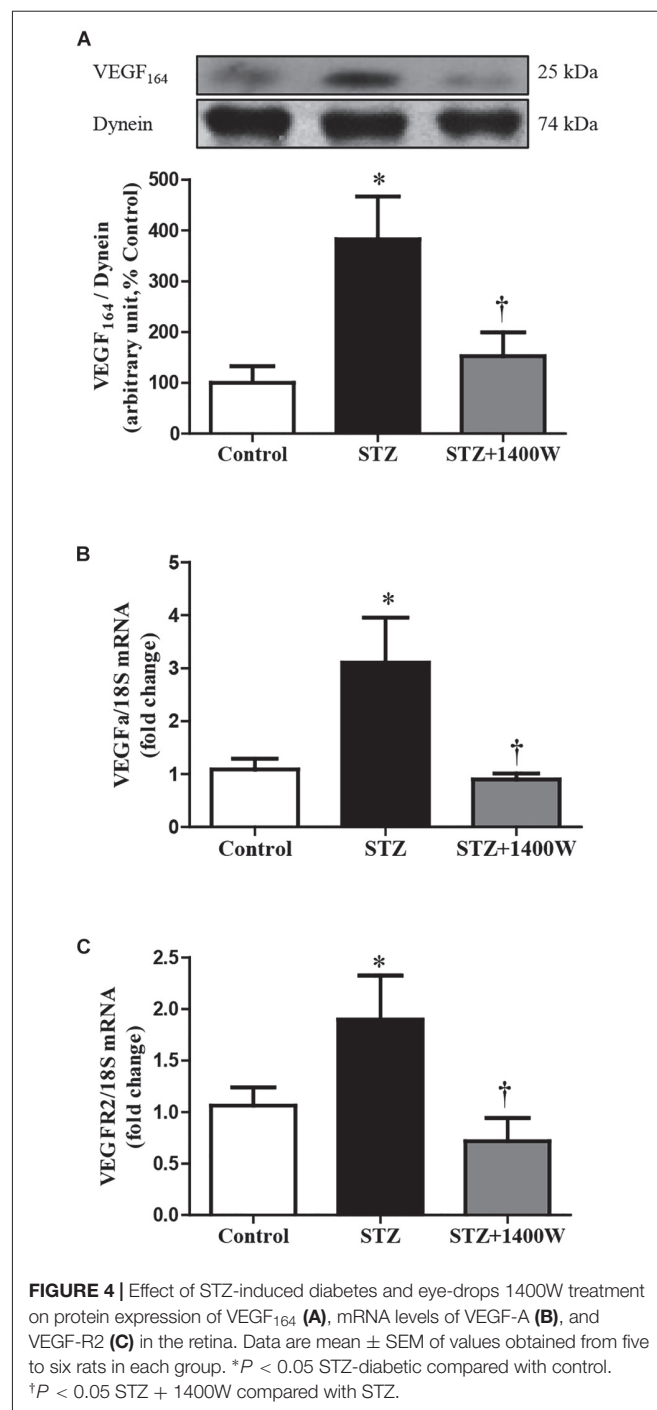
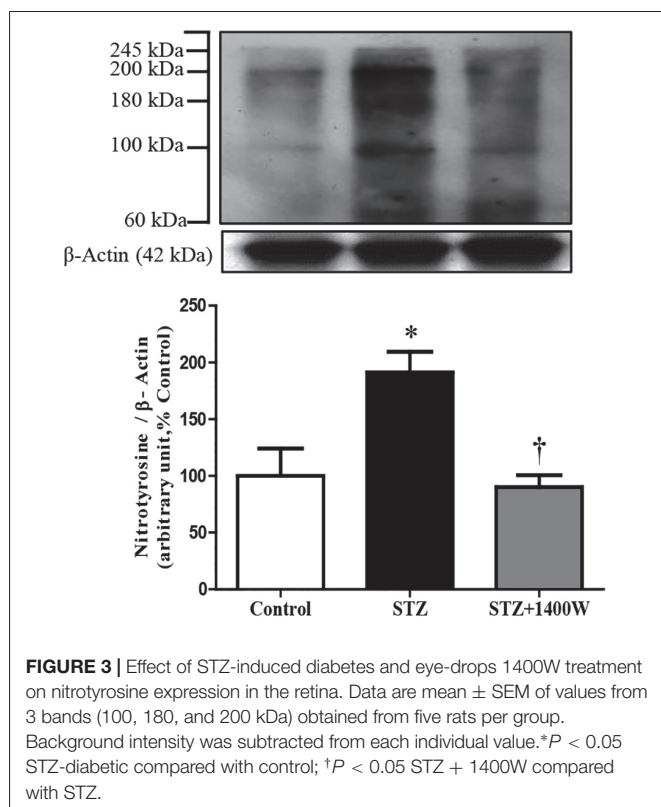
**FIGURE 2 |** Effect of STZ-induced diabetes and eye-drops 1400W treatment on the expression of kinin B1R (**A,B**), B2R (**C,D**), and CPM (**E**) at protein (**A,C,E**) and mRNA (**B,D**) levels in the retina. Data are mean  $\pm$  SEM of values obtained from five rats per group or six rats in CPM group. \* $P < 0.05$  STZ-diabetic compared with control; † $P < 0.05$  STZ + 1400W compared with STZ.

receptor knockout (KO) mice and by siRNA technology (Dias et al., 2010; Lacoste et al., 2013; Hachana et al., 2018). The other primary antibodies were as follows: iNOS (NOS2) (1:1500, rabbit, SC-650), IL-1 $\beta$  (1:500, rabbit, SC-7884), CPM (1:500, rabbit, SC-98698), dynein (1:5000, mouse, SC-13524),  $\beta$ -actin (1:5000, mouse, SC-47778), (SC: Santa Cruz Biotechnology, CA, United States), nitrotyrosine (1:1500 mouse, 1A6-05233; Millipores, Billerica, MA, United States), and VEGF<sub>164</sub> (1:1000, goat, AF564; R&D systems, Minneapolis, MN, United States). Secondary antibodies were horseradish peroxidase (HRP)-linked with: goat anti-mouse (SC-2005) or goat anti-rabbit (SC-2004) or donkey anti-goat (SC-2020) and HRP-linked used at dilution of 1:25000 (for B1R and B2R), 1:4000 (for dynein,  $\beta$ -actin, IL-1 $\beta$ , iNOS, VEGF, and CPM) and 1:3000 (nitrotyrosine). The nitration of protein tyrosine residues generating 3-nitrotyrosine has been used as a footprint for the formation of peroxynitrite *in-vivo* (Greenacre and Ischiropoulos, 2001).

### Immunofluorescence Staining

At day 15, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg.kg<sup>-1</sup>, i.p.) and then perfused with a paraformaldehyde solution (4% PFA). Dissected retinæ were then post-fixed in 4% PFA for 2 h and kept in 70% alcohol overnight at room temperature for a paraffin embedding. The retinæ were then cut into 10- $\mu$ m-thick sections and placed onto glass slides and kept at 4°C till the day of experiment. For proteins detection, the sections were deparaffinized prior to the immunofluorescence experiment. First, glass slides were

incubated in sodium citrate buffer at 95°C for 45 min. Sections were then allowed to cool down for 20 min. Sections were then washed 3 times (5 min each) with 0.1 M PBS buffer (pH 7.4) and incubated for 1 h at room temperature in blocking buffer (PBS containing 10% donkey serum and 0.25% triton X-100). Sections were left incubated overnight at room temperature with the blocking buffer containing primary antibodies: polyclonal rabbit antiserum to rat B1R (1:200), mouse monoclonal anti-iNOS





(1:200, mouse, ab49999; Abcam, Cambridge, United States). The following day, slides were washed  $3 \times 5$  min in PBS 0.1M and then incubated for 2 h at room temperature with Alexa Fluor 488 donkey secondary anti-rabbit IgG (1:200, A21206, Invitrogen) to visualize B1R, with Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG (1:200, A31570, Invitrogen) to visualize iNOS. At the end, the slides were washed and mounted using glycerol solution. Images were obtained with a confocal microscope Zeiss-LSM800 equipped with an argon laser (Carl Zeiss, Jena, Germany) and transferred to a computer and analyzed using NIH ImageJ 1.36b Software (NIH, Bethesda, MD, United States). Images were obtained at 20x and 40x objective. Semi-quantification of immunofluorescence staining intensity was made on 5 randomly selected surface areas of each retina from four STZ-diabetic rats, four controls and four STZ-diabetic treated rats. Background intensity (gray intensity) was subtracted from each individual value.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using Prism™ version 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, United States). Results are expressed as the mean  $\pm$  SEM and *n* represents the number of rats used in each experiment. One-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test was used for all the measurements. Results were considered significant at a value of  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Physiological Parameters

At the time of sacrifice, blood glucose concentration was significantly higher in STZ-diabetic groups compared with control rats, but no statistical difference was seen between non-treated and treated STZ-diabetic rats with R-838 and/or 1400W (Table 2). Body weight of STZ-diabetic rats was significantly lower than the one of age-matched control rats. Administration of R-838 and/or 1400W had no effect on body weight in both

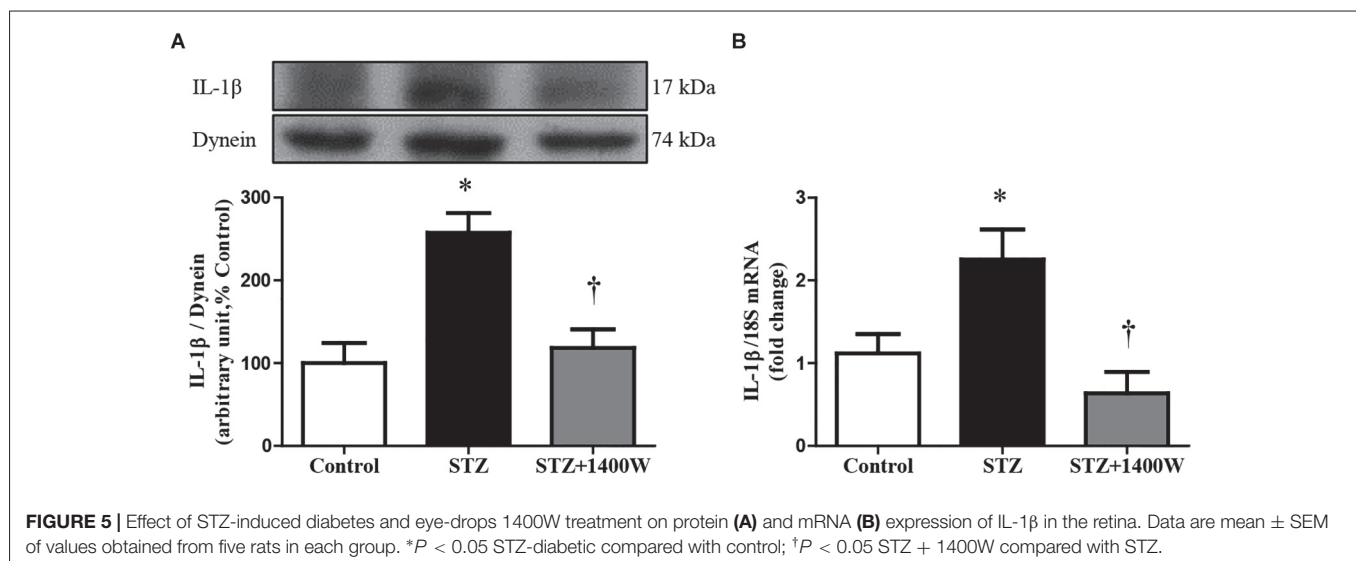
control and STZ-diabetic rats (Table 2). Of note, no symptoms of ocular irritation (redness or corneal opacity) or the presence of porphyrin secretion around the eyes were seen during the whole period of treatment.

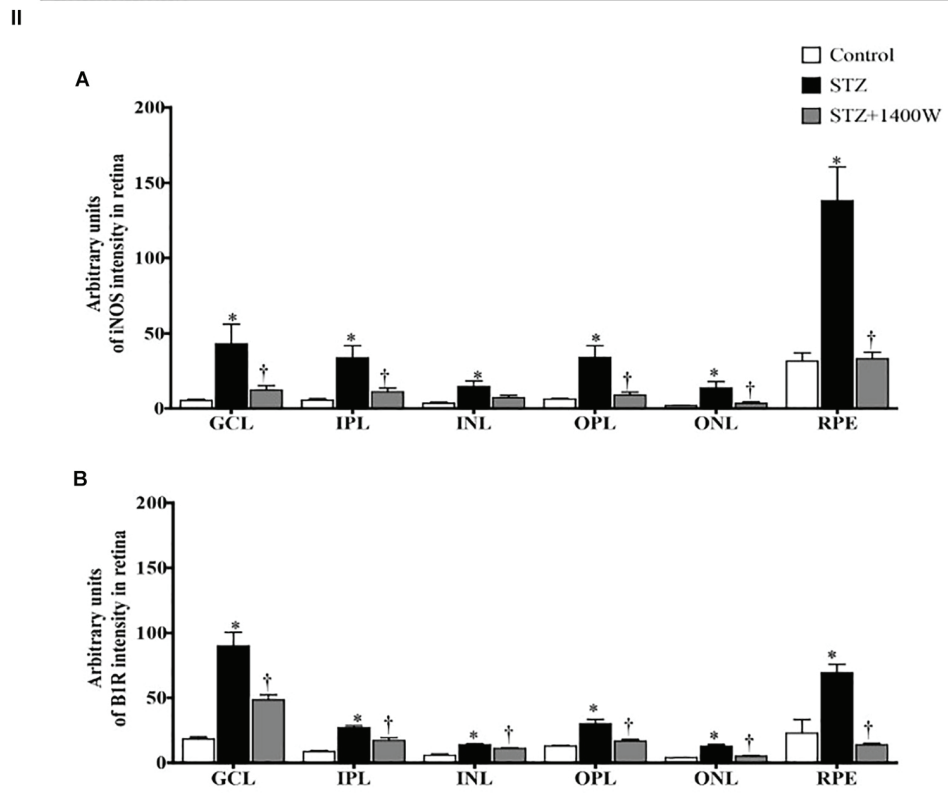
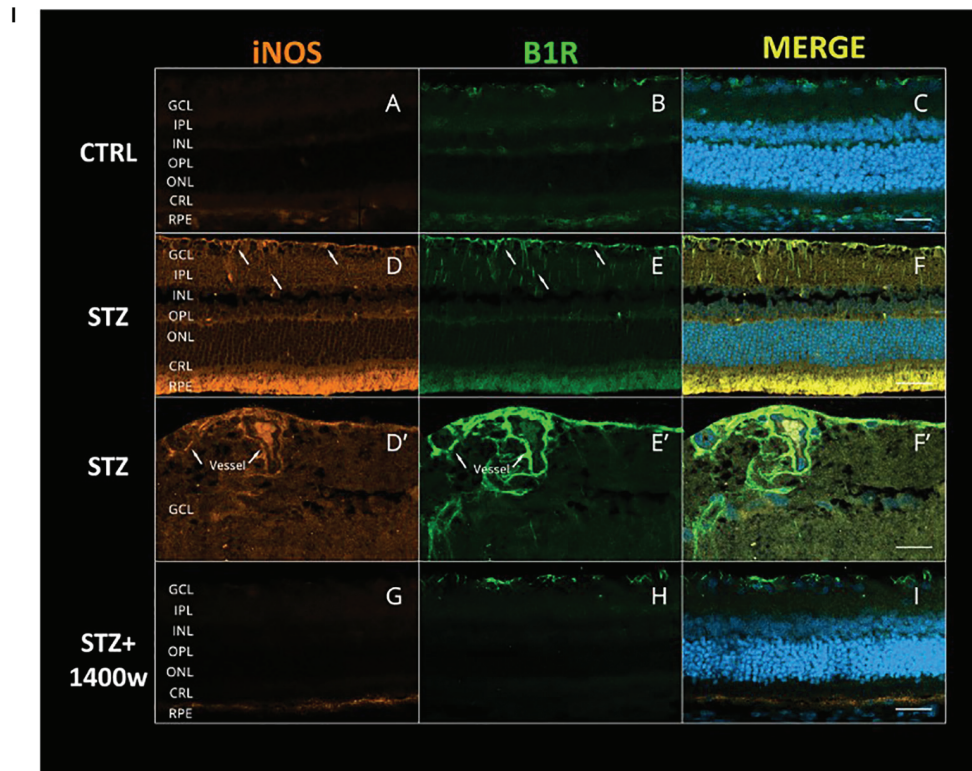
### Effect of iNOS Inhibition on Protein and mRNA Levels of Immunomodulators in Diabetic Retina

An increase of iNOS expression was seen concomitantly with an elevated expression of B1R and CPM in STZ-diabetic retina. In comparison to control retina, iNOS expression was increased by six-fold at protein level, and by 2.5-fold at mRNA level in diabetic retinae (Figures 1A,B). B1R expression was also increased by  $\approx 3.5$ -fold at protein level and 2.2-fold at mRNA level in STZ-diabetic retina (Figures 2A,B). CPM protein expression was increased by  $\approx$  six-fold in STZ-diabetic retina (Figure 2E). The increased expression of iNOS, B1R and CPM were reversed to control levels by the treatment with 1400W, providing evidence that iNOS inhibition reversed not only B1R expression but also the biosynthesis of B1R agonists by CPM. This occurs without significant changes on B2R protein expression, yet 1400W significantly increased B2R mRNA level in STZ-retina (Figures 2C,D).

Western blot analysis revealed that the intensity of several nitrosylated protein bands, notably at 200, 180, and 100 kDa, increased in the retina of STZ-diabetic rats compared to control (Figure 3). The eye-drops application of 1400W reversed the nitration reaction to control values, suggesting that iNOS is involved in protein nitration. This possibility is supported by the absence of nitrotyrosine residues in the retina of knockout iNOS mice in comparison with wild-type mice in a model of ischemic retina (Sennlaub et al., 2001).

VEGF-A plays a key role in increasing vascular permeability and promoting the angiogenesis in DR. Thus, intravitreal injections of anti-VEGF are one of the treatments used to stop DR progression. The protein expression of VEGF<sub>164</sub>, which is





**FIGURE 6 | (I)** Microphotographs of immunolocalization of iNOS (orange, **A,D,D',G**) and B1R (green, **B,E,E',H**) in the retina of control (CTRL) and STZ-diabetic rats treated by eye-drops with vehicle or 1400W. Representative microphotographs of merge immunolabeling are shown (**C,F,F',I**). All sections were counter-stained for DAPI (blue, shown on merged images only), which labels cell nuclei. Arrows show the presence of iNOS and B1R in the same areas of GCL and IPL (**D,E**), notably on (Continued)

**FIGURE 6 |** Continued

blood vessels (**D',E'**). Both proteins were colocalized in the STZ-retina (**F,F'**) but not in control (**C**) or STZ-retina treated with 1400W (**I**). Images were obtained at 20× (**A-F, G-I**) and 40× (**D'-F'**) objective. Scale bar: 40 μm (**A-F, G-I**) and 20 μm (**D'-F'**). CRL, cones and rods layer; GCL, ganglion cell layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; RPE, retinal pigmented epithelium. (**II**) Quantification of the fluorescent intensity is depicted for iNOS (**A**) and B1R (**B**) in the different layers of the retina. Data are mean ± SEM of values obtained from four rats per group and four sections per animal. \**P* < 0.05 STZ-diabetic compared with control; †*P* < 0.05 STZ + 1400W compared with STZ.

one isoform of VEGF-A, was increased by four-fold while the mRNA level of VEGF-A was increased by 3-fold in diabetic retina (**Figures 4A,B**). The enhanced expression of VEGF-A was reversed by the 1-week treatment with 1400W. Likewise, VEGF-R2 expression was significantly increased at mRNA level in STZ-diabetic retina and normalized by treatment with 1400W (**Figure 4C**). Similarly, the expression of IL-1β was increased by 2.5-fold at protein and mRNA levels in STZ-retina, and this was completely reversed by 1400W treatment (**Figures 5A,B**). This cytokine is known to enhance the expression of B1R through NF-κB. The mRNA expression of TNF-α, another cytokine involved in the induction of B1R (Leeb-Lundberg et al., 2005), was also significantly enhanced in diabetic retina and normalized by the treatment with 1400W (fold change of control: 1.0 ± 0.2; STZ: 4.7 ± 0.9, *P* < 0.05; STZ + 1400W: 2.0 ± 0.3, *P* < 0.05, *n* = 5).

### Effect of iNOS Inhibition on B1R and iNOS Immunoreactivity in the Diabetic Retina

The immunofluorescence staining confirmed the enhanced levels of iNOS and B1R in the STZ-diabetic retina. In contrast, iNOS and B1R immunostaining was slightly detectable in control retina and no colocalization was evidenced (**Figures 6I A-C**). STZ-induced diabetes increased strongly the expression of iNOS and B1R in all the retina layers (**Figures 6I D,E**). Both markers were mainly colocalized in the GCL, inner retina (INL and IPL) and the retinal pigmented layer (**Figures 6I F**). The latter forms the outer blood-retinal barrier. iNOS and B1R are also colocalized on blood vessels in the GCL (**Figures 6I D'-F'**). iNOS inhibition with 1400W decreased the high staining and colocalization of B1R and iNOS induced by diabetes (**Figures 6I G-I**), suggesting an implication of iNOS in the positive feedback regulation of B1R expression. Semi-quantitative values of iNOS and B1R intensity of immunofluorescence staining in control and STZ-diabetic retina without and with 1400W treatment are given in **Figures 6II A,B**.

### Effect of iNOS Inhibition and B1R Activation on Retinal Vascular Permeability

Following the upregulation of B1R and iNOS in the STZ-diabetic retina, we determined whether B1R was functional and could interact with iNOS in an inflammatory response such as the breakage of blood-retinal barrier. The 1-week treatment with 1400W reversed the STZ-induced increase in vascular permeability and reduced significantly the response to the B1R agonist in diabetic retina (**Figure 7**). The iNOS inhibitor had no impact in control rats treated with vehicle

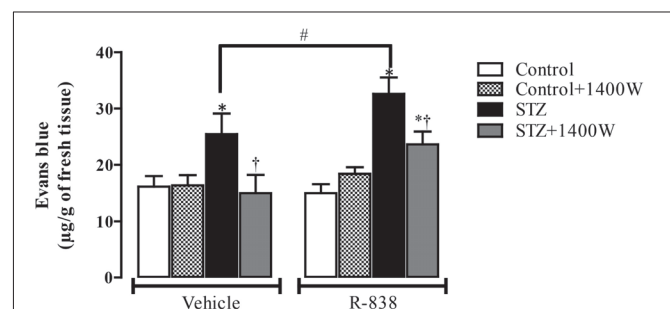
or R-838, which do not overexpress B1R. This provides evidence that iNOS activation mediates the B1R retinal vascular hyperpermeability in diabetes.

## DISCUSSION

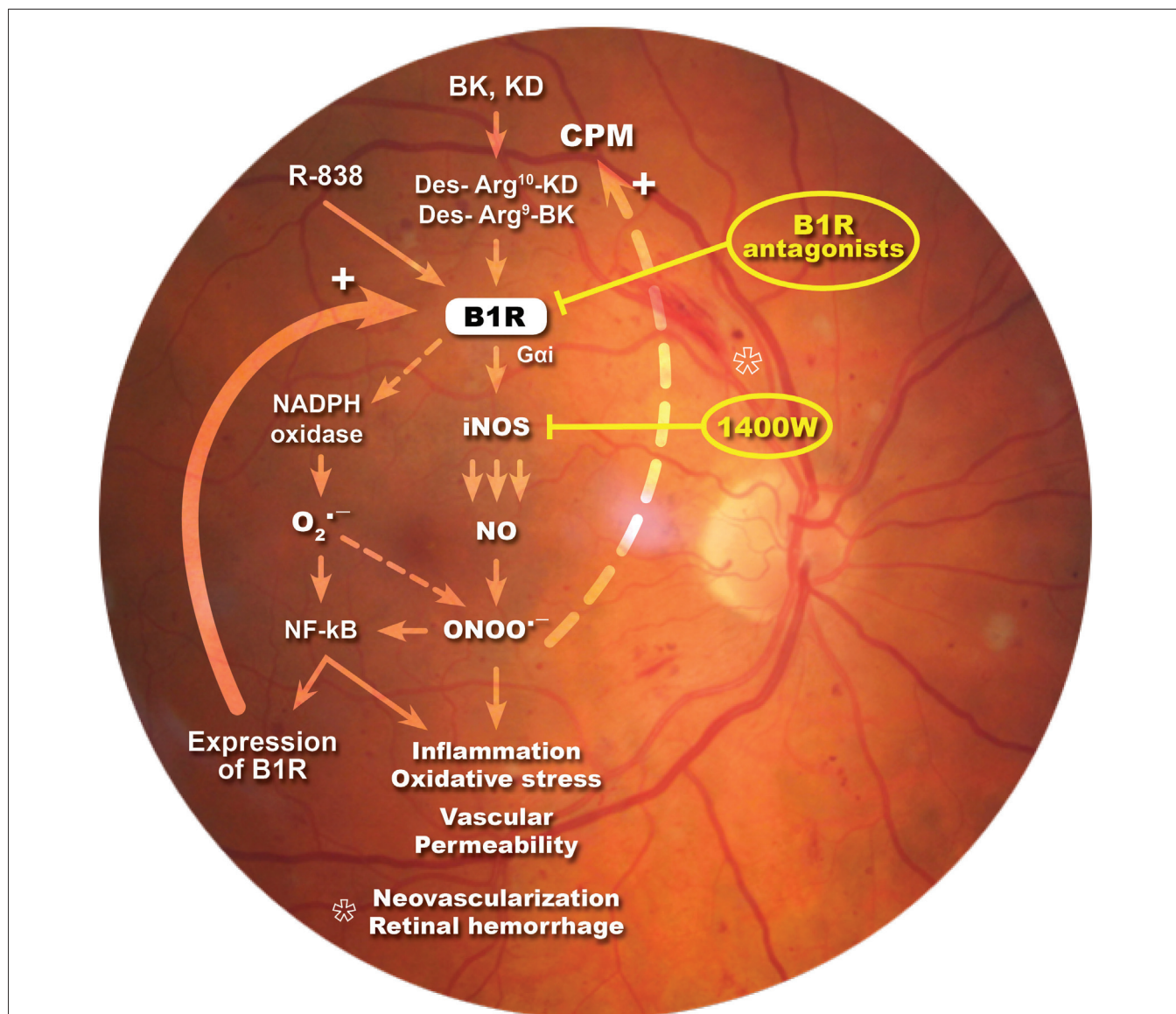
In the present study, we showed that iNOS plays an important role in the development of vascular damage linked to DR and in B1R-induced vascular permeability. We found that eye-drops application of the selective iNOS inhibitor, 1400W, reversed inflammatory response, nitrosative stress and vascular hyperpermeability in the retina of STZ-diabetic rats. Importantly, this study provides the first evidence that B1R is colocalized with iNOS throughout the retina and that B1R activates iNOS to enhance vascular permeability in this model of DR. A positive loop is suggested between iNOS and B1R to amplify and perpetuate the retinal inflammatory process. This is keeping with earlier data showing that B1R antagonism (Pouliot et al., 2012; Hachana et al., 2018) had similar beneficial effects than iNOS inhibition in this model of DR (**Figure 8**).

### iNOS Implication in Diabetic Retinopathy

The increase of the oxidative stress is considered as an important factor in the pathophysiology of DR. Chronic hyperglycemia induces oxidative stress, which can consequently damage proteins, lipids, and DNA (Stadler, 2011). Retinal vascular oxidative stress persisted even after glucose level normalization (Ihnat et al., 2007). Increased retinal expression of iNOS is known to be a key factor responsible for diabetes-induced retinal inflammation (Abu El-Asrar et al., 2004; Kern, 2007). Our results



**FIGURE 7 |** Effect of STZ-induced diabetes, eye-drops treatment with 1400W and intravitreal B1R agonist (R-838) on retinal vascular permeability. Data are mean ± SEM obtained from 12 rats per group (vehicle) and 5 rats per group (R-838 and control + 1400W). \**P* < 0.05 STZ-diabetic compared with control; †*P* < 0.05 STZ + 1400W compared with STZ; #*P* < 0.05 between STZ treated with vehicle and R-838.



**FIGURE 8 |** Schematic diagram showing how B1R and iNOS can partake in a mutual auto-induction and amplification loop to enhance nitrogen species formation and inflammation in diabetic retina. B1R agonists enhance the formation of peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) through the activation of iNOS and NADPH oxidase pathways. iNOS activation produces high amount of NO while NADPH oxidase activation leads to superoxide anion ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) formation that can rapidly react with NO to form  $\text{ONOO}^-$ . Peroxynitrite formation induces an inflammatory response, enhances the oxidative stress and vascular permeability, neovascularization and retinal hemorrhage. Both  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and  $\text{ONOO}^-$  are known to activate the transcriptional nuclear factor, NF- $\kappa$ B, which is involved in the transcription of several inflammatory genes, notably iNOS, B1R, and CPM. iNOS inhibitor (1400W) and B1R antagonists prevent this vicious cycle and the pro-inflammatory effect of B1R.

with 1400W are in agreement with the implication of iNOS through the oxidative stress in the onset of DR (Rosales et al., 2010; Silva et al., 2010).

Unlike the constitutive NOS, iNOS is activated under hypoxic and inflammatory conditions leading thus to excessive amounts of NO, which might contribute to the pathogenesis of DR (Abu El-Asrar et al., 2001; Rosales et al., 2010; Silva et al., 2010). Therefore, our approach was to selectively block iNOS, and leave intact nNOS and eNOS which play important physiological functions such as vasodilation and blood flow regulation. NO synthesized from iNOS promotes peroxynitrite formation, which

is implicated in retinal endothelial and neuronal cell death, retinal neurodegeneration, and blood-retinal barrier breakdown in models of experimental diabetes (El-Remessy et al., 2003; el-Remessy et al., 2005; Zheng et al., 2007; Ali et al., 2008). In addition, peroxynitrite and the oxidative stress can activate the transcriptional nuclear factor NF- $\kappa$ B, which is known to increase the transcription of several inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , iNOS, and B1R (Leeb-Lundberg et al., 2005; Pall, 2013). Here, we found that elevated expression of iNOS associated with diabetes is accompanied by an elevated expression of nitrosylated proteins that is reversed by iNOS inhibition.

This agrees with diabetic mice lacking iNOS which are protected from the diabetes-induced nitration of retinal proteins (Zheng et al., 2007). Consistently, nitrotyrosine immunolabeling was reported in the inner retina and retinal vasculature of diabetic rats (Du et al., 2002; Liu et al., 2013) and in diabetic human retina (Abu El-Asrar et al., 2004).

In a model of type 2 diabetes, iNOS was found expressed in the GCL, the INL, and at the ONL (Carmo et al., 2000). Also, a cytoplasm-associated immunoreactivity of iNOS was seen in ganglion cells, INL, glial cells, and vessels of diabetic human retinae (Abu El-Asrar et al., 2004). Recently, we reported B1R expression in retinal ganglion cells, INL, and Müller cells in STZ-diabetic retina (Hachana et al., 2018). In the present study, we show an increased expression of B1R in diabetic retina accompanied by an increased expression of iNOS in the same regions. B1R and iNOS immunoreactivities were colocalized in the GCL, on blood vessels, the INL, and RPE. This colocalization may suggest interaction between both proteins.

### B1R Implication in Diabetic Retinopathy

We have previously shown that B1R is implicated in the very early stage of DR (Abdouh et al., 2003, 2008; Pouliot et al., 2011, 2012; Hachana et al., 2018) and that B1R exerts potent effects on retinal vascular hyperpermeability. Herein we show again an increased retinal B1R expression at 2 weeks of diabetes. We found that the impact of B1R on retinal vascular permeability in diabetic rats is stronger when B1R is stimulated by its agonist (R-838). It has been previously shown that B1R activates NADPH oxidase leading to increased production of superoxide anion in STZ-diabetic vessels through PKC $\beta$ 1/2 (Haddad and Couture, 2017). Importantly, B1R enhanced iNOS expression in diabetic pancreas, adipose tissue, vessels and retina (Dias and Couture, 2012a,b; Pouliot et al., 2012; Tidjane et al., 2016), which is keeping with the activation of iNOS by B1R through G $\alpha$ i/ERK/MAPK signaling (Brovkovych et al., 2011). Hence the interaction between B1R, iNOS and NADPH oxidase represents a reasonable mechanism for the generation of nitrosylated proteins (Figure 3) through peroxynitrite formation. The latter is the result of a combination of NO (produced by iNOS) and superoxide anion derived from NADPH oxidase (Figure 8). This is expected to amplify the pro-inflammatory effects and expression of B1R and iNOS through a positive feedback loop as shown in other tissues of diabetic rats (Haddad and Couture, 2016). It seems that peroxynitrite can also exert a positive feedback loop to enhance the expression of CPM, yielding endogenous agonists to activate B1R. These results are in line with our previous study where we showed that enhanced iNOS expression in different organs of STZ-diabetic rats increases CPM expression through peroxynitrite formation (Haddad and Couture, 2016). Collectively, the present data suggest a strong

interaction between B1R and iNOS, which is further supported by the immunofluorescence study highlighting strong co-expression of iNOS and B1R.

### CONCLUSION

This study shows that iNOS and B1R play a critical role in the early stage of DR. B1R and iNOS appear to partake in a mutual auto-induction and amplification loop to enhance nitrogen species formation and inflammation in diabetic retina. Hence, targeting the B1R-iNOS axis can represent a promising and non-invasive therapeutic approach in DR. However, further studies are needed to confirm the concentration and any potential side effect of 1400W reaching to the retinal, corneal and choroidal compartments.

### DATA AVAILABILITY

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

### AUTHOR CONTRIBUTIONS

RO, EV, and RC conceived and designed the experiments. RO performed the experiments, analyzed the data, and drafted the manuscript. RC and EV supervised the study, edited, and wrote the final version of the manuscript. All authors approved the final manuscript.

### FUNDING

This work was supported by Grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-125962) and the FRQS Vision Health Research Network to EV and RC. RO received a Ph.D. Studentship Award from the Graduate Program of Physiology and an International Students' Scholarship from the Faculty of Graduate Studies, Université de Montréal.

### ACKNOWLEDGMENTS

The authors greatly appreciate the technical assistance of Jacques Sénécal for the study in immunofluorescence. The authors thank the Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal for giving access to the confocal microscope Zeiss-LSM800.

### REFERENCES

Abdouh, M., Khanjari, A., Abdelaziz, N., Ongali, B., Couture, R., and Hassessian, H. M. (2003). Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.* 140, 33–40. doi: 10.1038/sj.bjp.0705210

Abdouh, M., Talbot, S., Couture, R., and Hassessian, H. M. (2008). Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 154, 136–143. doi: 10.1038/bjp.2008.48

Abu El-Asrar, A. M., Desmet, S., Meersschaert, A., Dralands, L., Missotten, L., and Geboes, K. (2001). Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the retinas of human subjects with diabetes

- mellitus. *Am. J. Ophthalmol.* 132, 551–556. doi: 10.1016/S0002-9394(01)01127-8
- Abu El-Asrar, A. M., Meeressaert, A., Dralands, L., Missotten, L., and Geboes, K. (2004). Inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor are colocalized in the retinas of human subjects with diabetes. *Eye* 18, 306–313. doi: 10.1038/sj.eye.6700642
- Ali, T. K., Matragoon, S., Pillai, B. A., Liou, G. I., and El-Remessy, A. B. (2008). Peroxynitrite mediates retinal neurodegeneration by inhibiting nerve growth factor survival signaling in experimental and human diabetes. *Diabetes* 57, 889–898. doi: 10.2337/db07-1669
- Bhat, M., Pouliot, M., Couture, R., and Vaucher, E. (2014). The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy. *Prog. Drug Res.* 69, 111–143. doi: 10.1007/978-3-319-06683-7\_5
- Brovkovich, V., Zhang, Y., Brovkovich, S., Minshall, R. D., and Skidgel, R. A. (2011). A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 258–269. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00992.x
- Carmo, A., Cunha-Vaz, J. G., Carvalho, A. P., and Lopes, M. C. (2000). Nitric oxide synthase activity in retinas from non-insulin-dependent diabetic Goto-Kakizaki rats: correlation with blood-retinal barrier permeability. *Nitric Oxide* 4, 590–596. doi: 10.1006/niox.2000.0312
- Catanzaro, O. L., Capponi, J. A., Di Martino, I., Labal, E. S., and Sirois, P. (2017). Oxidative stress in the optic nerve and cortical visual area of streptozotocin-induced diabetic wistar rats: blockade with a selective bradykinin B1 receptor antagonist. *Neuropeptides* 66, 97–102. doi: 10.1016/j.npep.2017.10.003
- Cheung, N., Mitchell, P., and Wong, T. Y. (2010). Diabetic retinopathy. *Lancet* 376, 124–136. doi: 10.1016/S0140-6736(09)62124-3
- Christopherson, K. S., and Brecht, D. S. (1997). Nitric oxide in excitable tissues: physiological roles and disease. *J. Clin. Invest.* 100, 2424–2429. doi: 10.1172/JCI119783
- Corbett, J. A., Tilton, R. G., Chang, K., Hasan, K. S., Ido, Y., Wang, J. L., et al. (1992). Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 41, 552–556. doi: 10.2337/diab.41.4.552
- Couture, R., Blaes, N., and Girolami, J. P. (2014). Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 12, 223–248. doi: 10.2174/157016112666140226121627
- Couture, R., Harrisson, M., Vianna, R. M., and Cloutier, F. (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 161–176. doi: 10.1016/S0014-2999(01)01318-8
- Dias, J. P., and Couture, R. (2012a). Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes. Metab.* 14, 244–253. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01521.x
- Dias, J. P., and Couture, R. (2012b). Suppression of vascular inflammation by kinin B1 receptor antagonism in a rat model of insulin resistance. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 60, 61–69. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182576277
- Dias, J. P., Talbot, S., Senecal, J., Carayon, P., and 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:e12622. doi: 10.1371/journal.pone.0012622
- Du, Y., Sarthy, V. P., and Kern, T. S. (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–R741. doi: 10.1152/ajpregu.00080.2003
- Du, Y., Smith, M. A., Miller, C. M., and Kern, T. S. (2002). Diabetes-induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *J. Neurochem.* 80, 771–779. doi: 10.1046/j.0022-3042.2001.00737.x
- Ellis, E. A., Guberski, D. L., Hutson, B., and Grant, M. B. (2002). Time course of NADH oxidase, inducible nitric oxide synthase and peroxynitrite in diabetic retinopathy in the BBZ/WOR rat. *Nitric Oxide* 6, 295–304. doi: 10.1006/niox.2001.0419
- el-Remessy, A. B., Bartoli, M., Platt, D. H., Fulton, D., and Caldwell, R. B. (2005). Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration. *J. Cell Sci.* 118, 243–252. doi: 10.1242/jcs.01612
- El-Remessy, A. B., Behzadian, M. A., Abou-Mohamed, G., Franklin, T., Caldwell, R. W., and Caldwell, R. B. (2003). Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor. *Am. J. Pathol.* 162, 1995–2004. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64332-5
- Feener, E. P. (2010). Plasma kallikrein and diabetic macular edema. *Curr. Diab. Rep.* 10, 270–275. doi: 10.1007/s11892-010-0127-1
- Fong, D. S., Aiello, L. P., Ferris, F. L. III, and Klein, R. (2004). Diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 27, 2540–2553. doi: 10.2337/diacare.27.10.2540
- Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J., et al. (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem.* 272, 4959–4963. doi: 10.1074/jbc.272.8.4959
- Goureau, O., Regnier-Ricard, F., and Courtois, Y. (1999). Requirement for nitric oxide in retinal neuronal cell death induced by activated muller glial cells. *J. Neurochem.* 72, 2506–2515. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0722506.x
- Greenacre, S. A., and Ischiropoulos, H. (2001). Tyrosine nitration: localisation, quantification, consequences for protein function and signal transduction. *Free Radic. Res.* 34, 541–581. doi: 10.1080/10715760100300471
- 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, 968–983. doi: 10.1111/bph.14138
- Haddad, Y., and Couture, R. (2016). Interplay between the kinin B1 receptor and inducible nitric oxide synthase in insulin resistance. *Br. J. Pharmacol.* 173, 1988–2000. doi: 10.1111/bph.13491
- Haddad, Y., and Couture, R. (2017). Localization and interaction between kinin B1 receptor and NADPH oxidase in the vascular system of diabetic rats. *Front. Physiol.* 8:861. doi: 10.3389/fphys.2017.00861
- Hao, L. N., Wang, M., Ma, J. L., and Yang, T. (2012). Puerarin decreases apoptosis of retinal pigment epithelial cells in diabetic rats by reducing peroxynitrite level and iNOS expression. *Sheng Li Xue Bao* 64, 199–206.
- Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M. S., Wildiers, H., Van Oosterom, A. T., and De Bruijn, E. A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* 56, 549–580. doi: 10.1124/pr.56.4.3
- Ihnat, M. A., Thorpe, J. E., Kamat, C. D., Szabo, C., Green, D. E., Warnke, L. A., et al. (2007). Reactive oxygen species mediate a cellular ‘memory’ of high glucose stress signalling. *Diabetologia* 50, 1523–1531. doi: 10.1007/s00125-007-0684-2
- Kern, T. S. (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
- Kern, T. S., and Engerman, R. L. (2001). Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy: aminoguanidine and aspirin. *Diabetes* 50, 1636–1642. doi: 10.2337/diabetes.50.7.1636
- Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., Altman, D. G., and NC3Rs Reporting Guidelines Working Group. (2010). Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br. J. Pharmacol.* 160, 1577–1579. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x
- Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., and Moilanen, E. (2005). Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy* 4, 471–479. doi: 10.2174/1568010054526359
- Lacoste, B., Tong, X. K., Lahjouji, K., Couture, R., and Hamel, E. (2013). Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer’s disease mice. *J. Neuroinflamm.* 10:57. doi: 10.1186/1742-2094-10-57
- Leeb-Lundberg, L. M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D. J., and Zuraw, B. L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol. Rev.* 57, 27–77. doi: 10.1124/pr.57.1.2
- Liu, Q., Li, J., Cheng, R., Chen, Y., Lee, K., Hu, Y., et al. (2013). Nitrosative stress plays an important role in Wnt pathway activation in diabetic retinopathy. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1141–1153. doi: 10.1089/ars.2012.4583
- McGrath, J. C., and Lilley, E. (2015). Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3189–3193. doi: 10.1111/bph.12955
- Mishra, A., and Newman, E. A. (2010). Inhibition of inducible nitric oxide synthase reverses the loss of functional hyperemia in diabetic retinopathy. *Glia* 58, 1996–2004. doi: 10.1002/glia.21068
- Pall, M. L. (2013). The NO/ONOO-cycle as the central cause of heart failure. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 22274–22330. doi: 10.3390/ijms141122274
- Pouliot, M., Hetu, S., Lahjouji, K., Couture, R., and Vaucher, E. (2011). Modulation of retinal blood flow by kinin B(1) receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp. Eye Res.* 92, 482–489. doi: 10.1016/j.exer.2011.03.007

- 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:e33864. doi: 10.1371/journal.pone.0033864
- Regoli, D., and Barabe, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32, 1–46.
- Regoli, D., Nsa Allogho, S., Rizzi, A., and Gobeil, F. J. (1998). Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 348, 1–10. doi: 10.1016/S0014-2999(98)00165-4
- Ricciardolo, F. L., Nijkamp, F. P., and Folkerts, G. (2006). Nitric oxide synthase (NOS) as therapeutic target for asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Drug Targets* 7, 721–735. doi: 10.2174/138945006777435290
- Rosales, M. A., Silva, K. C., Lopes de Faria, J. B., and Lopes de Faria, J. M. (2010). Exogenous SOD mimetic tempol ameliorates the early retinal changes reestablishing the redox status in diabetic hypertensive rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 4327–4336. doi: 10.1167/iops.09-4690
- Sennlaub, F., Courtois, Y., and Goureau, O. (2001). Inducible nitric oxide synthase mediates the change from retinal to vitreal neovascularization in ischemic retinopathy. *J. Clin. Invest.* 107, 717–725. doi: 10.1172/JCI10874
- Sennlaub, F., Courtois, Y., and Goureau, O. (2002). Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy. *J. Neurosci.* 22, 3987–3993. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-10-03987.2002
- Silva, K. C., Rosales, M. A., de Faria, J. B., and de Faria, J. M. (2010). Reduction of inducible nitric oxide synthase via angiotensin receptor blocker prevents the oxidative retinal damage in diabetic hypertensive rats. *Curr. Eye Res.* 35, 519–528. doi: 10.3109/02713681003664923
- Stadler, K. (2011). Peroxynitrite-driven mechanisms in diabetes and insulin resistance - the latest advances. *Curr. Med. Chem.* 18, 280–290. doi: 10.2174/092986711794088317
- Tidjane, N., Gaboury, L., and 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, 323–336. doi: 10.1515/hsz-2015-0230
- Toda, N., and Nakanishi-Toda, M. (2007). Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 205–238. doi: 10.1016/j.preteyeres.2007.01.004
- Wilkinson-Berka, J. L., and Fletcher, E. L. (2004). Angiotensin and bradykinin: targets for the treatment of vascular and neuro-glial pathology in diabetic retinopathy. *Curr. Pharm. Des.* 10, 3313–3330. doi: 10.2174/1381612043383179
- Yuasa, I., Ma, N., Matsubara, H., Fukui, Y., and Uji, Y. (2008). Inducible nitric oxide synthase mediates retinal DNA damage in Goto-Kakizaki rat retina. *Jpn. J. Ophthalmol.* 52, 314–322. doi: 10.1007/s10384-008-0542-x
- Zheng, L., Du, Y., Miller, C., Gubitosi-Klug, R. A., Kern, T. S., Ball, S., et al. (2007). Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia* 50, 1987–1996. doi: 10.1007/s00125-007-0734-9

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Othman, Vaucher and Couture. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Article

# Differential Expression of Kinin Receptors in Human Wet and Dry Age-Related Macular Degeneration Retinae

Rahmeh Othman <sup>1,2</sup>, Simon Berbari <sup>2</sup>, Elvire Vaucher <sup>1</sup> and Réjean Couture <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> School of Optometry, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1P1, Canada; Rahmeh.othman@umontreal.ca (R.O.); Elvire.vaucher@umontreal.ca (E.V.)

<sup>2</sup> Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC H3T 1P1, Canada; Simon.berbari@umontreal.ca

\* Correspondence: rejean.couture@umontreal.ca; Tel.: +1-514-343-7060

Received: 1 May 2020; Accepted: 22 June 2020; Published: 24 June 2020



**Abstract:** Kinins are vasoactive peptides and mediators of inflammation, which signal through two G protein-coupled receptors, B1 and B2 receptors (B1R, B2R). Recent pre-clinical findings suggest a primary role for B1R in a rat model of wet age-related macular degeneration (AMD). The aim of the present study was to investigate whether kinin receptors are differentially expressed in human wet and dry AMD retinae. The cellular distribution of B1R and B2R was examined by immunofluorescence and in situ hybridization in post-mortem human AMD retinae. The association of B1R with inflammatory proteins (inducible nitric oxide synthase (iNOS) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA)), fibrosis markers and glial cells was also studied. While B2R mRNA and protein expression was not affected by AMD, a significant increase of B1R mRNA and immunoreactivity was measured in wet AMD retinae when compared to control and dry AMD retinae. B1R was expressed by Müller cells, astrocytes, microglia and endothelial/vascular smooth muscle cells, and colocalized with iNOS and fibrosis markers, but not with VEGFA. In conclusion, the induction and upregulation of the pro-inflammatory and pro-fibrotic kinin B1R in human wet AMD retinae support previous pre-clinical studies and provide a clinical proof-of-concept that B1R represents an attractive therapeutic target worth exploring in this retinal disease.

**Keywords:** age-related macular degeneration; bradykinin type 1 receptor; fibrosis; gliosis; iNOS; kallikrein-kinin system; microglia; vascular endothelial growth factor (VEGF); retina

## 1. Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) features neurodegeneration of the retina, principally the macula, leading to a loss of central vision. The global prevalence of AMD increases dramatically with aging, and it is estimated to affect 192 million people over the world in 2020 [1]. In its early stage, AMD is asymptomatic, although lipid deposits known as drusen accumulate in the subretinal space. These deposits consequently affect the retina, leading to a thinning in the photoreceptor layer [2] and a loss of sensitivity, especially in the macula. AMD can progress with time evolving into two distinct late stages: geographic atrophy also known as ‘dry AMD’ and neovascular or ‘wet AMD’ [3]. Both forms are linked to inflammation and dysregulated innate immunity [4]. Although the reasons behind the progression of AMD into the late stage remain elusive, many mechanisms seem to take part in the progression, notably the complement’s activation, oxidative stress, inflammation, blood flow dysregulation and altered retinal neuroprotection [5].

Dry AMD is typified by a geographic atrophy consisting of a thickening in Bruch’s membrane (BrM) in the macula, and accumulation of microglia in the subretinal space, as well as accumulation of



macrophages, a degeneration of the retinal pigment epithelium (RPE) and overlying photoreceptors (PR), accompanied by choroidal blood vessels constriction [6,7]. The wet form of AMD is characterized by the ingrowth of new and immature vessels, which invade the outer retina from the underlying choroid through a defect in Bruch's membrane. This choroidal neovascularization (CNV) creates the obstruction of light paths and possible retinal detachment leading to impaired vision. In both forms, the locus of the primary insult remains elusive [6,8]. A number of studies debate whether the dry form (90% of AMD) can evolve into the wet form, or whether they represent two different pathologies [9]. Current clinical trials are designed to answer this question, in order to find adequate therapeutic treatments for these retinal diseases [10]. The common treatment of wet AMD targets the overexpressed vascular endothelial growth factor A (VEGFA), implicated in CNV formation, by means of the intravitreal injection of anti-VEGF antibodies [6,11–14]. There is no specific treatment for dry AMD, except for dietary and supplementary vitamins and antioxidants, which have not been proven efficient [5,10].

Recent studies support a role for the kallikrein-kinin system (KKS) in retinal damage, notably in diabetic retinopathy and CNV in animals and humans [15–19]. A Phase 1B clinical trial was recently conducted targeting plasma kallikrein, the enzyme involved in the biosynthesis of kinins, to treat diabetic macular edema. In this study, intravitreal injection of KVD001 (plasma kallikrein inhibitor) ameliorated visual acuity without causing any retinal thickening or exacerbating the pathology [20]. Collectively, these pre- and clinical findings support a key role for the KKS in retinal disorders. The vascular biology and pathology of the KKS, including inflammation and fibrosis, operate through bradykinin B1 and B2 receptors (B1R and B2R) [21–24]. The constitutive B2R plays an essential role in vascular homeostasis [24], but also in tumor-induced angiogenesis and pathological neovascularization [25,26]. B2R blockade reduced retinal neovascularization and inhibited the expression of proangiogenic and pro-inflammatory cytokines in oxygen-induced retinopathy [25]. These mechanisms could be linked to VEGF cascade, since B2R transactivates VEGF type 2 receptor (VEGFR2) (KDR/Flk-1), resulting in further vasodilatation, microvascular permeability and angiogenesis [27]. Most of the detrimental effects of the KKS are associated to the inducible B1R [24]. B1R shows deleterious effects in the early and late stage of type 1 diabetic retinopathy via the inducible nitric oxide synthase (iNOS) pathway [15,17,18], and in laser-induced CNV via pro-inflammatory cytokines, microglia invasion and astrogliosis [16]. Importantly, B1R antagonism and anti-VEGF therapy decreased the size of CNV, retinal inflammation and vascular hyperpermeability through distinct and complementary mechanisms [16].

Based on recent and compelling pre-clinical findings suggesting a primary role for kinin B1R in CNV, the aim of this study was to address the hypothesis that inflammatory events associated to kinin B1R also occur in human AMD retina. Post-mortem human dry and wet AMD retinae were used to study the differential expression and cellular distribution of kinin B1R and B2R by immunofluorescence and in situ hybridization. Furthermore, B1R was studied in association with inflammatory proteins (iNOS and VEGFA), fibrosis markers, reactive microglia and gliosis. Hence, a better understanding of the cellular inflammatory mechanisms underlying both forms of AMD should be useful in the search for new therapies.

## 2. Results

### 2.1. B1R, B2R and VEGFA RNA Expression

To assess the implication of the inducible B1R and constitutive B2R and VEGFA, we first looked at the mRNA expression of these receptors and proteins in control and AMD retinae by Multiplex RNAscope (Figure 1). Interestingly, clusters of B1R mRNA were observed in the ganglion cell layer (GCL), inner nuclear layer (INL) and outer nuclear layer (ONL) of dry and wet AMD (Figure 1F,J), but not in the control retina (Figure 1B). B1R mRNA expression in wet AMD (Figure 1J) was significantly different (GCL and INL) from the control retina (Figure 1B,M), but not from the dry form (Figure 1F,M).

B1R mRNA expression was significantly higher only in GCL in the dry form, in comparison to the control retina (Figure 1M). B2R mRNA expression was quite low and not significantly different between the two forms of AMD (Figure 1G,K,N) or in comparison with the control retina (Figure 1C,N), yet most of the microvessel walls highly expressed B2R mRNA (not quantified). VEGFA mRNA expression was striking in each retina, especially in the GCL and INL. Surprisingly, compared to the control retina (Figure 1D,O), VEGFA mRNA expression in the INL was significantly lower in the wet AMD retinae, but it was similar in the other layers (Figure 1L,O). The reason for this low mRNA expression in the wet AMD (INL) has not been investigated; one hypothesis that can be made is that this change is caused by a medication taken by these patients. For example, it was reported that statins, used in most elderly patients, decrease VEGF expression by reducing the oxidative stress in RPE culture [28]. Unfortunately, the use of medication was not reported in the medical history of the donors used in this study, although we can confirm that they did not receive any anti-VEGF therapy. Some unidentified structures expressed the three markers, but it was not clear whether this was degenerating retinal ganglion cells or lipofuscin deposits.

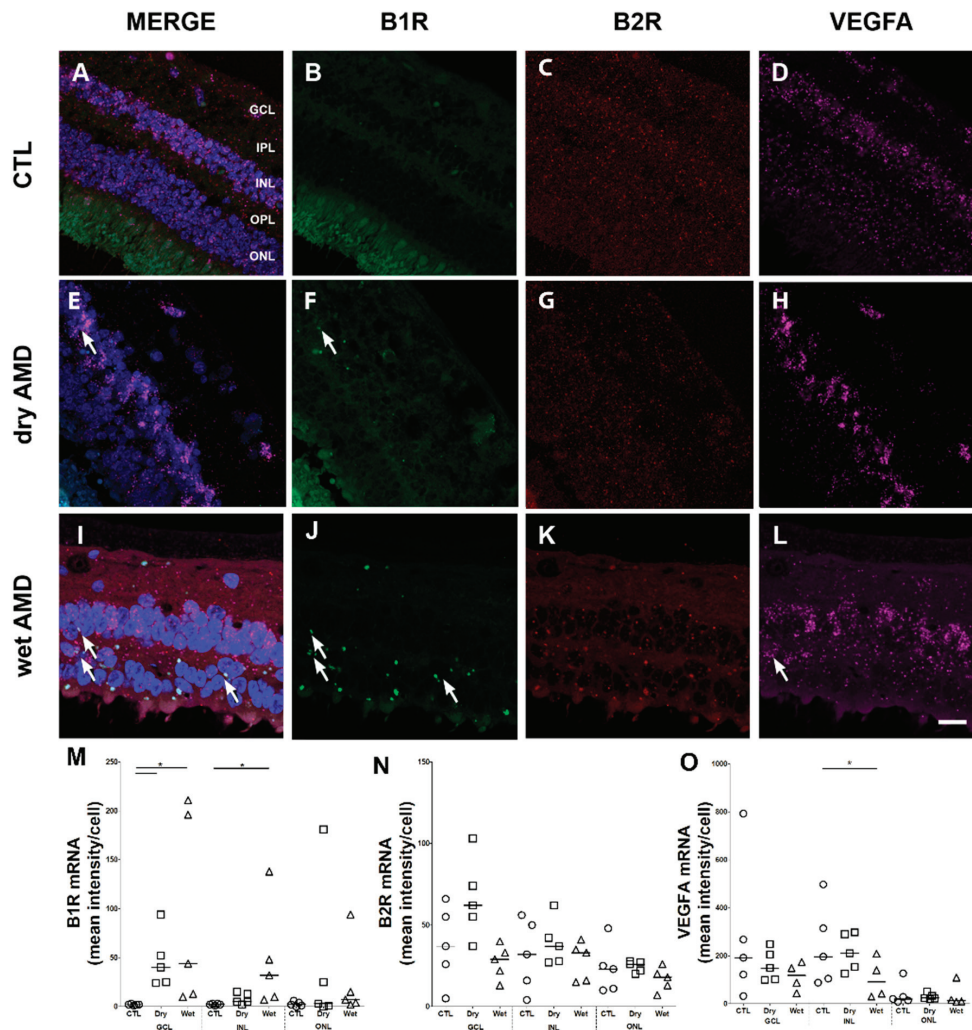
### 2.2. B1R Immunoreactivity and Cellular Distribution

B1R immunoreactivity was scarcely detectable in control retinae (Figure 2, left panel). In the dry AMD, the level of B1R staining in all layers (GCL, inner plexiform layer (IPL), INL, outer plexiform layer (OPL), ONL) tended to increase compared to control, but this did not achieve statistical significance (Figure 2A, middle panel, and Figure 2B). In contrast, B1R staining was significantly stronger in GCL, IPL, INL and ONL of the wet AMD retinae, when compared to the control counterparts (Figure 2A, right panel, and Figure 2B). B1R staining was also intense in the photoreceptor layer of the wet AMD retinae, however, this layer was often damaged and the high level of autofluorescence in the external segments of PR prevented accurate quantification.

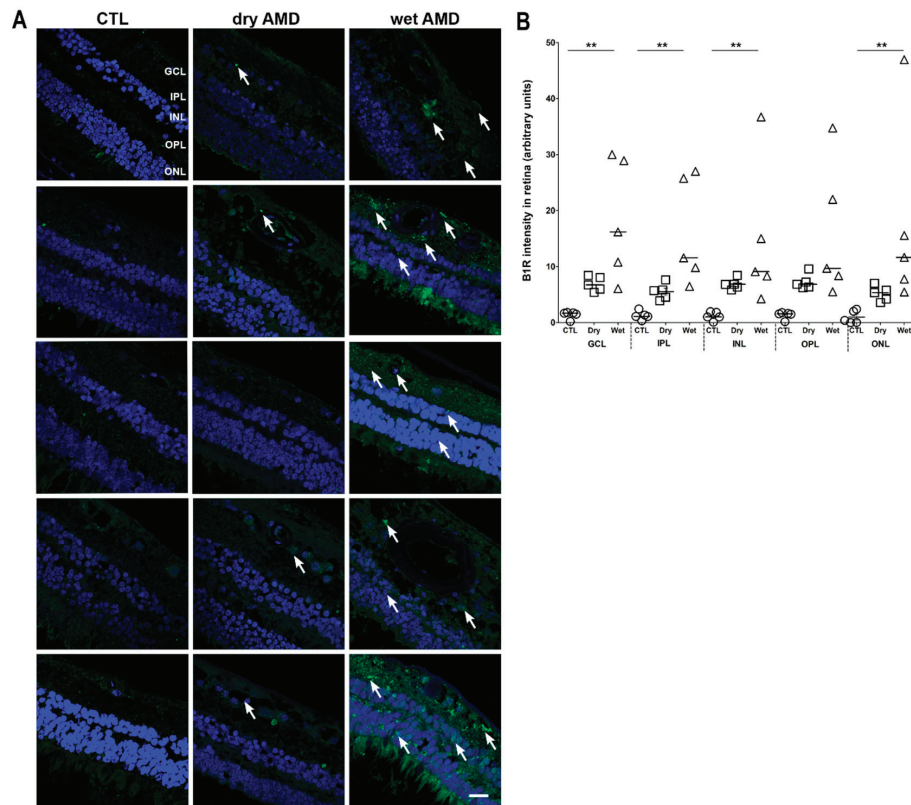
Further investigation was performed to determine the cell-type expression of B1R immunoreactivity, particularly on retinal vessels. B1R staining was absent in control blood vessels, but it was intense in the AMD retinae, especially in the wet form, where B1R was expressed in smooth muscle and endothelial cells (Figure 3). Moreover, B1R immunoreactivity was found in the RPE of the dry and more intensively of the wet AMD retinae, but was absent in the RPE of control retinae (Figure 3). Due to the fragility of the pathological RPE layer, RPE was not present in all sections. Thus, B1R observation in RPE was limited to two patients in the wet form, three in the dry AMD and four in the controls.

### 2.3. Macroglia Immunoreactivity

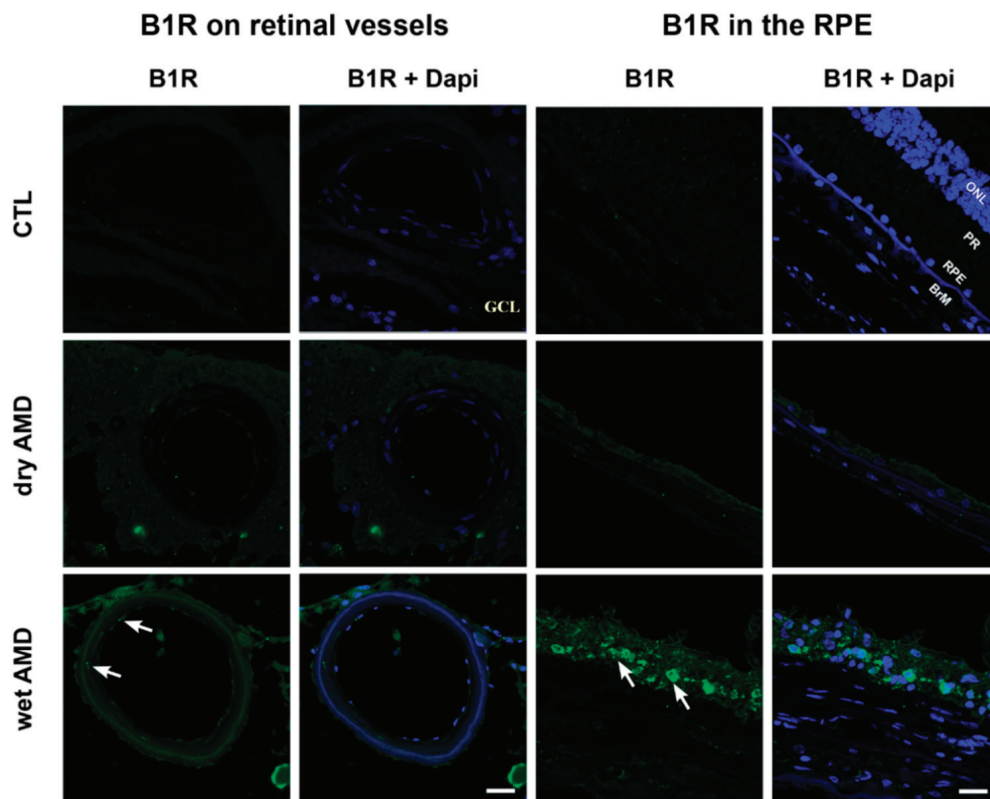
We next evaluated the reactivity of the retinal macroglia in the two forms of AMD, and their expression of B1R. Macroglia, i.e., astrocytes and Müller cells, as a population of retinal cells, become activated in the presence of cellular stress and in aging to protect the retina and overexpress the glial fibrillary acidic protein (GFAP) [29,30]. However, a chronic activation of these cells accelerates the evolution of the pathology, opens the blood-retinal barrier, which facilitates the infiltration of toxic compounds and participates to neovascularization [29]. Thus, the immunoreactivity of macroglia cells was observed using the GFAP marker (Figure 4).



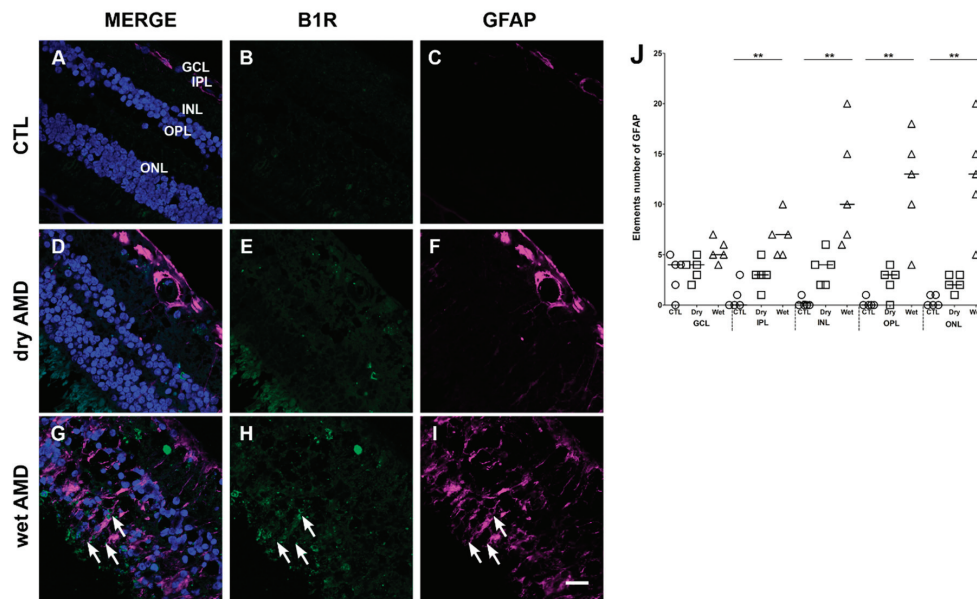
**Figure 1.** B1 and B2 receptors (B1R, B2R) and vascular endothelial growth factor A (VEGFA) mRNA expression in human retinæ (A–L). Microphotographs showing the mRNA labeling for B1R (green; B,F,J), B2R (red; C,G,K) and VEGFA (purple; D,H,L) in the control (CTL), dry age-related macular degeneration (AMD) and wet AMD retinæ. Sections are counterstained for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue; A,E,I), which labels cell nuclei. Note that B1R was partially colocalized with B2R in wet AMD in the outer nuclear layer (ONL), and B2R was also partially colocalized with VEGFA in the ONL, however, there was rare colocalization between B1R and VEGFA. Images were obtained at 40×. Scale bar: 20 µm. (M–O) Quantification of the mRNA (mean fluorescence intensity/cell) of B1R, B2R and VEGFA in the different layers of the retina. Data are mean ± SEM of values obtained from five retinæ per group and four zones per retina. \*  $p < 0.05$  AMD compared with control. CTL: control (O), Dry: dry AMD (□), Wet: wet AMD (Δ), GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer.



**Figure 2.** B1R immunoreactivity in human retinae. **(A)** Microphotographs show B1R in five human control (left panel), five dry (middle panel) and five wet (right panel) AMD retinae. B1R (green) was not detected in control retina, and mostly expressed in the GCL of the dry AMD retinae (arrows). In the wet AMD, B1R was highly detected in most retinal layers. Sections are all counterstained for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue), which labels cell nuclei. Images were obtained at 40×. Scale bar: 20 μm. **(B)** Semi-quantification of B1R fluorescence intensity on all the surface area of each retinal layer from five dry AMD, five wet AMD and five controls showing a significant increase (\*\*  $p < 0.005$ ) of B1R labeling intensity in the wet AMD, compared to the control retina. Data represent mean intensity  $\pm$  SEM after subtraction of the background intensity. CTL: control (O), Dry: dry AMD (□), Wet: wet AMD (△), GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer.



**Figure 3.** Microphotographs of immunolocalization of B1R in smooth muscle and endothelial cells of blood vessels (arrows) and in the retinal pigment epithelium (RPE) (arrows) of human AMD retina, compared to the control (CTL). Sections are counterstained for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue), which labels cell nuclei. Images were obtained at 60 $\times$ . Scale bar: 40  $\mu$ m. BrM: Bruch's membrane, GCL: ganglion cell layer, ONL: outer nuclear layer, PR: photoreceptor layer, RPE: retinal pigment epithelium.

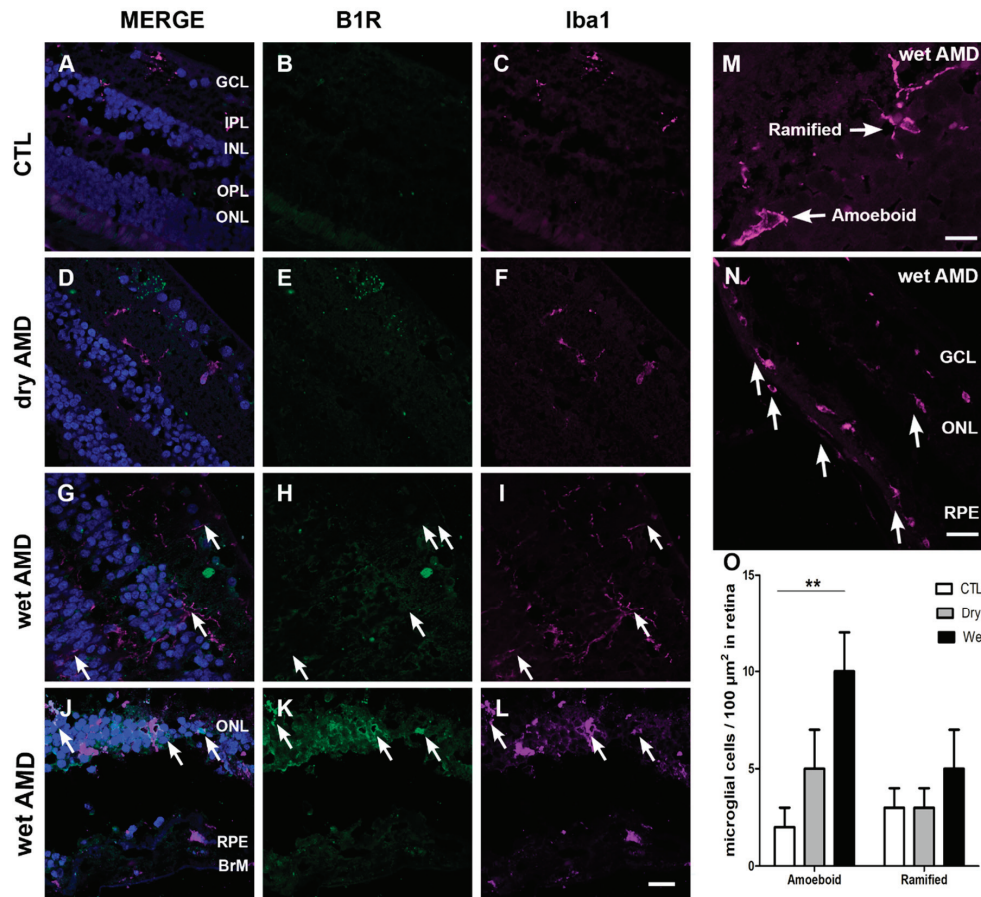


**Figure 4.** B1R colocalization with the glial fibrillary acidic protein (GFAP) macroglia marker in human retinae. (A–I) Microphotographs showing GFAP immunoreactivity and its co-expression with the B1R. GFAP immunoreactivity (purple) is co-expressed with B1R only in the wet AMD (G). Sections are all counterstained for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue), which labels cell nuclei (A,D,G). Images were obtained at 40×. Scale bar: 20 μm. (J) Semi-quantification of GFAP fluorescent projections on all the surface area of each retinal layer from five dry AMD, five wet AMD and five controls (CTL). GFAP was significantly increased (\*\*  $p < 0.005$ ) in all the layers, except GCL, of wet AMD retinae in comparison with the control. Data represent mean intensity  $\pm$  SEM after subtraction of the background intensity. CTL: control (O), Dry: dry AMD (□), Wet: wet AMD (Δ), GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer.

In immunofluorescence staining retinal sections, a slight but not significant increase of GFAP expression was observed in the dry AMD (Figure 4F,J), when compared to the control (Figure 4C,J). However, in the wet AMD retinae, an intense reactivity of GFAP was observed (Figure 4I,J). The GFAP immunoreactivity was significantly increased in the IPL, INL, OPL and ONL. Interestingly, a partial colocalization of B1R with GFAP was observed in the wet AMD mostly in the outer retina (Figure 4G).

#### 2.4. Microglia Immunoreactivity

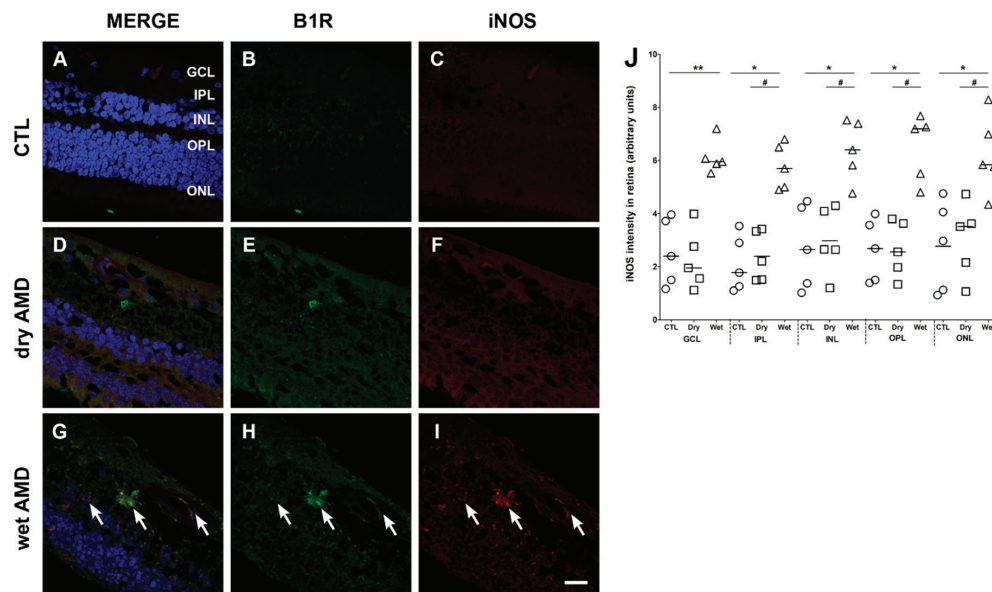
One of the hallmarks of retinal degeneration is microglia activation [31]. Hence, we assessed microglia cell expression, using ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1) marker (Figure 5). Iba1 expression was restricted to the inner retina (GCL and INL) in the control and dry AMD retinae. In control retina, microglia has small soma with thin ramifications, whereas in AMD retinae microglia activation was observed, and it was indicated by two phenotypes: hypertrophic somas and retraction of ramifications, and an amoeboid shape indicating a fully activated microglia [4]. The amoeboid shape was highly present in the wet AMD, especially in the outer layers, RPE and ONL (Figure 5L,N). Moreover, microglia cell proliferation (number of microglia/100 μm<sup>2</sup>) of the amoeboid shape was noticed in the wet AMD retinae, but not in the dry AMD (Figure 5O). Double immunostaining of Iba1 and B1R showed a colocalization of these two proteins only in the wet AMD retinae (Figure 5G,J).



**Figure 5.** B1R colocalization with microglia in human retinæ. (A–L) Microphotographs showing ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) immunoreactivity and co-expression with B1R. Iba1 (purple) was markedly increased in all the layers of wet AMD retinæ (arrows in I and L), when compared to the control (C) and dry AMD (F) retinæ. In both forms of AMD, microglia activation was observed (arrow in F, I and L), indicated by hypertrophic somatic areas and highly activated microglia. Iba1 double immunostaining with B1R shows a co-expression of these two proteins all over the wet AMD retinæ only (G and J). Sections are all counterstained for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue), which labels cell nuclei (A,D,G,J). (M) ramified and amoeboid shape microglia. (N) Infiltrating microglia in the RPE layer. Images are: A–L; 40× (20 µm), M; 60× (10 µm) N; 20× (40 µm). (O) Counting of ramified and amoeboid microglia in the retina. Data represent mean intensity ± SEM after subtraction of the background intensity. \*\*  $p < 0.005$  wet AMD compared with the control (CTL). BrM: Bruch's membrane, GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer, RPE: retinal pigment epithelium.

### 2.5. iNOS Immunoreactivity

We then assessed the expression of iNOS, an enzyme contributing to increase the oxidative stress and by which B1R mediates inflammation in diabetic retinopathy [17]. The levels of iNOS in the dry AMD retinæ (Figure 6F) were similar to the levels of the control retinæ (Figure 6C) in all retinal layers (Figure 6J). In contrast, iNOS expression was significantly increased in all layers of the wet AMD retinæ in comparison with the dry AMD and control retinæ (Figure 6I,J). Moreover, the double labeling of B1R and iNOS showed a colocalization of these two proteins in all layers of the wet AMD retinæ (Figure 6G), but not in the control (Figure 6A) or dry AMD retinæ (Figure 6D).

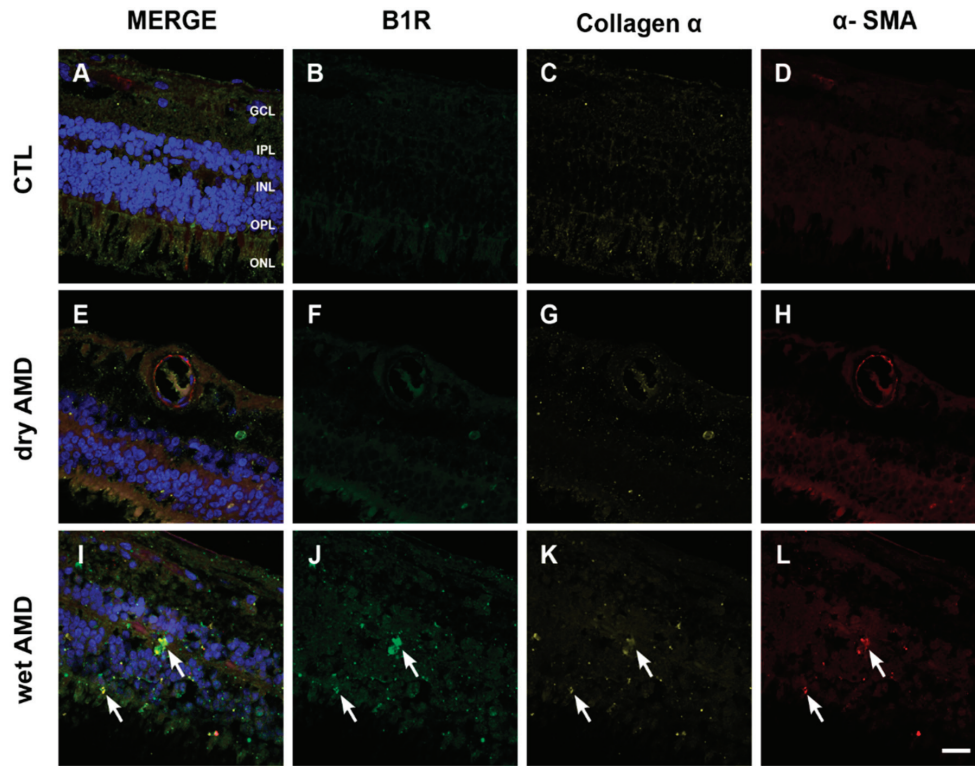


**Figure 6.** B1R colocalization with inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human retinæ. (A–I) Microphotographs showing iNOS immunoreactivity and its co-expression with the B1R. iNOS immunoreactivity (red) was slightly detectable in the dry AMD (F) and the control retinæ (C), but highly expressed in all layers of the wet AMD retinæ (arrows in I). A colocalization of iNOS with B1R was observed in all layers of the wet AMD (G), but not in the dry AMD (D) or control (A) retinæ. Sections are all counterstained for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue), which labels cell nuclei (A,D,G). Images were obtained at 40 $\times$ . Scale bar: 20  $\mu$ m. (J) Semi-quantification of iNOS fluorescence intensity on all the surface area of each retina from five dry AMD, five wet AMD and five controls. Data represent mean intensity  $\pm$  SEM after subtraction of the background intensity. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.005$  wet AMD compared with the control (CTL), #  $p < 0.005$  dry AMD compared with the wet AMD. CTL: control (O), Dry: dry AMD ( $\square$ ), Wet: wet AMD ( $\Delta$ ), GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer.

## 2.6. Fibrosis Formation

Since fibrotic lesions was shown in neovascular AMD [32], and fibrosis was associated with an upregulation of B1R [33], we evaluated the occurrence of fibrosis in both forms of AMD using the expression of  $\alpha$ -SMA and collagen 1 $\alpha$  as markers [34,35]. Neither the control (Figure 7C,D) nor the dry AMD (Figure 7G,H) retinæ showed any specific staining to evidence fibrosis formation. However, an increase of immunoreactivity of  $\alpha$ -SMA and collagen 1 $\alpha$  was seen in the wet AMD retinæ, particularly in the outer layers (Figure 7K,L). More interestingly, a colocalization of collagen 1 $\alpha$  and  $\alpha$ -SMA with B1R was observed in all the outer layers (OPL and ONL) of the wet AMD (Figure 7I), but not in the dry AMD (Figure 7E) or control (Figure 7A) retinæ.

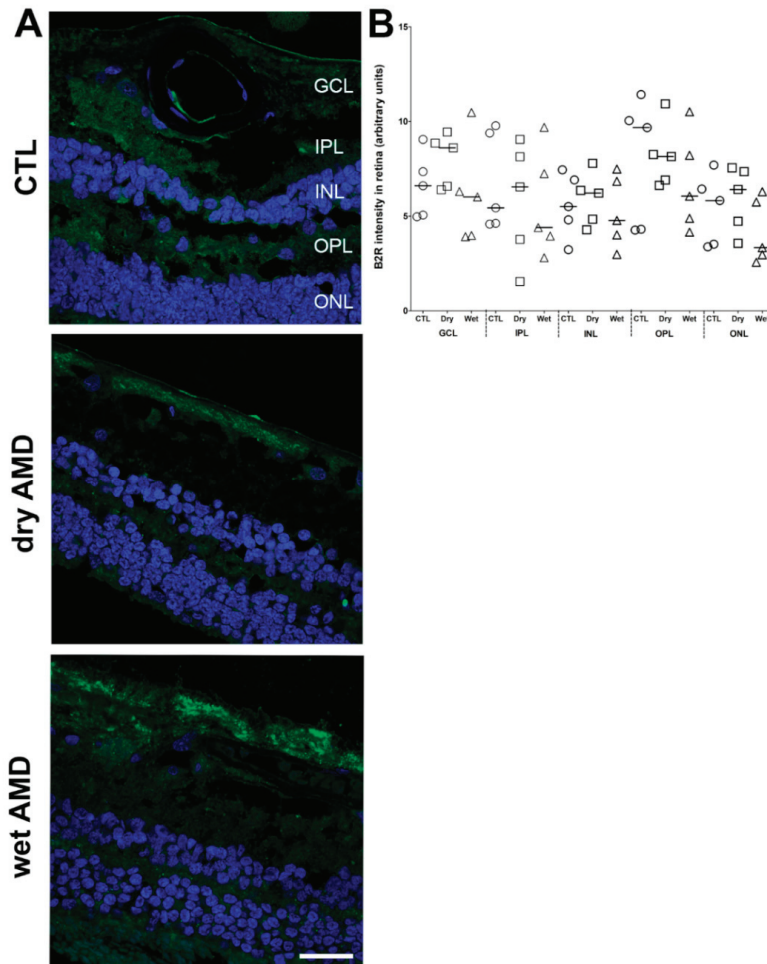




**Figure 7.** B1R colocalization with fibrosis markers in human retinae. (A–L) Microphotographs showing collagen 1 $\alpha$  (yellow) and  $\alpha$ -SMA (red) immunoreactivity and their co-expression with the B1R (green) in human retinae. Collagen 1 $\alpha$  and  $\alpha$ -SMA immunoreactivity was slightly detectable in the dry AMD ((G) and (H)) and control retinae ((C) and (D)), but strongly increased in the wet AMD retinae (arrows in (K) and (L)). A colocalization of collagen 1 $\alpha$  and  $\alpha$ -SMA with B1R was observed in the outer layers of the wet AMD (I) but not in the dry AMD (E) or control (A) retinae. Sections are all counterstained for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue), which labels cell nuclei (A,E,I). Images were obtained at 40 $\times$ . Scale bar: 20  $\mu$ m. GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer.

### 2.7. B2R Immunoreactivity

Since B2R genomic expression was unchanged in the AMD retinae (Figure 1), we checked whether this can be translated at protein level in AMD retinae. Immunofluorescence staining failed to show any significant changes in the expression of B2R in the dry and wet AMD in comparison with the control retinae (Figure 8A,B). No further investigation was made to identify the cell-type bearing the B2R in human retinae.



**Figure 8.** B2R immunoreactivity in human retinæ. (A) Microphotographs of immunolocalization of B2R in the human control (CTL), dry and wet AMD retinæ. All three groups express the same protein levels of B2R, particularly in the GCL and ONL. Sections are counterstained for 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; blue), which labels cell nuclei. Images were obtained at 40 $\times$ . Scale bar: 20  $\mu$ m. (B) Semi-quantification of B2R fluorescence intensity on all the surface area of each retina from five dry AMD, five wet AMD and five control retinæ. Data represent mean intensity  $\pm$  SEM after subtraction of the background intensity. CTL: control (O), Dry: dry AMD ( $\square$ ), Wet: wet AMD ( $\Delta$ ), GCL: ganglion cell layer, IPL: inner plexiform layer, INL: inner nuclear layer, OPL: outer plexiform layer, ONL: outer nuclear layer.

### 3. Discussion

The present study provides the first demonstration that B1R is highly expressed in human wet AMD retina, but weakly in the dry form. In the wet AMD retinæ, B1R was particularly densely expressed in blood vessels and RPE, which suggests an implication of the inducible B1R in the alteration of blood-retinal barrier and the outer retinal-barrier in AMD. Moreover, B1R was colocalized with iNOS, microglia and macroglia markers, as well as with fibrosis markers throughout the wet AMD retina, supporting a role for B1R in the inflammatory process in AMD. This is in keeping with our team's earlier data showing that B1R is overexpressed in laser-induced CNV in rodents, where B1R blockade had beneficial effects on both inflammation and neovascularization [16]. Hence, these findings support an implication of the B1R in wet AMD, while its involvement in the dry form remains uncertain on the basis of its weak immunocytochemical expression. One potential important outcome arising from this

research is the possibility to treat wet AMD with an antagonist of B1R to reduce inflammation and fibrosis. In contrast, B2R expression was not altered in the dry and wet AMD retinae, highlighting a differential expression of both kinin receptors in AMD.

### 3.1. B1R in Human Wet AMD

An upregulation of B1R expression in a rat model of CNV was recently reported [16]. Moreover, several studies suggested a major implication of the B1R in retinal pathologies, by increasing the inflammatory response, vascular permeability and leukostasis [15,17,18]. Here, we show an upregulation of B1R in all layers of AMD retinae, with a more prominent expression in the wet form. Interestingly, our histopathologic study shows an expression of B1R on the endothelial cells of the retinal blood vessels of wet AMD retinae. This is in agreement with our previous study, showing B1R expression on retinal endothelial cells in rat CNV [16]. Endothelial cell dysfunction is a major contributor to the opening of the blood-retinal barrier in retina including diabetic retinopathy and AMD [29]. The presence of B1R on endothelial cells of the human AMD retina may contribute to endothelial dysfunction and blood-retinal barrier alteration. B1R expression was also expressed on vascular smooth muscle cells in the wet AMD retinae. With few exceptions, B1R activation constricts veins and dilates arteries through endothelium/NO pathway [36,37]. B1R arterial/arteriolar-induced dilation associated with post-capillary constriction would lead to increased capillary hydrostatic pressure and subsequent plasma protein extravasation and oedema. This is supported by several studies showing a major contribution of B1R in enhanced retinal vascular permeability, which was reversed by B1R blockade [16–18,38]. While B1R can also affect the retinal blood flow, it is still uncertain whether B1R can contribute to retinal ischemia through a prolonged stimulatory action on vascular smooth muscle cells. Retinal ischemia is a major contributor of neovascularization through VEGFA activation [29]. B1R is implicated in retinal neovascularization in laser-induced CNV through a mechanism independent of the VEGFA/VEGFR2 axis, and B1R antagonism reduced CNV [16]. This is reminiscent of the neovascularization induced by the B1R agonist (Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK), which was sensitive to B1R antagonism in the rabbit cornea [39]. Collectively, these data suggest an implication of B1R in neovascularization.

Interestingly, B1R was highly expressed in the outer blood-retinal barrier and RPE of the wet AMD retinae. The RPE layer separates the retina from the choroid, providing a protection against outer insults. Hence, an alteration of this layer exposes the retina to the choroidal circulation and to an infiltration of pro-inflammatory immunomodulators. Choroidal neovascularization in patients with AMD induces the loss of the outer blood-retinal barrier by down-expression of specific genes like RLBP1, RPE65 and VEGFA [40]. Despite the important role of the choroid and Bruch's membrane in the development of AMD pathology, the RPE is considered as a fulcrum of AMD pathogenesis [9]. Indeed, RPE dysfunction precedes the end stages of the wet and dry AMD [8]. Therefore, the high expression of B1R in the RPE of human AMD retinae points towards an implication of this receptor in the alterations caused to the RPE layer. Indeed, inflammation and oxidative stress are the main participants in the alteration of RPE in AMD. Targeting one of these two events can slow down and even prevent RPE degeneration [8,41]. It is worth noting that B1R was expressed in the RPE and perpetuated inflammation and oxidative stress in diabetic retinae [15,17,18]. Hence, the presence of B1R in the RPE may contribute to RPE degeneration through the inflammation and oxidative stress in human AMD.

### 3.2. Glia Cells in AMD

The mammalian glia includes macroglia (astrocytes, Müller cells) and microglia. Glial cells are dynamic keepers of the tissue and become activated following an insult to the retina [4,6]. In the present study, an increase in GFAP immunoreactivity, considered a hallmark of macro-gliosis [42], was observed in all layers of the wet AMD retinae and mainly in the GCL of the dry AMD retinae, indicating an increase in astrocyte reactivity. Müller cells have similar roles as astrocytes, and they

span across the retina [43]. Although activated macroglia provides retinal neuroprotection, their chronic activation is harmful for the retina [44]. Chronic gliosis increases vascular permeability and neovascularization in retina, thus exacerbating the disease progression [29]. Moreover, our study shows a co-expression of GFAP with the B1R in human AMD retinae. This is in line with our previous results in a pre-clinical model of AMD [16]. Furthermore, B1R was shown to be expressed on brain astroglia in mice models of encephalomyelitis and Alzheimer's disease [45,46], and blocking B1R had beneficial effects on the pathology of Alzheimer's [46]. Inhibition of B1R also protects from brain injury by reducing astroglia activation in mice [47]. Hence, our observation about the colocalization of B1R with GFAP suggests an implication of B1R in chronic gliosis in human AMD.

Macroglia interact with microglia in health and retinal disease [48], and regulate its activation and phagocytic function [49]. Microglia are resident macrophages, playing an essential role in protecting retina against noxious insults. With aging, microglia display increased signs of gliosis indicated by a retraction of ramifications and soma hypertrophy, and the amoeboid phenotype prevails when microglia are highly activated [4]. Our study shows a more prominent expression of Iba1, a microglia marker, in the wet than in the dry AMD. However, in both forms, activated microglia (amoeboid) were more expressed than the quiescent microglia (ramified). A high expression of amoeboid microglia was observed in the outer retina of the wet AMD, especially between the RPE and Bruch's membrane. These observations suggest an infiltration of microglia that occurs in the wet AMD. In contrast, activated microglia in the outer retina of the dry AMD was less observed. This is consistent with the less impressive role of microglia in the dry AMD [6] and their harmful role in the wet form, contributing to the progression of the pathology and the degeneration of photoreceptors [4]. Moreover, our immunofluorescence staining showed a co-expression of B1R with the amoeboid, but not with the ramified microglia all over the wet AMD retinae, particularly in the outer layers of the wet AMD (ONL and RPE). This is reminiscent of the colocalization of B1R with Iba1 in our rat model of laser-induced CNV [16]. These observations suggest an implication of B1R in microglia activation. Moreover, the high B1R co-expression with microglia in the outer retina points to its implication in microglia infiltration in AMD. Indeed, in cultured microglia, the B1R, but not the B2R, agonist induced microglia migration, motility and chemotaxis, and this response was blocked by B1R antagonists [50].

### 3.3. Oxidative Stress in AMD

Several studies highlighted the contribution of oxidative stress in AMD progression, where plasmatic and retinal levels of oxidative stress markers were found increased in patients with AMD [51–53]. Moreover, recent studies showed that increased oxidative stress in RPE cells alters not only coding genes, but also non-coding genes related to biochemical pathways associated with all major fields of cellular metabolism [54–56]. Here, we show an upregulation of iNOS expression in the human wet AMD, but not in the dry form. Moreover, iNOS was co-expressed with the B1R in the wet AMD retinae. This is in line with previous observation showing that B1R increases oxidative stress and activates iNOS in diabetic retinopathy [17], and blocking B1R inhibited iNOS upregulation and oxidative stress [18]. B1R through iNOS and NADPH oxidase activation leads to peroxynitrite formation, a highly cytotoxic molecule that causes DNA damage, lipid peroxidation, proteins nitration, inflammation and major damage to vessels [57]. In conformity with this, changes of blood flow parameters related to vessels damage in human glaucoma were attributed to peroxynitrite formation [58]. One of the current strategies to treat AMD is to target oxidative stress. Hence, a major clinical trial (Age-Related Eye Disease Study (AREDS)) showed that dietary and supplementary anti-oxidants intake (vitamin C, vitamin E, beta-carotene and zinc) decreased the risk of advanced AMD and its associated vision loss [59].

### 3.4. Fibrosis in AMD

Despite improving visual acuity, unsuccessful treatments with anti-VEGF in AMD have often been attributed to the formation of subretinal fibrosis [60]. The progression of photoreceptor destruction was

found to be proportional to the diameter and thickness of the subretinal fibrosis [61]. Indeed, subretinal fibrosis can lead to degeneration of RPE, photoreceptors and choroidal vessels [60]. Interestingly, our histopathologic studies have shown an intense immunoreactivity of fibrosis markers (collagen 1 $\alpha$  and  $\alpha$ -SMA) in the wet AMD, but not in the dry form, co-localized with the B1R. Several studies showed a contribution of B1R in fibrosis formation. For instance, in diabetic cardiomyopathy, B1R mediated inflammation and fibrosis [22]. In human embryonic lung fibroblasts, B1R activation induced collagen I synthesis and fibrogenesis [62]. B1R blockade reversed inflammation and the expression of fibrosis markers (collagen and  $\alpha$ -SMA) in renal fibrosis [23,33]. Here, we show a colocalization of B1R with the fibrosis markers (collagen 1 $\alpha$  and  $\alpha$ -SMA), suggesting a possible implication of B1R in fibrosis formation in human wet AMD.

### 3.5. B1R and B2R in Neovascularization

B2R plays a key role in physiological and less commonly in pathological neovascularization [24]. Indeed, B2R blockade in laser-induced CNV in mice decreased VEGF expression [63]. B2R partakes in tumor angiogenesis [26] and in pathological neovascularization in oxygen-induced retinopathy, where B2R blockade reduced retinal neovascularization and the expression of proangiogenic and pro-inflammatory cytokines [25]. However, our immunofluorescence and mRNA assay did not show any changes in B2R expression in the wet and dry AMD retina. Thus, the role of B2R in AMD remains doubtful, particularly in absence of changes in RNA and protein expression.

The role of B1R in angiogenesis was first reported in 1993 [64]. In a model of limb ischemia, B1R was shown to promote neovascularization [65], and this response was reduced in B1R knocked-out mice [66]. In this study, we found a weak induction and expression of B1R in the dry AMD, in comparison with the prominent upregulation of B1R in the wet form, suggesting a possible role of B1R in the neovascularization events of wet AMD. This hypothesis is supported by the pre-clinical finding showing that B1R blockade reversed the inflammatory response and the CNV size in rat retina [16]. In the latter study, B1R was found to partake to the inflammatory process in CNV independently of the VEGFA pathway [16].

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Subjects

Post-mortem human eyes were obtained from the Human Eye Biobank for Research at St. Michael's Hospital, Toronto, Canada. The retina donation and the protocols were conformed to the 2013 Helsinki declaration and the ethical standards of the Ethical Committee of Health Research, Université de Montréal (17-142-CERES) and St. Michael's Hospital Research Ethics Board. Donors signed a consent donation form when they were alive, or the assent of a parent was obtained after death. Eyes from five patients with dry AMD ( $83 \pm 4$  years), five patients with wet AMD ( $92 \pm 4$  years) and five controls ( $71 \pm 5$  years) were studied (Table 1). Subjects were excluded if post-mortem time-to-fixation was greater than 24 h, and subject information reports indicated that none of the patients received any anti-VEGF treatment for AMD.

**Table 1.** Characteristics of retinal donors.

Patients	Control		Dry AMD		Wet AMD	
	Age	Sex	Age	Sex	Age	Sex
1	72	F	88	M	92	M
2	59	F	95	F	102	M
3	73	M	83	F	90	M
4	86	M	77	F	98	F
5	65	M	70	M	76	M
<b>Mean ± SEM</b>	71 ± 5		83 ± 4		92 ± 4	

F: Female, M: Male.

#### 4.2. Immunofluorescence

B1R, B2R, iNOS, fibrosis markers ( $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and collagen1  $\alpha$ ) and glial cells markers (glial fibrillary acidic protein (GFAP) for macroglia and ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) for microglia) were detected by immunohistochemistry on paraffin embedded retinae, as described previously [17]. Sections obtained from the Eye Biobank were deparaffinized prior to the immunofluorescence procedure. Glass slides were first incubated in sodium citrate buffer at 95 °C for 35 min. Sections were then left to cool down for 20 min at room temperature (RT), then washed three times ( $3 \times 5$  min) with 0.1 M PBS buffer (pH 7.4) and incubated for 1 h at RT in blocking buffer (PBS containing 10% donkey serum or goat serum and 0.25% triton X-100). Sections were left incubated overnight at RT, with the blocking buffer containing primary antibodies (Table 2).

**Table 2.** List of primary antibodies.

Antigen	Antibody Concentration and Source
<b>B1R</b>	Rabbit polyclonal, 1:100, Biotechnology Research Institute, Montreal, QC, Canada [67]
<b>B2R</b>	Rabbit polyclonal, 1:50, Alomone labs, Jerusalem, Israel
<b>iNOS</b>	Mouse monoclonal, 1:200, MAB9502, R&D systems, Oakville, ON, Canada
<b>Iba1</b>	Mouse monoclonal, 1:200, MABN92, EMD Millipore, Oakville, ON, Canada
<b>GFAP</b>	Chicken polyclonal, 1:1000, AB4674, Abcam, Cambridge, MA, USA
<b>Collagen 1<math>\alpha</math></b>	Goat polyclonal, 1:50, AF6220, R&D systems, Oakville, ON, Canada
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Mouse monoclonal, 1:50, M0851, Dako, Burlington, ON, Canada

The following day, slides were washed  $3 \times 5$  min in PBS 0.1M and then incubated for 2 h at RT with secondary antibodies: Alexa Fluor 555 goat anti-rabbit (1:200, A21428), Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:200, A21206), Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse (1:200, A31570), Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse (1:200, A21202), Alexa Fluor 546 donkey anti-goat (1:200, A11056), Alexa Fluor 555 goat anti-chicken (1:200, A21437), Alexa Fluor 633 donkey anti-goat (1:200, A21082), all purchased from Life Technologies, Burlington, ON, Canada. To eliminate the autofluorescence caused by tissue components and by the accumulation of lipofuscin [68], an autofluorescence eliminator reagent (2160, Sigma Aldrich, Oakville, ON, Canada) was used. The slides were then washed and mounted using a homemade glycerol solution. Images were obtained with a confocal microscope Zeiss-LSM800 equipped with an argon laser (Carl Zeiss, Jena, Germany) and transferred to a computer and analyzed using NIH ImageJ 1.36b Software (NIH, Bethesda, MD, USA). Images were obtained at 40 $\times$  and 60 $\times$  objectives. Semi-quantification of immunofluorescence staining intensity was made on five randomly selected surface areas of each retina from five dry AMD, five wet AMD and five controls. Background intensity (gray intensity) was subtracted from each individual value.

#### 4.3. In Situ Hybridization: RNA Scope Assay

To visualize and quantify the genomic expression of B1R, B2R and VEGFA, RNA scope fluorescent multiplex reagent kit (Advanced Cell Diagnostics (ACD), Newark, IL, USA) was used, following the manufacturer recommendations. First, tissue sections were deparaffinized with xylene ( $2 \times 5$  min) and

alcohol 100% (2 × 5 min). To permeabilize cells and unmask target RNA, sections were pre-treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 10 min at RT, washed with distilled water for 2 min, and incubated for 25 min at 95 °C in target retrieval 1× solution (Cat no. 322335). Slides were then washed for 15 s with distilled water, prior to a wash for 3 min with 100% alcohol. Sections were left to dry out for 5 min at RT. To break the nuclear membrane, sections were treated with a protease III solution (Cat no. 322337) at 40 °C for 30 min and then washed twice for 5 min each with distilled water. To target RNA molecules, sections were hybridized with a mix of three probes (Hs-BDKRB1, Hs-BDKRB2-C2, Hs-VEGFA-C3 for B1R, B2R and VEGFA, respectively). Three amplifiers for each probe (respectively AMP1, AMP2 and AMP3) were added consecutively, and incubated each time at 40 °C for 30 min. Sections were washed using wash-buffer and the signals were developed with horseradish peroxidase HRP-C signal Opal specific for each probe (Opal 520 for B1R detection, Opal 570 for VEGFA detection and Opal 690 for B2R detection) and incubated at 40 °C for 15 min, followed by another incubation at 40 °C for 30 min. The reactions were stopped by incubating a section with HRP blocker at 40 °C for 15 min. Sections were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and mounted using a homemade glycerol solution. Images were obtained with a confocal microscope Zeiss-LSM800 equipped with an argon laser (Carl Zeiss, Jena, Germany) and transferred to a computer and analyzed using NIH ImageJ 1.36b Software (NIH, Bethesda, MD, USA). Images were obtained at 40× objective. The quantification of fluorescence staining intensity was made using ACD guidelines. Briefly, five microphotographs (160 μm<sup>2</sup> of dimensions) were randomly taken for each retina from five dry AMD, five wet AMD and five controls. Each fluorophore channel was analyzed separately, using each nuclear layer as a region of interest. At least twenty dots were selected in each region, the area of the integrated intensity of each dot was then measured. The average intensity per single dot was then calculated using the following formula: (average of integrated intensity of selected dots – average background intensity × average area of selected dots)/number of selected dots). The total dot intensity in the region of interest was then calculated using the following formula ((total intensity of region of interest – Average background intensity × total area)/average intensity per single dot). The average of intensity per cell was then counted by dividing total immunofluorescence intensity in the chosen region of interest by the total number of cells in the same region.

#### 4.4. Statistical Analysis of Data

Results are expressed as the mean ± SEM, and n represents the number of patients. Statistical analysis of data was performed using Prism™ version 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Kruskal-Wallis, followed by a Dunn post hoc test, was used for comparison between the control, dry AMD and wet AMD. The results were considered significant at  $p < 0.05$ .

## 5. Conclusions

The use of post-mortem human retinae in this study provided an opportunity to expand our knowledge of wet and dry AMD pathology. A summary of the key findings is provided in Table 3. The limitations of this study include variation between subject ages, and the lack of a detailed AMD and medical history on each donor eye. However, none of those patients have received any treatment for AMD, and our results confirmed an intense immunoreactivity for B1R in all the wet AMD retinae, in comparison with a weak expression in the dry AMD retinae and nearly no expression in the control retinae. Importantly, B1R was co-expressed with several inflammatory/fibrosis markers and, notably, glial cells in the wet form only. Thus, it was obvious that inflammatory events are exacerbated in the wet form compared to the dry form, especially with regard to B1R expression, reactive gliosis and microglia activation and infiltration. While more studies are needed to determine the precise role of B1R in AMD, the induction and upregulation of this pro-inflammatory and pro-fibrotic receptor in human AMD retina support previous pre-clinical studies, and provide a clinical proof-of-concept that B1R represents an attractive therapeutic target worth exploring in AMD.

**Table 3.** Summary of the differences in protein expression between the control, dry and wet AMD retinae.

Markers	Control	Dry AMD	Wet AMD
B1R	+/-	+	+++
GFAP	+	++	+++
Iba1	+ (ramified)	++ (Amoeboid > ramified)	+++ (Amoeboid > ramified)
iNOS	-	+/-	+++
Fibrosis	-	-	+++
B2R	+	+	+

+/-; slight or absence, +; low, ++ medium, +++ high immunoreactivity.

**Author Contributions:** Conceptualized the study, analyzed the data and interpreted the results, R.O., E.V., R.C.; Conducted experiments, R.O.; Technical assistance with the RNAscope, S.B.; Writing original draft and the figures, R.O.; Editing the manuscript, R.O., E.V., R.C.; Supervision, E.V., R.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the Canadian Institutes of Health Research (MOP-125962) and the FRQS Vision Health Research Network in partnership with the Antoine-Turmel Foundation to E.V. and R.C. R.O. received PhD Studentship Awards from the Graduate Program of Physiology, and the Faculty of Graduate Studies, Université de Montréal.

**Acknowledgments:** The authors greatly appreciate the assistance of Jacques Sénécal for the quantification, Micheline Gloin for the figures artwork, and thank the Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal for giving us access to the confocal microscope Zeiss-LSM800. Macular degeneration illustration (graphical abstract), iStock ID:963177108.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Wong, W.L.; Su, X.; Li, X.; Cheung, C.M.; Klein, R.; Cheng, C.Y.; Wong, T.Y. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* **2014**, *2*, e106–e116. [[CrossRef](#)]
- Schuman, S.G.; Koreishi, A.F.; Farsiu, S.; Jung, S.H.; Izatt, J.A.; Toth, C.A. Photoreceptor layer thinning over drusen in eyes with age-related macular degeneration imaged in vivo with spectral-domain optical coherence tomography. *Ophthalmology* **2009**, *116*, 488–496.e2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lambert, N.G.; ElShelmani, H.; Singh, M.K.; Mansergh, F.C.; Wride, M.A.; Padilla, M.; Keegan, D.; Hogg, R.E.; Ambati, B.K. Risk factors and biomarkers of age-related macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **2016**, *54*, 64–102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rashid, K.; Akhtar-Schaefer, I.; Langmann, T. Microglia in Retinal Degeneration. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1975. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Holz, F.G.; Strauss, E.C.; Schmitz-Valckenberg, S.; Van Lookeren Campagne, M. Geographic atrophy: Clinical features and potential therapeutic approaches. *Ophthalmology* **2014**, *121*, 1079–1091. [[CrossRef](#)]
- Ambati, J.; Atkinson, J.P.; Gelfand, B.D. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 438–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Penfold, P.L.; Madigan, M.C.; Gillies, M.C.; Provis, J.M. Immunological and aetiological aspects of macular degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **2001**, *20*, 385–414. [[CrossRef](#)]
- Ambati, J.; Ambati, B.K.; Yoo, S.H.; Ianchulev, S.; Adamis, A.P. Age-related macular degeneration: Etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies. *Surv. Ophthalmol.* **2003**, *48*, 257–293. [[CrossRef](#)]
- Ambati, J.; Fowler, B.J. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* **2012**, *75*, 26–39. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nebbioso, M.; Lambiase, A.; Cerini, A.; Limoli, P.G.; La Cava, M.; Greco, A. Therapeutic Approaches with Intravitreal Injections in Geographic Atrophy Secondary to Age-Related Macular Degeneration: Current Drugs and Potential Molecules. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1693. [[CrossRef](#)]
- Yang, S.; Zhao, J.; Sun, X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: A comprehensive review. *Drug Des. Dev. Ther.* **2016**, *10*, 1857–1867. [[CrossRef](#)]



12. Aiello, L.P.; Avery, R.L.; Arrigg, P.G.; Keyt, B.A.; Jampel, H.D.; Shah, S.T.; Pasquale, L.R.; Thieme, H.; Iwamoto, M.A.; Park, J.E.; et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *331*, 1480–1487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Frank, R.N.; Amin, R.H.; Elliott, D.; Puklin, J.E.; Abrams, G.W. Basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor are present in epiretinal and choroidal neovascular membranes. *Am. J. Ophthalmol.* **1996**, *122*, 393–403. [[CrossRef](#)]
14. Grossniklaus, H.E.; Ling, J.X.; Wallace, T.M.; Dithmar, S.; Lawson, D.H.; Cohen, C.; Elner, V.M.; Elner, S.G.; Sternberg, P., Jr. Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol. Vis.* **2002**, *8*, 119–126. [[PubMed](#)]
15. Hachana, S.; Bhat, M.; Senecal, J.; Huppe-Gourgues, F.; Couture, R.; Vaucher, E. Expression, distribution and function of kinin B1 receptor in the rat diabetic retina. *Br. J. Pharmacol.* **2018**, *175*, 968–983. [[CrossRef](#)]
16. Hachana, S.; Fontaine, O.; Sapieha, P.; Lesk, M.; Couture, R.; Vaucher, E. The Effects of Anti-VEGF and Kinin B1 Receptor Blockade on Retinal Inflammation in Laser-Induced Choroidal Neovascularization. *Br. J. Pharmacol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
17. Othman, R.; Vaucher, E.; Couture, R. Bradykinin Type 1 Receptor—Inducible Nitric Oxide Synthase: A New Axis Implicated in Diabetic Retinopathy. *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 300. [[CrossRef](#)]
18. Pouliot, M.; Talbot, S.; Senecal, 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*, e33864. [[CrossRef](#)]
19. Bhat, M.; Pouliot, M.; Couture, R.; Vaucher, E. The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy. *Prog. Drug Res.* **2014**, *69*, 111–143.
20. Sun, J.K.; Maturi, R.K.; Boyer, D.S.; Wells, J.A.; Gonzalez, V.H.; Tansley, R.; Hernandez, H.; Maetzel, A.; Feener, E.P.; Aiello, L.P. One-Time Intravitreal Injection of KVD001, a Plasma Kallikrein Inhibitor, in Patients with Central-Involved Diabetic Macular Edema and Reduced Vision: An Open-Label Phase 1B Study. *Ophthalmol. Retin.* **2019**, *3*, 1107–1109. [[CrossRef](#)]
21. Marceau, F.; Regoli, D. Bradykinin receptor ligands: Therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2004**, *3*, 845–852. [[CrossRef](#)]
22. Westermann, D.; Walther, T.; Savvatis, K.; Escher, F.; Sobirey, M.; Riad, A.; Bader, M.; Schultheiss, H.P.; Tschope, C. Gene deletion of the kinin receptor B1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **2009**, *58*, 1373–1381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Klein, J.; Gonzalez, J.; Duchene, J.; Esposito, L.; Pradere, J.P.; Neau, E.; Delage, C.; Calise, D.; Ahluwalia, A.; Carayon, P.; et al. Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J.* **2009**, *23*, 134–142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Couture, R.; Blaes, N.; Girolami, J.P. Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **2014**, *12*, 223–248. [[CrossRef](#)]
25. Terzuoli, E.; Morbidelli, L.; Nannelli, G.; Giachetti, A.; Donnini, S.; Ziche, M. Involvement of Bradykinin B2 Receptor in Pathological Vascularization in Oxygen-Induced Retinopathy in Mice and Rabbit Cornea. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Ikeda, Y.; Hayashi, I.; Kamoshita, E.; Yamazaki, A.; Endo, H.; Ishihara, K.; Yamashina, S.; Tsutsumi, Y.; Matsubara, H.; Majima, M. Host stromal bradykinin B2 receptor signaling facilitates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5178–5185. [[CrossRef](#)]
27. Thuringer, D.; Maulon, L.; Frelin, C. 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.* **2002**, *277*, 2028–2032. [[CrossRef](#)]
28. Tsujinaka, H.; Itaya-Hironaka, A.; Yamauchi, A.; Sakuramoto-Tsuchida, S.; Shobatake, R.; Makino, M.; Masuda, N.; Hirai, H.; Takasawa, S.; Ogata, N. Statins decrease vascular epithelial growth factor expression via down-regulation of receptor for advanced glycation end-products. *Heliyon* **2017**, *3*, e00401. [[CrossRef](#)]
29. Penn, J.S.; Madan, A.; Caldwell, R.B.; Bartoli, M.; Caldwell, R.W.; Hartnett, M.E. Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog. Retin. Eye Res.* **2008**, *27*, 331–371. [[CrossRef](#)]
30. Schiff, L.; Hadker, N.; Weiser, S.; Rausch, C. A literature review of the feasibility of glial fibrillary acidic protein as a biomarker for stroke and traumatic brain injury. *Mol. Diagn. Ther.* **2012**, *16*, 79–92. [[CrossRef](#)]
31. Langmann, T. Microglia activation in retinal degeneration. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *81*, 1345–1351. [[CrossRef](#)]

32. Souied, E.H.; Addou-Regnard, M.; Ohayon, A.; Semoun, O.; Querques, G.; Blanco-Garavito, R.; Bunod, R.; Jung, C.; Sikorav, A.; Miere, A. Spectral Domain Optical Coherence Tomography Analysis Of Fibrotic Lesions In Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Am. J. Ophthalmol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Huart, A.; Klein, J.; Gonzalez, J.; Buffin-Meyer, B.; Neau, E.; Delage, C.; Calise, D.; Ribes, D.; Schanstra, J.P.; Bascands, J.L. Kinin B1 receptor antagonism is equally efficient as angiotensin receptor 1 antagonism in reducing renal fibrosis in experimental obstructive nephropathy, but is not additive. *Front. Pharmacol.* **2015**, *6*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Das, A.; Puklin, J.E.; Frank, R.N.; Zhang, N.L. Ultrastructural immunocytochemistry of subretinal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Ophthalmology* **1992**, *99*, 1368–1376. [[CrossRef](#)]
35. Lopez, P.F.; Sippy, B.D.; Lambert, H.M.; Thach, A.B.; Hinton, D.R. Transdifferentiated retinal pigment epithelial cells are immunoreactive for vascular endothelial growth factor in surgically excised age-related macular degeneration-related choroidal neovascular membranes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **1996**, *37*, 855–868.
36. McLean, P.G.; Perretti, M.; Ahluwalia, A. Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: Regulation of expression and function. *Cardiovasc. Res.* **2000**, *48*, 194–210. [[CrossRef](#)]
37. Abdouh, M.; Khanjari, A.; Abdelaziz, N.; Ongali, B.; Couture, R.; Hassessian, H.M. Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 33–40. [[CrossRef](#)]
38. Hachana, S.; Pouliot, M.; Couture, R.; Vaucher, E. Diabetes-induced inflammation and vascular alterations in the Goto-Kakizaki rat retina. *Curr. Eye Res.* **2020**. [[CrossRef](#)]
39. Parenti, A.; Morbidelli, L.; Ledda, F.; Granger, H.J.; Ziche, M. The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J.* **2001**, *15*, 1487–1489. [[CrossRef](#)]
40. Ohlmann, A.; Scholz, M.; Koch, M.; Tamm, E.R. Epithelial-mesenchymal transition of the retinal pigment epithelium causes choriocapillaris atrophy. *Histochem. Cell Biol.* **2016**, *146*, 769–780. [[CrossRef](#)]
41. Datta, S.; Cano, M.; Ebrahimi, K.; Wang, L.; Handa, J.T. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog. Retin. Eye Res.* **2017**, *60*, 201–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Anderson, A.A.; Ushakov, D.S.; Ferenczi, M.A.; Mori, R.; Martin, P.; Saffell, J.L. Morphoregulation by acetylcholinesterase in fibroblasts and astrocytes. *J. Cell. Physiol.* **2008**, *215*, 82–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Reichenbach, A.; Bringmann, A. New functions of Muller cells. *Glia* **2013**, *61*, 651–678. [[CrossRef](#)]
44. Coorey, N.J.; Shen, W.; Chung, S.H.; Zhu, L.; Gillies, M.C. The role of glia in retinal vascular disease. *Clin. Exp. Optom.* **2012**, *95*, 266–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Dutra, R.C.; Bento, A.F.; Leite, D.F.; Manjavachi, M.N.; Marcon, R.; Bicca, M.A.; Pesquero, J.B.; Calixto, J.B. The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: Evidence for the involvement of astrocytes. *Neurobiol. Dis.* **2013**, *54*, 82–93. [[CrossRef](#)]
46. Lacoste, B.; Tong, X.K.; Lahjouji, K.; Couture, R.; Hamel, E. Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer’s disease mice. *J. Neuroinflamm.* **2013**, *10*, 57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Albert-Weissenberger, C.; Stetter, C.; Meuth, S.G.; Gobel, K.; Bader, M.; Siren, A.L.; Kleinschnitz, C. 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**, *32*, 1747–1756. [[CrossRef](#)]
48. Wang, M.; Wong, W.T. Microglia-Muller cell interactions in the retina. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *801*, 333–338. [[CrossRef](#)]
49. Karlstetter, M.; Nothdurfter, C.; Aslanidis, A.; Moeller, K.; Horn, F.; Scholz, R.; Neumann, H.; Weber, B.H.; Rupprecht, R.; Langmann, T. Translocator protein (18 kDa) (TSPO) is expressed in reactive retinal microglia and modulates microglial inflammation and phagocytosis. *J. Neuroinflamm.* **2014**, *11*, 3. [[CrossRef](#)]
50. Ifuku, M.; Farber, K.; Okuno, Y.; Yamakawa, Y.; Miyamoto, T.; Nolte, C.; Merrino, V.F.; Kita, S.; Iwamoto, T.; Komuro, I.; et al. Bradykinin-induced microglial migration mediated by B1-bradykinin receptors depends on Ca<sup>2+</sup> influx via reverse-mode activity of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *J. Neurosci.* **2007**, *27*, 13065–13073. [[CrossRef](#)]
51. Golestaneh, N.; Chu, Y.; Xiao, Y.Y.; Stoleru, G.L.; Theos, A.C. Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Terluk, M.R.; Kapphahn, R.J.; Soukup, L.M.; Gong, H.; Gallardo, C.; Montezuma, S.R.; Ferrington, D.A. Investigating mitochondria as a target for treating age-related macular degeneration. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 7304–7311. [[CrossRef](#)]
53. Totan, Y.; Yagci, R.; Bardak, Y.; Ozyurt, H.; Kendir, F.; Yilmaz, G.; Sahin, S.; Sahin Tig, U. Oxidative macromolecular damage in age-related macular degeneration. *Curr. Eye Res.* **2009**, *34*, 1089–1093. [[CrossRef](#)]
54. Donato, L.; Bramanti, P.; Scimone, C.; Rinaldi, C.; Giorgianni, F.; Beranova-Giorgianni, S.; Koirala, D.; D'Angelo, R.; Sidoti, A. miRNA expression profile of retinal pigment epithelial cells under oxidative stress conditions. *FEBS Open Bio* **2018**, *8*, 219–233. [[CrossRef](#)]
55. Donato, L.; D'Angelo, R.; Alibrandi, S.; Rinaldi, C.; Sidoti, A.; Scimone, C. Effects of A2E-Induced Oxidative Stress on Retinal Epithelial Cells: New Insights on Differential Gene Response and Retinal Dystrophies. *Antioxidants* **2020**, *9*, 307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Donato, L.; Scimone, C.; Alibrandi, S.; Rinaldi, C.; Sidoti, A.; D'Angelo, R. Transcriptome Analyses of lncRNAs in A2E-Stressed Retinal Epithelial Cells Unveil Advanced Links between Metabolic Impairments Related to Oxidative Stress and Retinitis Pigmentosa. *Antioxidants* **2020**, *9*, 318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Johansen, J.S.; Harris, A.K.; Rychly, D.J.; Ergul, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc. Diabetol.* **2005**, *4*, 5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Feilchenfeld, Z.; Yucel, Y.H.; Gupta, N. Oxidative injury to blood vessels and glia of the pre-laminar optic nerve head in human glaucoma. *Exp. Eye Res.* **2008**, *87*, 409–414. [[CrossRef](#)]
59. Tisdale, A.K.; Agron, E.; Sunshine, S.B.; Clemons, T.E.; Ferris, F.L., 3rd; Chew, E.Y.; Age-Related Eye Disease Study Research Group. Association of Dietary and Supplementary Calcium Intake With Age-Related Macular Degeneration: Age-Related Eye Disease Study Report 39. *JAMA Ophthalmol.* **2019**, *137*, 543–550. [[CrossRef](#)]
60. Ishikawa, K.; Kannan, R.; Hinton, D.R. Molecular mechanisms of subretinal fibrosis in age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* **2016**, *142*, 19–25. [[CrossRef](#)]
61. Green, W.R.; Enger, C. Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* **1993**, *100*, 1519–1535. [[CrossRef](#)]
62. McAllister, B.S.; Leeb-Lundberg, F.; Olson, M.S. Bradykinin inhibition of EGF- and PDGF-induced DNA synthesis in human fibroblasts. *Am. J. Physiol.* **1993**, *265*, C477–C484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Nagai, N.; Oike, Y.; Izumi-Nagai, K.; Koto, T.; Satofuka, S.; Shinoda, H.; Noda, K.; Ozawa, Y.; Inoue, M.; Tsubota, K.; et al. Suppression of choroidal neovascularization by inhibiting angiotensin-converting enzyme: Minimal role of bradykinin. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2007**, *48*, 2321–2326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Hu, D.E.; Fan, T.P. [Leu8]des-Arg9-bradykinin inhibits the angiogenic effect of bradykinin and interleukin-1 in rats. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, *109*, 14–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Smith, R.S., Jr.; Gao, L.; Chao, L.; Chao, J. Tissue kallikrein and kinin infusion promotes neovascularization in limb ischemia. *Biol. Chem.* **2008**, *389*, 725–730. [[CrossRef](#)]
66. Emanuelli, C.; Bonaria Salis, M.; Stacca, T.; Pintus, G.; Kirchmair, R.; Isner, J.M.; Pinna, A.; Gaspa, L.; Regoli, D.; Cayla, C.; et al. Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation* **2002**, *105*, 360–366. [[CrossRef](#)]
67. Talbot, S.; Lin, J.C.; Lahjouji, K.; Roy, J.P.; Senecal, J.; Morin, A.; Couture, R. Cigarette smoke-induced kinin B1 receptor promotes NADPH oxidase activity in cultured human alveolar epithelial cells. *Peptides* **2011**, *32*, 1447–1456. [[CrossRef](#)]
68. Moreno-Garcia, A.; Kun, A.; Calero, O.; Medina, M.; Calero, M. An Overview of the Role of Lipofuscin in Age-Related Neurodegeneration. *Front. Neurosci.* **2018**, *12*, 464. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).