

Université de Montréal

**Le rôle du récepteur B₁ des kinines dans le
développement de la rétinopathie diabétique**

par

Mylène Pouliot

Département de 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

Novembre, 2012

© Mylène Pouliot, 2012

Université de Montréal
Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Le rôle du récepteur B₁ des kinines dans le développement de la rétinopathie diabétique

Présentée par :
Mylène Pouliot

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Hélène Girouard, présidente-rapporteuse
Dr Elvire Vaucher, directrice de recherche
Dr Réjean Couture, co-directeur
Dr Przemyslaw Sapięha, membre du jury
Dr Fernand Gobeil Jr, examinateur externe
Dr Adriana Di Polo, représentante de la doyenne

Résumé

La rétinopathie diabétique est associée à plusieurs changements pathologiques du lit vasculaire rétinien, incluant l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne, l'inflammation vasculaire et la modification du débit sanguin. Récemment, il a été proposé que le récepteur B₁ des kinines, qui est surexprimé dans la rétine diabétique, puisse être impliqué dans le développement de ces altérations vasculaires. Ainsi, cette thèse présente les effets de traitements pharmacologiques avec des antagonistes du récepteur B₁ sur la perfusion rétinienne, la perméabilité vasculaire, l'infiltration des leucocytes (leucostase), l'expression de médiateurs de l'inflammation et la production d'anion superoxyde dans la rétine du rat rendu diabétique avec la streptozotocine (STZ). Les résultats obtenus montrent que l'application oculaire (10 µl d'une solution à 1%, deux fois par jour pendant 7 jours) de LF22-0542, un antagoniste hydrosoluble du récepteur B₁, bloque significativement l'hyperperméabilité vasculaire, la leucostase, le stress oxydatif et l'expression génique de médiateurs de l'inflammation (B₁R, iNOS, COX-2, VEGF-R2, IL-1β et HIF-1α) dans la rétine chez le rat à 2 semaines de diabète. L'administration orale (3 mg/kg) d'un antagoniste non-peptidique et sélectif pour le récepteur B₁, le SSR240612, entraîne une diminution du débit sanguin rétinien 4 jours après l'induction du diabète mais n'a aucun effet sur la réduction de la perfusion rétinienne à 6 semaines. Le récepteur B₁ joue donc un rôle protecteur au tout début du diabète en assurant le maintien d'un débit sanguin normal dans la rétine; un effet qui n'est toutefois pas maintenu pendant la progression du diabète. Ces données présentent ainsi la dualité du récepteur B₁ avec des effets à la fois protecteurs et délétères. Elles suggèrent aussi un rôle important pour le récepteur B₁ dans l'inflammation rétinienne et le développement des altérations vasculaires. Le récepteur B₁ pourrait donc représenter une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de la rétinopathie diabétique.

Mots-clés : Débit sanguin rétinien, diabète, inflammation, kinines, leucostase, perméabilité vasculaire, récepteur B₁, rétine, rétinopathie diabétique, stress oxydatif.

Abstract

Diabetic retinopathy is associated with retinal vascular changes, including blood retinal barrier breakdown, vascular inflammation and blood flow alterations. It has been proposed that kinin B₁ receptor, which is upregulated in the diabetic retina, could be involved in the development of these pathological features of diabetic retinopathy. In a rat model of diabetes induced by Streptozotocin (STZ), the effects of kinin B₁ receptor antagonists on retinal perfusion, vascular permeability, leukostasis, gene expression of inflammatory mediators and production of superoxide anion in the retina were evaluated. The results show that in 2-week diabetic rats, topical ocular application of the water soluble kinin B₁ receptor antagonist LF22-0542 (10 µl of 1% solution, twice per day) for a 7-day period reverses vascular hyperpermeability, leukostasis, oxidative stress and gene expression of inflammatory mediators (B₁R, iNOS, COX-2, VEGF-R2, IL-1β and HIF-1α) in the retina. Single oral administration (3 mg/kg) of SSR240612, a selective non-peptide B₁ receptor antagonist, induces a decrease of retinal blood flow in 4-day diabetic rats but has no effect on retinal blood flow reduction present at 6 weeks of diabetes. Therefore, B₁ receptor has a protective role in early diabetes by preserving a normal blood flow in the retina. These data suggest that B₁ receptor exerts protective and adverse effects in the diabetic retina. They also support a key role for B₁ receptor in retinal inflammation and the development of vascular alterations. B₁ receptor could therefore represent a promising therapeutic target for the treatment of diabetic retinopathy.

Keywords: B₁ receptor, diabetes, diabetic retinopathy, inflammation, kinins, leukostasis, oxidative stress, retina, retinal blood flow, vascular permeability.

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1 : Introduction.....	18
1.1 Anatomie de la rétine.....	19
1.1.1 Les cellules neuronales.....	22
1.1.2 Les cellules gliales.....	23
1.1.3 Les cellules vasculaires.....	24
1.2 La circulation rétinienne.....	25
1.3 La barrière hémato-rétinienne.....	28
1.4 La rétinopathie diabétique.....	29
1.4.1 Les altérations vasculaires.....	29
1.4.2 Les changements du débit sanguin rétinien.....	32
1.4.2.1 Débit sanguin rétinien chez les patients diabétiques.....	33
1.4.2.2 Débit sanguin rétinien chez les modèles animaux de diabète.....	34
1.4.3 La dysfonction neurogliale.....	36
1.4.4 Le stress oxydatif.....	37
1.4.5 Le rôle de l'inflammation.....	38
1.4.5.1 La production de médiateurs de l'inflammation.....	39
1.4.5.1.1 VEGF-A.....	39
1.4.5.1.2 TNF- α	40
1.4.5.1.3 Interleukine-1 β	41
1.4.5.1.4 iNOS.....	41

1.4.5.1.5 COX-2	42
1.4.5.2 L'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne	43
1.4.5.3 La migration des leucocytes dans la rétine	43
1.4.6 Les traitements	45
1.5 Le système kallibréine-kinine	47
1.5.1 La formation des kinines	48
1.5.2 La dégradation des kinines	49
1.5.3 Les récepteurs des kinines	50
1.5.3.1 Le récepteur B ₂	50
1.5.3.2 Le récepteur B ₁	50
1.5.3.3 Les mécanismes d'induction du récepteur B ₁	54
1.5.3.4 Les voies de signalisation des récepteurs des kinines	54
1.5.4 Le récepteur B ₁ et le diabète	56
1.5.5 Le récepteur B ₁ et la réponse inflammatoire	58
1.5.6 Le récepteur B ₁ et la régulation du tonus vasculaire	59
1.5.7 Le récepteur B ₁ et le stress oxydatif	60
1.5.8 Expression du système kallibréine-kinine dans l'œil	61
1.5.9 Les kinines et la rétinopathie diabétique	62
1.6 Hypothèses et objectifs	63
1.6.1 Premier article	63
1.6.2 Deuxième article	64
1.6.3 Troisième article	65
1.6.4 Étude complémentaire	65
Chapitre 2 : Premier article	66
2.1 Abstract	68
2.2 Introduction	69
2.3 Materials and methods	70
2.3.1 Animals	70
2.3.2 Surgical procedure	71

2.3.3 Induction of hypercapnia	71
2.3.4 Principles of the evaluation of retinal tissue perfusion using IMP	72
2.3.5 Procedure for the measurement of retinal and cerebral blood flow	72
2.3.6 Calculation of retinal and cerebral blood flow.....	74
2.3.7 Statistical analysis	75
2.4 Results	75
2.4.1 Quantitative and regional measurement of retinal blood flow in control animals	75
2.4.2 Physiological parameters	76
2.4.3 Effects of hypercapnia on retinal and cerebral blood flow	76
2.5 Discussion	77
2.5.1 Quantitative and regional measurement of retinal blood flow with [¹⁴ C]-IMP ..	77
2.5.2 Comparison of retinal blood flow with cerebral blood flow	79
2.6 Conclusion	79
2.7 Acknowledgements	80
2.8 References	81
2.9 Figures	86
Chapitre 3 : Deuxième article	94
3.1 Abstract	96
3.2 Introduction	97
3.3 Materials and methods	98
3.3.1 STZ-diabetic rats	98
3.3.2 Measurement of B ₁ R expression in the retina of control and diabetic rats by Western blot analysis	99
3.3.3 Measurement of retinal and cerebral blood flow in diabetic rats by quantitative autoradiography.....	100
3.3.4 Calculation of retinal and cerebral blood flow.....	103
3.3.5 Statistical analysis	103
3.4 Results	104

3.4.1 Physiological parameters	104
3.4.2 Expression and vasoactive function of B ₁ R in the retina of diabetic rats	104
3.4.3 Effect of B ₁ R antagonist SSR240612 on retinal blood flow measured by quantitative and regional autoradiography	105
3.4.4 Effect of B ₁ R antagonist SSR240612 on cerebral blood flow	105
3.5 Discussion	106
3.5.1 Retinal blood flow in diabetic rats	106
3.5.2 Effect of the selective B ₁ R antagonist SSR240612 on retinal blood flow	107
3.5.3 Effect of the selective B ₁ R antagonist SSR240612 on cerebral blood flow in diabetic rats	108
3.6 Conclusion	109
3.7 Acknowledgements	109
3.8 References	110
3.9 Figures	118
Chapitre 4 : Troisième article	123
4.1 Abstract	125
4.2 Introduction	126
4.3 Materials and methods	128
4.3.1 STZ-diabetic rats	128
4.3.2 Topical ocular treatment with B ₁ R antagonist LF22-0542	128
4.3.3 Measurement of retinal vascular permeability	129
4.3.4 Measurement of retinal leukostasis	129
4.3.5 Measurement of retinal inflammatory mediators by quantitative RT-PCR	130
4.3.6 Measurement of superoxide anion production in the retina	130
4.3.7 Statistical analysis	131
4.4 Results	132
4.4.1 Physiological parameters	132
4.4.2 Effect of LF22-0542 on retinal vascular permeability	132
4.4.3 Effect of LF22-0542 on retinal leukostasis	132

4.4.4 Effect of LF22-0542 on the expression of inflammatory mediators.....	133
4.4.5 Effect of LF22-0542 on oxidative stress.....	133
4.5 Discussion	133
4.5.1 Retinal vascular permeability.....	134
4.5.2 Leukostasis.....	135
4.5.3 Expression of B ₁ R and B ₂ R.....	136
4.5.4 Expression of inflammatory mediators	136
4.5.5 Oxidative stress	137
4.6 Conclusion	138
4.7 Acknowledgements.....	138
4.8 Competing Interests	139
4.9 References	140
4.10 Figures.....	147
Chapitre 5 : Étude complémentaire.....	152
5.1 Introduction.....	153
5.2 Méthodes.....	153
5.2.1 Collection des tissus.....	153
5.2.2 Mesure des médiateurs de l'inflammation par RT-PCR quantitatif.....	154
5.2.3 Analyse statistique	154
5.3 Résultats	154
5.3.1 Caractéristiques des donneurs.....	154
5.3.2 Expression du récepteur B ₁ , de TNF- α et d'IL-1 β	155
5.4 Figures.....	156
5.5 Tableaux.....	157
Chapitre 6 : Discussion	159
6.1 Sommaire des résultats.....	160
6.1.1 Expression du récepteur B ₁ dans la rétine.....	160
6.1.2 Le récepteur B ₁ , l'inflammation et le stress oxydatif dans la rétine	161
6.1.3 Le récepteur B ₁ et la modulation du débit sanguin rétinien	163

6.1.4 La dualité du récepteur B ₁	164
6.2 Avantages et limitations des techniques utilisées.....	165
6.2.1 Technique autoradiographique de mesure du débit sanguin rétinien.....	165
6.2.2 Le rat STZ-diabétique comme modèle de rétinopathie.....	167
6.2.3 Les antagonistes du récepteur B ₁ des kinines.....	168
6.3 Perspectives.....	170
6.4 Conclusion.....	172
Bibliographie.....	174
Annexe 1.....	i
Introduction.....	ii
Méthodes.....	ii
Modèle animal.....	ii
Mesure de la perméabilité vasculaire rétinienne.....	iii
Examination du lit vasculaire rétinien par histochimie à l'ADPase.....	iii
Marquage des triglycérides.....	iv
Marquage du collagène.....	v
Analyse statistique.....	v
Résultats.....	v
Discussion.....	viii
Conclusion.....	ix
Références.....	x
Annexe 2.....	xii
Liste des publications.....	xiii

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Structure primaire des kinines.....	48
Tableau 1.2 : Agonistes et antagonistes du récepteur B ₁ des kinines	52
Tableau 1.3 : Agonistes et antagonistes du récepteur B ₂ des kinines	53
Table 2.1 : Effect of hypercapnia on retinal and cerebral blood flow measured by autoradiography and sampling method.....	90
Table 2.2 : Regional measurement of retinal blood flow using the sampling method.....	92
Table 2.3 : Effect of hypercapnia on the physiological parameters.....	93
Table 3.1 : Effect of diabetes and B ₁ R antagonist SSR240612 on the physiological parameters	122
Table 4.1: Primers list	151
Table 4.2 : Effect of diabetes and LF22-0542 on glycemia and body weight	151
Tableau 5.1 : Informations médicales des donneurs	157
Tableau 5.2 : Liste des amorces	158
Tableau 1 (annexe) : Poids corporel et glycémie des rats témoins et GK.....	v

Liste des figures

Figure 1.1 : Anatomie de l'œil humain	19
Figure 1.2 : Représentation schématique des différentes couches cellulaires de la rétine...	21
Figure 1.3 : Représentation schématique du lit vasculaire rétinien	26
Figure 1.4 : La progression de la rétinopathie diabétique et les altérations vasculaires associées à chaque stade de la maladie	30
Figure 1.5 : Aspect clinique de la rétinopathie diabétique.....	32
Figure 1.6 : Processus de recrutement des leucocytes au site d'inflammation	44
Figure 1.7 : Le système kallibréine-kinine	47
Figure 1.8 : Voies de signalisation des récepteurs B ₁ et B ₂ impliquées dans la dilatation des vaisseaux sanguins	56
Figure 2.1 : Schematic representation of a whole-mount retina showing the regions of interest measured.....	86
Figure 2.2 : Representative whole-mount retina (A) and brain (B) autoradiograms displayed in pseudocolor from a control and two hypercapnic rats (5% CO ₂ and 8% CO ₂)	87
Figure 2.3 : Percent change (versus control) of the retinal blood flow during hypercapnia	88
Figure 2.4 : Percent change (versus control) of the cerebral blood flow during hypercapnia	89
Figure 3.1 : Protein expression of B ₁ R in the retina of diabetic rats measured by Western blot	118
Figure 3.2 : Representative whole-mount retina autoradiograms	119
Figure 3.3 : Effect of the treatment with the selective B ₁ R antagonist SSR240612 on retinal blood flow	120
Figure 3.4 : Effect of the treatment with the selective B ₁ R antagonist SSR240612 on retinal blood flow	121
Figure 4.1 : Chemical structure of LF22-0542.....	147
Figure 4.2 : Effect of LF22-0542 on retinal vascular permeability in STZ-diabetic rats ..	147
Figure 4.3 : Effect of LF22-0542 on retinal leukostasis in STZ-diabetic rats.	148

Figure 4.4 : Effect of LF22-0542 on the expression of retinal inflammatory mediators in STZ-diabetic rats.....	149
Figure 4.5 : Effect of LF22-0542 on retinal oxidative stress in STZ-diabetic rats.	150
Figure 5.1 : Expression du récepteur B ₁ , de TNF- α et d'IL-1 β dans les rétines de patients contrôles (CTL) et de patients diabétiques de type I (DMI) et de type II (DMII)	156
Figure 1 (annexe) : Perméabilité vasculaire rétinienne des rats témoins et GK	vi
Figure 2 (annexe) : Analyse de la densité et évaluation morphologique du lit vasculaire rétinien chez les rats témoins et GK.....	vi
Figure 3 (annexe) : Images représentatives du marquage des triglycérides dans la rétine avec l'Oil Red O chez un rat témoin et un rat GK.....	vii
Figure 4 (annexe) : Images représentatives du marquage du collagène dans la rétine avec le rouge de Sirius chez un rat témoin et un rat GK.....	vii

Liste des abréviations

[¹⁴ C]-IMP	N-isopropyl-p-[¹⁴ C]-iodoamphetamine
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
B ₁ R	récepteur B ₁ des kinines
B ₂ R	récepteur B ₂ des kinines
BK	bradykinine
COX	cyclo-oxygénase
COX-1	cyclo-oxygénase-1
COX-2	cyclo-oxygénase-2
COX-3	cyclo-oxygénase-3
DAG	diacylglycérol
des-Arg ⁹ -BK	des-Arg ⁹ -bradykinine
des-Arg ¹⁰ -KD	des-Arg ⁹ -kallidine
ECA	enzyme de conversion de l'angiotensine-1
eNOS	NO synthase endothéliale
EPR	épithélium pigmentaire rétinien
ERG	électrorétinogramme
ET-1	endothéline-1
GK	Goto-Kakizaki
GMPc	guanosine monophosphate cyclique
HIF-1	<i>hypoxia inducible factor-1</i>
IAP	iodoantipyrine
ICAM-1	molécule d'adhésion intercellulaire-1
IECA	inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
IL-1β	interleukine-1 beta
INF-γ	interféron-gamma
iNOS	NO synthase inductible
IP ₃	inositol-1-4-5-triphosphate

KBP	<i>kallikrein binding protein</i>
KBPM	kininogène de bas poids moléculaire
KD	kallidine
KHPM	kininogène de haut poids moléculaire
LDF	débitmétrie au laser par effet Doppler
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LPS	lipopolysaccharide
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MnSOD	manganèse superoxyde dismutase
NF- κ B	facteur de transcription nucléaire kappa B
NO	monoxyde d'azote
NOS	NO synthase
nNOS	NO synthase neuronale
OCT	tomographie en cohérence optique
pCO ₂	pression partielle de dioxyde de carbone
PGE ₂	prostaglandine E ₂
PGG ₂	prostaglandine G ₂
PGH ₂	prostaglandine H ₂
PGI ₂	prostacycline
PI3-K	phosphatidylinositol-3 kinase
PIGF	facteur de croissance placentaire
PLA ₂	phospholipase A ₂
PLC	phospholipase C
pO ₂	pression partielle d'oxygène
PKC	protéine kinase C
RNS	espèces réactives azotées
ROS	espèces réactives oxygénées
STZ	streptozotocine
TNF- α	facteur de nécrose tumorale alpha

TXA ₂	thromboxane A ₂
VEGF	facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGF-R1	VEGF récepteur 1
VEGF-R2	VEGF récepteur 2
XO	xanthine oxydase
ZO	zonula occludens
ZO-1	zonula occludens 1

*À grand-maman Cécile,
car ta maladie a donné tout son sens à ce travail*

Remerciements

Remplie d'expériences et d'émotions, c'est ici que je termine la route de mon doctorat. Ce chemin n'aurait pu être accompli sans l'aide et le soutien de plusieurs personnes qui me sont chères.

Je tiens sincèrement à remercier mes directeurs de recherche qui m'ont ouvert les portes de leur laboratoire et qui m'ont encadré tout au long de mes études. Je remercie chaleureusement Elvire Vaucher pour la confiance qu'elle m'a accordée. Merci pour ton écoute, ta souplesse et ton ouverture d'esprit. J'exprime aussi une profonde reconnaissance pour Réjean Couture pour sa grande disponibilité et ses conseils qui m'ont guidé tout au long de mes projets de recherche. Merci d'avoir partagé avec moi votre expérience, votre savoir et vos idées.

Je salue mes collègues de l'école d'optométrie et du département de physiologie sans qui l'atmosphère de travail n'aurait pas été aussi agréable et motivante. Ce fut un réel plaisir de travailler au sein d'une équipe où l'entraide faisait partie du quotidien. Je remercie Marianne Groleau, Simon Héту et Olivier Fontaine pour votre bonne humeur et l'échange de discussions intéressantes; Jun Il Kang pour tes blagues et tes taquineries qui mettaient un peu de piquant dans mes journées; Zi Wei Zhang pour ta rigueur et ta détermination exemplaire; Tamara Boutin pour l'énergie que tu as mis pour m'aider à compléter mes derniers projets; Sébastien Talbot, Karim Lahjouji et Jacques Sénécal pour vos connaissances techniques et scientifiques et votre coup de main dans la réalisation des expériences; Denis Latendresse pour ton talent artistique, ta minutie et ton perfectionnisme dans la création des figures pour mes publications et Florence Dotigny pour tes conseils et tes réponses à toutes mes questions.

Je remercie également les membres de ma famille pour l'intérêt qu'ils ont toujours apporté à la réalisation de mes projets. Ma mère, Gisèle, pour sa compréhension et sa générosité. Tu as toujours su faire de mon environnement de vie un endroit agréable et propice à la réussite. Mon père, Benoît, pour son soutien moral et financier. Dès mon jeune

âge, tu as su me transmettre ton goût pour les sciences et c'est en grande partie grâce à toi que j'ai fait ce cheminement de carrière.

Je tiens aussi à remercier tout spécialement Martin, mon amoureux et compagnon de vie. Ta compréhension, ta patience, tes encouragements et ton support inconditionnel dans les moments difficiles m'ont permis de franchir les obstacles et de ne jamais abandonner. Tu es pour moi une source d'inspiration infinie qui me pousse à me surpasser et à donner le meilleur de moi-même.

Finalement, je remercie les organismes subventionnaires pour le financement de ce projet de recherche et l'octroi de bourses d'études : le Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ), le Réseau FRSQ de Recherche en Santé de la Vision, Foundation Fighting Blindness (FFB) ainsi que la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales de l'Université de Montréal.

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Anatomie de la rétine

La rétine est l'organe sensible de la vision. Elle tapisse environ 75% de la surface interne du globe oculaire de la papille jusqu'à l'*ora serrata* et elle est située entre l'humeur vitrée et la choroïde (Figure 1.1). On y retrouve 3 principaux types cellulaires : les cellules neuronales, les cellules gliales et les cellules vasculaires. Partie intégrante du système nerveux central, la rétine convertit la lumière en signal nerveux qui est conduit vers le cerveau pour produire la sensation visuelle. Chez l'homme, plus de 80% de l'information sensorielle qui est acheminée au cerveau provient de la rétine et environ le tiers du cerveau est dédié au traitement de l'information visuelle (Kaufman et Alm, 2003). Pour les scientifiques, la rétine est un organe très intéressant pour la recherche puisque ce tissu neuronal très organisé a beaucoup de similitudes avec le cerveau, mais surtout, puisque c'est le seul endroit du corps humain où les vaisseaux sanguins artériels peuvent être facilement visualisés. La rétine permet ainsi l'observation d'une partie du système nerveux et du système cardiovasculaire.

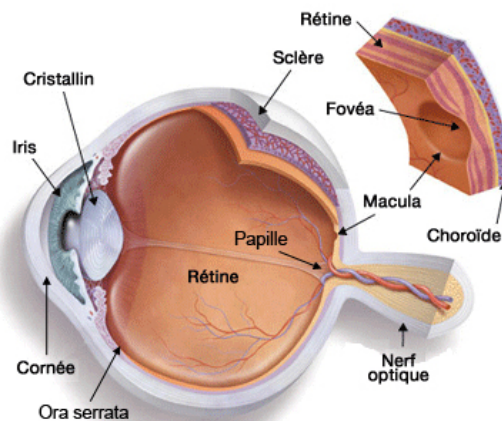


Figure 1.1 : Anatomie de l'œil humain

(Figure adaptée de www.cnib.ca)

En macroscopie, la rétine est une fine membrane transparente très vascularisée dont l'épaisseur n'est pas homogène; elle est plus épaisse près de la papille et plus mince à *l'ora serrata*. La face interne de la rétine est apposée à l'humeur vitrée avec lequel il y a adhérence au niveau de *l'ora serrata*. Son feuillet externe, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), est juxtaposé à la choroïde. D'un point de vue topographique, la rétine peut être divisée en 2 grandes zones : la rétine centrale et la rétine périphérique. La partie centrale de la rétine est la plus importante pour les fonctions visuelles et par conséquent, possède certaines modifications structurales. Chez l'homme, la rétine centrale a un diamètre de 5 à 6 mm et comprend la région maculaire et la *fovea*. La *macula* est une zone pratiquement avasculaire et très dense en pigments. Elle contient dans son centre la *fovea*, une petite dépression mesurant approximativement 1.5 mm de diamètre et qui est responsable de la vision des détails. Cette région spécialisée, uniquement peuplée de cônes, est l'endroit de la rétine qui permet la meilleure acuité visuelle (Yamada, 1969; Provis *et al.*, 2005). Contrairement à l'homme, certaines espèces animales comme le rat et la souris ne possèdent pas de *macula* (Huber *et al.*, 2010).

Les cellules de la rétine sont stratifiées en 8 couches (Figure 1.2) qui peuvent facilement être identifiées en histologie :

- 1- L'**épithélium pigmentaire rétinien** (EPR) qui assure le maintien et l'intégrité des photorécepteurs et qui comprend à sa base la membrane de Bruch
- 2- La **couche des photorécepteurs** qui comprend les segments internes et externes des photorécepteurs
- 3- La **couche nucléaire externe** formée par les corps cellulaires des photorécepteurs
- 4- La **couche plexiforme externe** formée par les synapses entre les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les cellules horizontales
- 5- La **couche nucléaire interne** qui contient les corps cellulaires des cellules horizontales, bipolaires et amacrines et les fibres des cellules de Müller

- 6- La **couche plexiforme interne** formée par les synapses entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires
- 7- La **couche des cellules ganglionnaires** qui contient également quelques cellules amacrines
- 8- La **couche des fibres nerveuses** qui contient les axones des cellules ganglionnaires

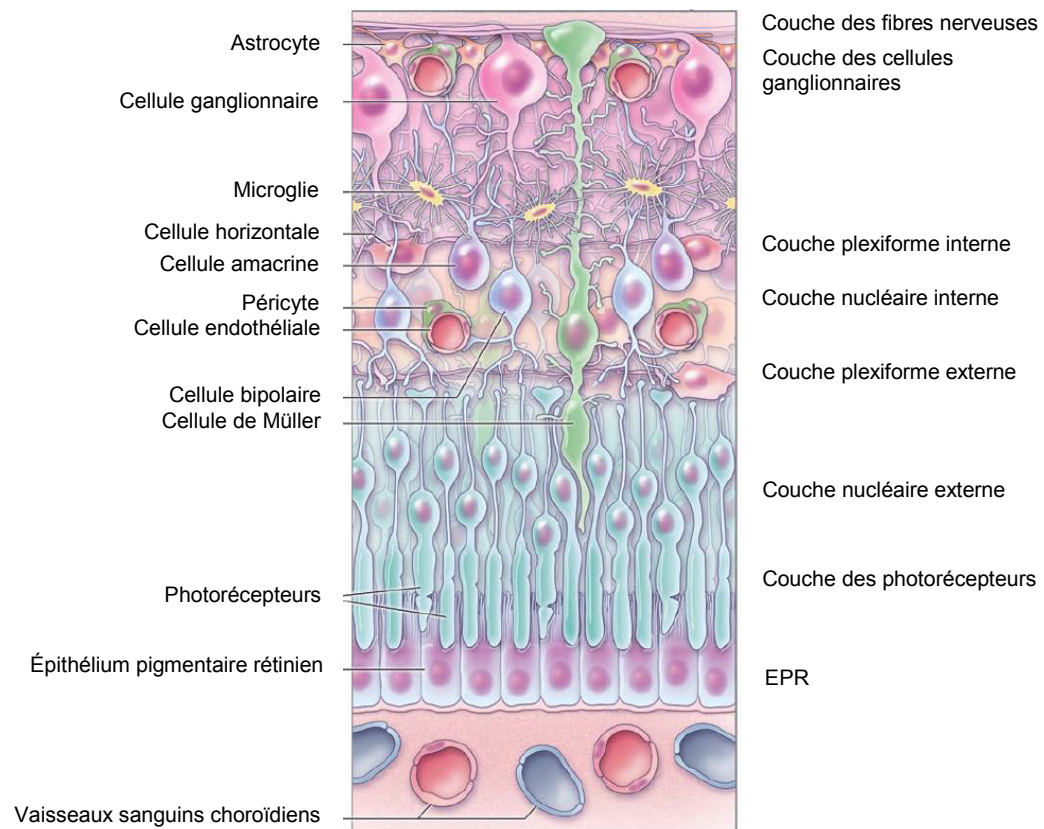


Figure 1.2 : Représentation schématique des différentes couches cellulaires de la rétine (Figure adaptée de Antonetti *et al.*, 2012)

1.1.1 Les cellules neuronales

Les cellules neuronales de la rétine convertissent l'énergie lumineuse en signal électrique afin d'acheminer l'information au cortex visuel. Cette fonction essentielle de la rétine est accomplie par l'interaction de 5 types de neurones : les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires (Figure 1.2).

Les photorécepteurs, incluant les cônes et les bâtonnets, sont des cellules hautement spécialisées qui captent la lumière au niveau de leur extrémité distale et transmettent l'influx nerveux par leur extrémité proximale. Chez l'homme, la rétine comprend environ 92 millions de bâtonnets responsables de la vision en conditions de faible luminosité et 5 millions de cônes responsables de la vision diurne et de la distinction des couleurs (Curcio *et al.*, 1990). La densité et l'organisation précise des photorécepteurs sous forme d'une mosaïque hexagonale permettent la détection individuelle des photons par des pigments visuels appelés rhodopsines et opsines synthétisés respectivement dans les bâtonnets et les cônes. Tous les bâtonnets contiennent la même rhodopsine sensible à une longueur d'onde de 500 nm tandis que les cônes contiennent 3 différentes opsines avec des pics d'absorption à 420 (bleu), 531 (vert) et 588 nm (rouge). Une plus grande concentration de cônes se retrouve au niveau de la *fovea* (au centre de la *macula*), une région au centre de la rétine où l'acuité visuelle est la meilleure.

Les cellules horizontales ont de longues dendrites qui s'étendent dans la couche plexiforme externe et forment des synapses avec plusieurs photorécepteurs et cellules bipolaires. Leur rôle est d'inhiber sélectivement certains signaux nerveux pour ainsi améliorer le contraste et la définition du stimulus visuel (Wässle *et al.*, 1989).

Les cellules bipolaires transmettent l'influx nerveux des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires ou les cellules amacrines. On retrouve différents types de cellules bipolaires classifiés selon leurs caractéristiques anatomiques qui varient en fonction de leur contact avec les cônes ou les bâtonnets. En plus des connections directes avec les

photorécepteurs, les cellules bipolaires reçoivent des afférences des cellules horizontales (Mariani, 1984).

Les cellules amacrines sont majoritairement situées dans la partie proximale de la couche nucléaire interne mais certaines se retrouvent également dans la couche des cellules ganglionnaires. Leurs terminaisons synaptiques sont situées dans la couche plexiforme interne et interagissent avec les cellules bipolaires et ganglionnaires offrant ainsi une voie alternative indirecte pour la transmission du signal nerveux, ce qui permettrait d'augmenter la sensibilité et le contraste visuel (Kolb, 1997).

Les cellules ganglionnaires sont les cellules qui collectent l'information visuelle de la rétine et l'acheminent jusqu'au cerveau. Leurs dendrites forment des synapses avec les cellules bipolaires et amacrines dans la couche plexiforme interne. Les axones des cellules ganglionnaires de toutes les régions de la rétine convergent vers le disque optique pour former le nerf optique et se terminent dans le corps genouillé latéral. Les fibres nerveuses dans la rétine sont normalement non myélinisées mais les axones des cellules ganglionnaires sont myélinisés à partir de la *lamina cribosa* où le nerf optique sort à l'extérieur du globe oculaire (Kolb, 2001).

1.1.2 Les cellules gliales

Les cellules gliales, incluant les cellules de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales, assurent un support structural et trophique aux neurones de la rétine, régulent l'environnement extracellulaire et protègent la rétine des pathogènes. Les plus importantes sont les cellules de Müller puisqu'elles se retrouvent dans toute l'épaisseur de la rétine, avec leurs corps cellulaires dans la couche nucléaire interne et leurs projections dans les couches nucléaires et plexiformes. Elles assurent la protection de l'ensemble des neurones de la rétine mais protègent également les vaisseaux sanguins avec l'aide des astrocytes. Les cellules de Müller sont en charge de l'élimination des déchets métaboliques de la rétine, régule l'environnement neuronal et sont capables de moduler l'excitabilité des neurones en

contrôlant la disponibilité des neurotransmetteurs (Newman et Reichenbach, 1996; Newman, 2004).

Les astrocytes se retrouvent principalement dans la couche des cellules ganglionnaires et la couche plexiforme interne. Ces cellules gliales sont en contact avec les cellules ganglionnaires, entourent les capillaires et contribuent au maintien de la barrière hémato-rétinienne (Schnitzer, 1987; Gardner *et al.*, 1997).

En moins grand nombre mais tout aussi importantes, les cellules microgliales se retrouvent dans la couche des fibres neuronales. Ces cellules dérivées des monocytes sont impliquées dans la réponse immunitaire de la rétine. En conditions pathologiques, ces cellules phagocytaires peuvent donc être présentes partout dans la rétine, où elles produisent des cytokines pro-inflammatoires mais également des substances qui assurent la survie des cellules vasculaires et des neurones (Chen *et al.*, 2002).

1.1.3 Les cellules vasculaires

Les vaisseaux sanguins procurent les nutriments (glucose, acides gras, acides aminés) à la rétine, assurent l'échange des gaz respiratoires et permettent l'élimination des déchets métaboliques de façon à maintenir l'homéostasie rétinienne. Ce rôle fondamental est assuré par un réseau de microvaisseaux dont le diamètre varie entre 15 à 130 μm selon la localisation dans la rétine (Kaufman et Alm, 2003). Les capillaires sont formés d'une couche de cellules endothéliales qui repose sur une membrane basale entourée de péricytes (Provis, 2001). La membrane basale, majoritairement composée de tissus conjonctifs tels que du collagène, de la laminine et des protéoglycans, apporte un support structural aux cellules endothéliales et aux péricytes, mais permet également d'ancrer les vaisseaux sanguins dans les tissus adjacents (Das *et al.*, 1990). Les péricytes sont distribués de façon uniforme le long des vaisseaux sanguins. Tout comme la membrane basale, les péricytes procurent un support structural mais aide aussi à la contraction et à la régulation des cellules endothéliales (Antonelli-Orlidge *et al.*, 1989). Leur contractilité contribue à la régulation du tonus vasculaire et par conséquent, à la modulation du débit sanguin

rétinien. Les cellules endothéliales sont essentielles pour la régulation du tonus vasculaire et l'apport de nutriments à la rétine. Les jonctions entre les cellules endothéliales forment la barrière hémato-rétinienne interne qui contrôle le passage des molécules entre la circulation sanguine et le tissu rétinien. En plus de la composante vasculaire, la barrière hémato-rétinienne est également formée par une barrière épithéliale, l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR), qui est localisée dans la partie postérieure de l'œil et qui assure le transfert des nutriments de la circulation choroïdienne vers la couche des photorécepteurs tout en limitant la diffusion des macromolécules.

1.2 La circulation rétinienne

La circulation artérielle de l'œil provient de l'artère ophtalmique; une branche de la carotide interne. L'artère ophtalmique longe le nerf optique, forme les artères ciliaires postérieures (qui irriguent l'iris, le corps ciliaire et la choroïde) et l'artère rétinienne centrale qui entre dans le nerf optique tout près du globe oculaire et rejoint la rétine au niveau du disque optique. L'artère rétinienne se divise en 4 branches (parfois 5 à 7) qui irriguent chacun des 4 quadrants de la rétine. Ces vaisseaux sanguins situés au niveau de la couche des cellules ganglionnaires se subdivisent en un large réseau d'artérioles et de capillaires qui s'étendent vers l'*ora serrata*. Les veines de la rétine suivent un patron similaire aux artères. Elles sont généralement situées parallèles aux artères et se divisent en plusieurs branches qui croisent les artérioles. Les veines rejoignent la veine rétinienne centrale qui sort du globe oculaire en longeant l'artère rétinienne centrale (Janes et Bounds, 1955).

La rétine externe, où sont situés les photorécepteurs, est dépourvue de vaisseaux sanguins. Cette partie de la rétine reçoit les nutriments de la circulation choroïdienne par diffusion. La rétine interne est irriguée par 3 couches de microvaisseaux : la couche superficielle située au niveau des cellules ganglionnaires, la couche intermédiaire située au niveau de la couche plexiforme interne et la couche profonde située au niveau de la couche plexiforme externe (Figure 1.3) (Pacques *et al.*, 2003; Cuthbertson *et al.*, 1986). Les

artérioles prédominent dans la couche superficielle tandis que la couche profonde contient en plus grande partie des veinules. La couche intermédiaire est constituée de vaisseaux transverses orientés de façon perpendiculaire aux vaisseaux des couches superficielle et profonde. La majorité des microvaisseaux (environ 70%) dirige le flot artériel de la couche superficielle vers la couche profonde. De façon symétrique, le drainage veineux origine de la couche profonde et rejoint les veines dans la couche superficielle via les veinules transverses (Paques *et al.*, 2003). L'arrangement des microvaisseaux dans la rétine interne permettrait ainsi de modifier la distribution du flot dans la rétine en réponse à des changements de pression de perfusion ou à une augmentation de la demande métabolique (Ben-Nun *et al.*, 2000).

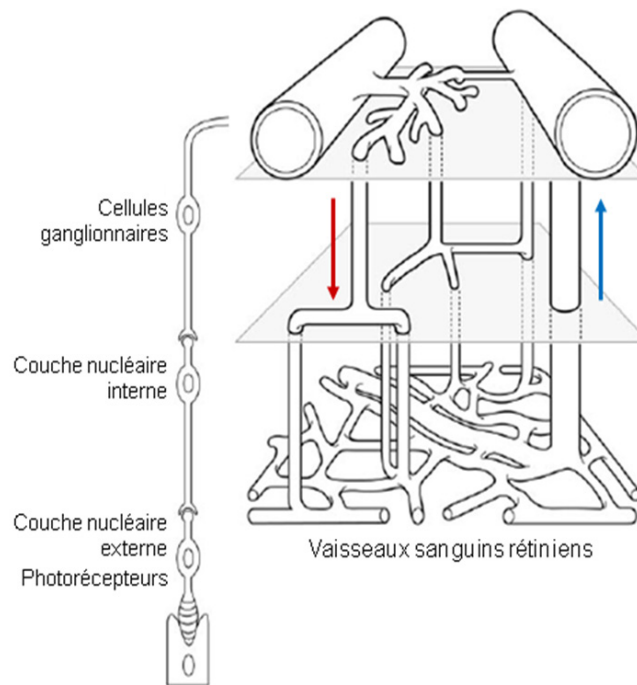


Figure 1.3 : Représentation schématique du lit vasculaire rétinien

(Figure adaptée de Paques *et al.*, 2003)

Deux systèmes vasculaires distincts apportent l'oxygène et les nutriments essentiels à la rétine: la circulation rétinienne et la circulation choroïdienne. Ces deux réseaux de vaisseaux sanguins possèdent des caractéristiques physiques et fonctionnelles bien distinctes (Dalaey *et al.*, 2000). La circulation rétinienne est caractérisée par un faible débit sanguin et un niveau élevé d'extraction de l'oxygène (la différence artère-veine pour la pO_2 est d'environ 40%) (Alm et Bill, 1973; Tornquist *et al.*, 1979). À l'opposé, la circulation choroïdienne a un débit sanguin très élevé mais possède une faible capacité d'extraction de l'oxygène (la différence artère-veine pour la pO_2 est d'environ 3%) (Alm et Bill, 1970; Tornquist *et al.*, 1979). La circulation choroïdienne est contrôlée principalement par une innervation sympathique et possède des capillaires fenestrés. La circulation rétinienne, quant à elle, n'a pas d'innervation autonome. Ainsi, le tonus artériel de la rétine est uniquement influencé par des facteurs locaux tels les variations de la pression de perfusion, de la pO_2 , de la pCO_2 et du pH. Des molécules dérivées des cellules endothéliales ou neuronales comme le monoxyde d'azote (NO), les prostaglandines, l'adénosine et l'endothéline ou encore des hormones circulantes telles l'angiotensine et les catécholamines peuvent aussi agir en tant que modulateurs du débit sanguin rétinien. Une autre caractéristique particulière à la circulation rétinienne est la capacité d'autorégulation qui assure un débit sanguin constant malgré les changements de pression de perfusion (Robinson *et al.*, 1986; Dumskyj *et al.*, 1996). Cette autorégulation est assurée par des mécanismes myogéniques ou métaboliques (Delaey *et al.*, 2000). Par exemple, l'augmentation de la pression de perfusion et l'augmentation de la pression transmurale provoquent une contraction myogénique des artères rétiniennes; la diminution de la pression de perfusion mène à l'accumulation de métabolites qui entraîne une vasodilatation. L'autorégulation peut être également décrite comme l'adaptation du débit sanguin à la demande métabolique des cellules de la rétine. Par exemple, lors d'une stimulation lumineuse stroboscopique, l'augmentation du métabolisme des cellules neuronales est couplée à une augmentation de la perfusion de la rétine et du nerf optique (Kondo *et al.*, 1997).

La circulation rétinienne ressemble à la circulation cérébrale : elle consiste en un réseau de microvaisseaux et possède une barrière limitant l'entrée des molécules dans le tissu neuronal. Deux principales structures physiologiques protègent la rétine. L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) forme la barrière externe et assure le transfert des nutriments vers la rétine mais empêche la diffusion des protéines plasmatiques. La barrière rétinienne interne, ou barrière hémato-rétinienne, est formée par les cellules endothéliales et permet la diffusion sélective des substances liposolubles.

1.3 La barrière hémato-rétinienne

Dans la rétine, deux structures moléculaires forment la barrière hémato-rétinienne : les jonctions serrées et les jonctions adhérentes (Crane *et al.*, 2008). Ces jonctions sont formées de complexes de glycoprotéines transmembranaires qui créent une connexion entre deux cellules endothéliales adjacentes et de protéines organisationnelles qui sont reliées au cytosquelette de la cellule. Les deux principales composantes des jonctions serrées sont les claudines et les occludines, reliées au cytosquelette d'actine via des protéines appelées *zonula occludens* (ZO) (Erickson *et al.*, 2007). Les jonctions adhérentes, quant à elles, sont formées par les cadhérines qui interagissent avec les caténines pour se lier au cytosquelette de la cellule (Davidson *et al.*, 2000). Ces deux types de jonctions restreignent le transport d'ions et de solutés aux surfaces apicales et basales et bloquent le passage paracellulaire des macromolécules et des fluides. Plusieurs études suggèrent que des changements dans la localisation, la phosphorylation ou l'expression de ces molécules pourraient contribuer à l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Antonetti *et al.*, 2008).

La barrière endothéliale est également supportée par des cellules périvasculaires comme les cellules musculaires lisses, les péricytes et les macrophages. Le contact des vaisseaux sanguins avec les astrocytes est essentiel à la formation des jonctions serrées et au maintien de l'intégrité structurale. L'interaction des cellules endothéliales avec la membrane basale, les cellules microgliales et les fluides extracellulaires sont également requis pour le fonctionnement adéquat de la barrière hémato-rétinienne (Crane *et al.*, 2008).

Les macrophages présents dans la rétine contribuent aussi au maintien de la barrière hémato-rétinienne en assurant l'immunité du tissu par l'élimination des pathogènes (Mendes-Jorge *et al.*, 2009). En condition pathologique, l'activation des microglies, la sécrétion de cytokines et l'expression de facteurs de croissance par ces cellules environnantes pourraient avoir un rôle important dans l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne (Antonetti *et al.*, 2008).

1.4 La rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique est l'une des plus fréquentes complications du diabète de type I et de type II. Environ 80% des patients qui vivent avec le diabète depuis 15 ans présentent des signes cliniques de rétinopathie et plus de 10% d'entre eux sont affectés par une perte de vision (Klein *et al.*, 1984; Frank., 2004; Moss *et al.*, 1998). L'organisation mondiale de la santé estime qu'à travers le monde, la rétinopathie diabétique compte pour 4.8% des cas de cécité légale, faisant de cette maladie une cause majeure de déficience visuelle dans la population adulte (Resnikoff *et al.*, 2004).

1.4.1 Les altérations vasculaires

La perte de vision est la conséquence d'altérations lentes et progressives des microvaisseaux de la rétine entraînant l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne, la prolifération pathologique des vaisseaux sanguins et la formation de tissus fibreux dans la cavité vitréenne menant au détachement de la rétine (Wilkinson-Berka *et al.*, 2006). Basée sur la progression des altérations vasculaires, la rétinopathie diabétique peut être subdivisée en 3 stades : non-proliférative, pré-proliférative et proliférative (Klein *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 2004). Les altérations vasculaires caractéristiques de chacun de ces stades sont présentées à la Figure 1.4.

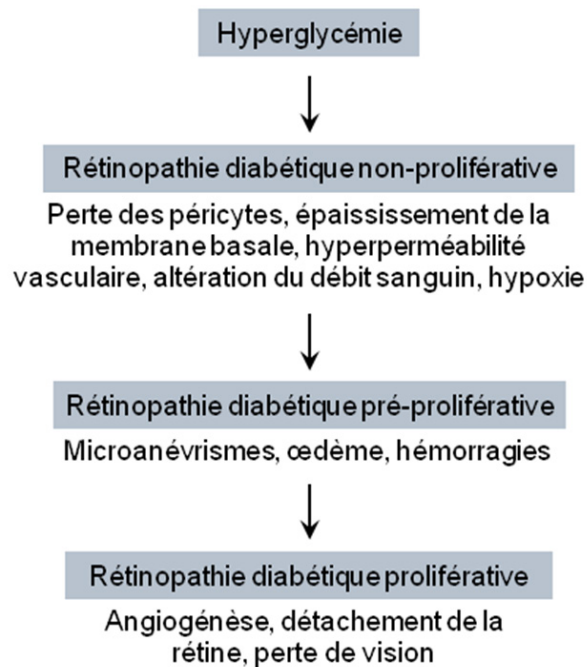


Figure 1.4 : La progression de la rétinopathie diabétique et les altérations vasculaires associées à chaque stade de la maladie

(Figure adaptée de Wilkinson-Berka *et al.*, 2006)

Dans la rétinopathie non-proliférative, les premières lésions vasculaires à survenir dans la rétine sont l'épaississement de la membrane basale des capillaires et la diminution du nombre de péricytes. Dans certains microvaisseaux, les cellules endothéliales se détériorent et meurent par apoptose. Des microanévrismes se forment dans les vaisseaux sanguins, entraînant ainsi l'occlusion des capillaires et l'apparition de zones rétinienne non perfusées. L'hypoxie qui en résulte est accompagnée d'hémorragies intra-rétiniennes, de changement du débit sanguin et de l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne.

Au cours de la rétinopathie pré-proliférative, le nombre d'hémorragies se multiplie. La perméabilité vasculaire augmente, le sang et les fluides s'accumulent dans le tissu rétinien formant des dépôts exsudatifs. Lorsque l'œdème atteint la *macula*, la vision centrale peut être sévèrement réduite. Cette composante de la rétinopathie diabétique est

appelée l'œdème maculaire et affecte 25% des patients diabétiques (Antonetti *et al.*, 2012). L'incidence est d'environ 14% pour les patients avec le diabète de type II et de 11% pour les patients avec le diabète de type I sur une période de 10 ans (Klein *et al.*, 1995; Romero-Aroca *et al.*, 2011).

À l'examen ophtalmique, les vaisseaux rétiniens des patients avec une rétinopathie diabétique apparaissent dilatés, tortueux et irréguliers. Des anévrismes, des hémorragies intra-rétiniennes et des nodules cotonneux (*cotton-wool spots*) peuvent également être visibles sur la rétine à l'examen du fond d'œil (Frank, 2004). Cet examen est souvent effectué simultanément avec l'angiographie à la fluorescéine qui permet de diagnostiquer l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de visualiser la présence de microanévrismes plus tôt dans le développement de la maladie (Figure 1.5). Plus récemment, des techniques tomographiques ont été développées pour détecter les changements morphologiques de la rétine. La tomographie en cohérence optique (*optical coherence tomography*, OCT) produit une image en deux dimensions d'une section antéropostérieure de la rétine, facilite le diagnostic de l'œdème maculaire et permet de visualiser l'épaississement de la rétine (Figure 1.5).

Chez certains patients, la rétinopathie diabétique non-proliférative progresse au stade prolifératif où de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à la surface de la rétine. Ces nouveaux vaisseaux, souvent dépourvus de membrane basale, sont très fragiles et se brisent facilement laissant ainsi s'échapper du sang dans la rétine neurale et l'humeur vitrée, ce qui peut affecter grandement la transparence des milieux, donc la vision. L'angiogénèse rétinienne peut aussi s'accompagner de fibrose causant la formation de tissu fibreux contractile qui s'étend dans la cavité vitréenne. La contraction de ces fibres exerce une traction sur la rétine pouvant mener à son décollement et entraîner la cécité.

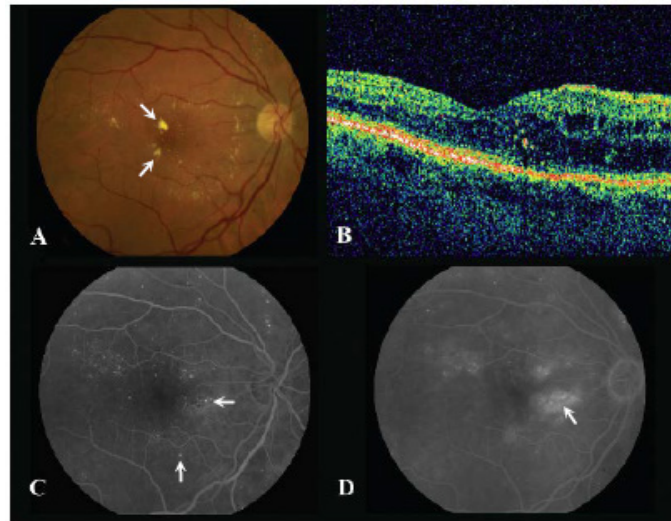


Figure 1.5 : Aspect clinique de la rétinopathie diabétique. Les images (A-D) présentent l'œil droit d'une femme de 55 ans atteinte de rétinopathie diabétique avec œdème maculaire. (A) Photographie en couleurs du fond d'œil montrant la présence de nodules cotonneux et de microanévrismes. (B) Tomographie en cohérence optique (OCT) montrant l'épaississement de la rétine et la présence d'œdème maculaire. (C, D) Angiographie à la fluorescéine montrant la présence de multiples microanévrismes et d'œdème. (Meyerle *et al.*, 2008).

1.4.2 Les changements du débit sanguin rétinien

En plus des anomalies du lit vasculaire rétinien, la rétinopathie diabétique est également associée à des changements pathologiques du débit sanguin dans la rétine. L'hypothèse que l'altération du débit sanguin pourrait être impliquée dans le développement de la maladie a été soulevée il y a plus de 30 ans. Depuis, plusieurs études ont cherché à comprendre les changements hémodynamiques de la rétine autant chez des patients diabétiques que dans des modèles animaux de diabète. Toutefois, la nature exacte des modifications du débit sanguin rétinien aux différents stades de la rétinopathie diabétique demeure toujours controversée. Ceci est probablement causé par la grande variété des techniques utilisées pour mesurer la perfusion rétinienne (Schmetterer *et al.*, 1999).

1.4.2.1 Débit sanguin rétinien chez les patients diabétiques

L'angiographie à la fluorescéine est l'une des premières techniques à avoir été employée pour observer les altérations du débit sanguin chez les patients diabétiques (Kohner *et al.*, 1975). Elle est désormais largement utilisée en clinique puisqu'elle permet simultanément d'évaluer l'intégrité du lit vasculaire rétinien. Cette méthode consiste à l'injection intraveineuse d'un colorant, la fluorescéine, et à l'enregistrement d'une série d'images de la rétine qui permet la visualisation du passage du colorant fluorescent dans la circulation rétinienne. Le temps de circulation moyen est défini par la différence entre les temps de circulation artériel et veineux et est inversement proportionnel à la vitesse. Avec cette technique angiographique, Bursell *et al.* (1996) ont montré une augmentation du temps de circulation rétinien moyen chez les patients diabétiques de type I sans aucune rétinopathie, suggérant ainsi qu'une diminution du débit sanguin rétinien pourrait être causée par l'hyperglycémie avant l'apparition des altérations vasculaires de la rétine. Le même groupe de chercheurs a aussi noté une augmentation du débit sanguin rétinien avec la progression de la rétinopathie diabétique (Clermont *et al.*, 1997). Une augmentation du temps de passage artério-veineux a également été rapportée chez les patients atteints de diabète de type I depuis 5 ans ou plus (Bertram *et al.*, 1991). À l'inverse, certaines études n'ont montré aucun changement ou ont noté une augmentation du débit sanguin rétinien dans les premiers stades de la rétinopathie diabétique et une diminution chez les patients avec une rétinopathie diabétique proliférative (Kohner *et al.*, 1975; Cunha *et al.*, 1978a; Cunha *et al.*, 1978b; Blair *et al.*, 1982, Yoshida *et al.*, 1983).

Une autre approche pour mesurer le débit sanguin rétinien est l'utilisation de la débitmétrie au laser par effet Doppler (LDF). Cette technique consiste à diriger une source lumineuse infrarouge monochromatique sur un vaisseau sanguin rétinien et d'analyser la lumière réfléchiée à l'aide d'un photodétecteur. Le faisceau lumineux est dévié par la paroi du vaisseau sanguin et le mouvement des érythrocytes. La fraction de la lumière émise qui est déviée est proportionnelle au volume sanguin et son déplacement selon la fréquence Doppler est proportionnel à la vitesse. Puisque ces deux relations sont linéaires, le débit

sanguin correspond au produit du volume sanguin et de la vitesse des globules rouges. La majorité des données disponibles à ce jour sur les variations du débit sanguin rétinien ont été obtenues avec la débitmétrie au laser par effet Doppler. Plusieurs études ont montré que les patients avec une rétinopathie diabétique présentent une augmentation du diamètre des vaisseaux sanguins artériels et veineux et que la vitesse est considérablement diminuée avec la progression de la maladie (Feke *et al.*, 1985; Grunwald *et al.*, 1986; Grunwald *et al.*, 1992; Patel *et al.*, 1992). Une diminution ou une augmentation de la perfusion rétinienne a aussi été rapportée chez les patients ne présentant aucune évidence de rétinopathie (Feke *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 2000; Grunwald *et al.*, 1996; Pemp *et al.*, 2010). Bien que les résultats diffèrent, l'ensemble des études semblent démontrer qu'une modification du débit sanguin rétinien se produit dans les premiers stades de la rétinopathie diabétique et même avant l'apparition de signes cliniques.

1.4.2.2 Débit sanguin rétinien chez les modèles animaux de diabète

Différents modèles animaux de diabète ont été développés afin d'étudier les mécanismes impliqués dans le développement de la rétinopathie diabétique et l'efficacité de traitements potentiels sur la normalisation des altérations hémodynamiques de la rétine. Les modèles expérimentaux permettent l'évaluation du débit sanguin oculaire avec les mêmes techniques utilisées chez l'humain, mais également via des méthodes plus invasives. Le débit sanguin rétinien est particulièrement difficile à étudier, notamment dû à la petite taille de la rétine dans les modèles animaux, mais aussi à cause de la localisation de ce tissu dans l'œil et à sa juxtaposition à la choroïde. Ceci explique entre autre pourquoi les différentes techniques de mesure du débit sanguin rétinien sont associées à plusieurs limitations qui empêchent une évaluation adéquate de tous les aspects de la microcirculation rétinienne. Les méthodes non-invasives, incluant la débitmétrie au laser par effet Doppler et l'angiographie à la fluorescéine, présentent une bonne résolution temporelle mais ont une résolution spatiale limitée, doivent être réalisées sur des animaux anesthésiés et permettent uniquement une évaluation qualitative du débit sanguin rétinien (Glazer *et al.*, 1988; Tsujikawa *et al.*, 2000, Yu *et al.*, 2005, Chauhan *et al.*, 2006, Mori *et*

al., 2007; Clermont *et al.*, 1994, Kunisaki *et al.*, 1998). Les méthodes invasives, quant à elles, permettent d'obtenir des valeurs quantitatives mais requièrent le sacrifice de l'animal et sont souvent associées à une sous-évaluation de la microcirculation (Chemtob *et al.*, 1991, Alm *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2007). Parmi les méthodes invasives, on retrouve l'utilisation de microsphères et de marqueurs radioactifs. La première technique consiste à injecter, dans le ventricule gauche du cœur, un bolus de suspension de microsphères radiomarquées. Ces microsphères sont immobilisées au niveau pré-capillaire et la mesure radiographique de la densité des microsphères dans la rétine permet une estimation du débit sanguin suite au sacrifice de l'animal. Avec des injections répétées de différentes microsphères, il est possible d'effectuer plusieurs mesures de débit sanguin sur un même animal. Toutefois, cette technique requiert l'implantation d'un cathéter cardiaque ce qui provoque un traumatisme à l'animal et entraîne des changements hémodynamiques. De plus, la résolution spatiale est assez faible ce qui rend l'autoradiographie impossible. La technique utilisant l'injection intraveineuse d'un traceur diffusible, comme l'iodoantipyrine (IAP), est basée sur l'application du principe de Fick dans lequel la quantité de traceur qui pénètre un tissu par unité de temps est égale au produit du débit sanguin perfusant ce tissu par la différence de concentration artério-veineuse du traceur (O'Brien *et al.*, 1997). Cette technique permet une cartographie quantitative du débit sanguin local. Cependant, la diffusion post-mortem du traceur nécessite une congélation immédiate des tissus, empêchant l'application de cette technique pour des rétines isolées.

Par l'utilisation de ces diverses techniques, plusieurs études ont évaluées les changements du débit sanguin rétinien dans des modèles animaux de diabète. Chez le rat STZ-diabétique, une augmentation du débit sanguin rétinien a été démontré avec la méthode utilisant les microsphères radioactives (Pugliese *et al.*, 1990; Sutera *et al.*, 1992; Tilton *et al.*, 1989). Toutefois, chez le chien diabétique induit par l'alloxane, le débit sanguin rétinien mesuré suite à l'injection de microsphères radioactives était diminué en comparaison aux chiens normaux (Small *et al.*, 1987). Une diminution du débit sanguin rétinien a aussi été observée par angiographie à la fluorescéine chez des rats STZ-diabétiques et des rats Goto-Kakizaki, un modèle de diabète de type II (Bursell *et al.*, 1992;

Clermont *et al.*, 1994; Clermont *et al.*, 1997; Takagi *et al.*, 1995; Takagi *et al.*, 1996; Higashi *et al.*, 1998; Miyamoto *et al.*, 1996).

1.4.3 La dysfonction neurogliale

L'altération des vaisseaux sanguins de la rétine est une composante centrale de la pathophysiologie de la rétinopathie diabétique. Toutefois, plusieurs évidences suggèrent qu'une dysfonction neurogliale accompagnerait également les changements de la microcirculation rétinienne. Chez certains patients diabétiques, des anomalies dans l'électrorétinogramme (ERG) ont été observés très tôt dans le développement de la maladie et parfois même avant l'apparition des altérations vasculaires à l'examen du fond d'oeil. L'ERG est utilisé pour évaluer la réponse électrophysiologique de la rétine à différents stimulus visuels. Les ondes de l'ERG représentent la séquence caractéristique de l'activation neuronale et reflètent la durée et l'amplitude de la transmission du signal électrique à travers la rétine. L'onde a, une déflexion négative de l'ERG, représente l'hyperpolarisation des photorécepteurs. La deuxième composante de l'ERG est une onde positive, l'onde b, qui origine de la dépolarisation des bâtonnets et des cellules de Müller. Une série de petites ondes appelées potentiels oscillatoires, contribuent à la partie ascendante de l'onde b et sont attribuées en partie à l'activité des cellules amacrines. Chez les patients diabétiques, la fonction de la rétine interne présente certaines anomalies observées par un délai et une diminution de l'amplitude de l'onde b et des potentiels oscillatoires (Bears *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2001; Tzekov *et al.*, 1999, Ghirlanda *et al.*, 1991). Similairement, dans un modèle de rat diabétique, une diminution de l'amplitude de l'onde b a été constatée après 2 à 4 semaines de diabète ainsi qu'une diminution de l'amplitude et une augmentation de la latence des potentiels oscillatoires dans les 12 premières semaines (Aizu *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2002; Hancock *et al.*, 2004; Sakai *et al.*, 1995). Ces anomalies électrophysiologiques contribuent certainement à la dysfonction visuelle dans la rétinopathie diabétique et seraient causées par la dégénérescence et l'apoptose de plusieurs types de neurones dans les couches nucléaires internes et externes de la rétine incluant les photorécepteurs (Aizu *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2003), les cellules

amacrines (Gastinger *et al.*, 2006), les cellules bipolaires (Seigel *et al.*, 2006) et les cellules ganglionnaires (Chihara *et al.*, 1993). Les cellules gliales de la rétine subissent également des changements pathologiques dans le diabète. Le support métabolique assuré par les cellules gliales est critique pour la fonction neuronale et certaines études ont démontré que l'activation des cellules de Müller et des astrocytes dans le diabète affecte le métabolisme du glutamate, entraîne une altération de la transmission synaptique et favorise la production de cytokines pro-inflammatoires (Lieth *et al.*, 2000).

1.4.4 Le stress oxydatif

Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production d'oxydants, incluant les espèces réactives oxygénées (ROS, *reactive oxygen species*) et les espèces réactives azotées (RNS, *reactive nitrogen species*), et les défenses anti-oxydantes de l'organisme. Parmi les espèces réactives oxygénées, on retrouve l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), les radicaux hydroxyl (OH^{\cdot}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les membres des espèces réactives azotées sont le NO, le peroxyde d'azote et leurs dérivés. La NAD(P)H oxydase et la xanthine oxydase (XO) sont les principales enzymes responsables de la production d'espèces réactives oxygénées, respectivement via la réduction de l' O_2 en superoxyde ou l'oxydation de l'hypoxanthine. De plus, le découplage de la NO synthase endothéliale (eNOS) peut être à l'origine de la production d'espèces réactives oxygénées. Lorsque la disponibilité de la L-Arginine ou du cofacteur tetrahydrobiopterin (BH_4) est limitée, les deux sous-unités de la eNOS fonctionnent indépendamment. La eNOS découplée produit alors une grande quantité d'anion superoxyde et du NO simultanément. L'anion superoxyde peut également être généré par des mécanismes non-enzymatiques, comme la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie. En conditions normales, l'enzyme manganèse superoxyde dismutase (MnSOD) réduit le superoxyde en peroxyde d'hydrogène qui est ensuite converti en eau par la glutathionne peroxydase ou la catalase. Toutefois, lorsque ces mécanismes antioxydants sont altérés, une augmentation de la production de radicaux libres dans les tissus peut endommager l'ADN, les protéines et les lipides, moduler la fonction cellulaire ou altérer l'expression génique.

Le stress oxydatif causé par l'hyperglycémie joue un rôle important dans plusieurs complications du diabète dont la rétinopathie diabétique (Rosen *et al.*, 2001; Kowluru *et al.*, 2007; Madsen-Bouterse et Kowluru, 2008). La principale cause de formation de radicaux libres induits par l'hyperglycémie est la surproduction d'anion superoxyde par la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie. L'augmentation du métabolisme du glucose favorise la production de NADH et FADH₂ via le cycle de l'acide citrique, et par conséquent augmente le flot d'électrons à travers les complexes de la chaîne d'électrons de la mitochondrie. Ceci cause une augmentation substantielle du potentiel membranaire qui altère la fonction de la chaîne de transport d'électrons et entraîne la formation de superoxyde. En plus de l'action de la mitochondrie, la surproduction d'anion superoxyde dans la rétine diabétique peut être causée par une augmentation de l'activité de la NAD(P)H oxydase. De récentes études ont montré que la surexpression de la NAD(P)H oxydase pourrait contribuer au développement des premiers signes de la rétinopathie diabétique tels l'augmentation du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne (Al-Shabrawey *et al.*, 2005; Al-Shabrawey *et al.*, 2008). Finalement, l'anion superoxyde dans la rétine peut être produit via l'action de la NO synthase (NOS). Lorsque la disponibilité de la L-Arginine est limitée, la NOS utilise l'oxygène moléculaire comme principal substrat, produisant ainsi de l'anion superoxyde et du NO. L'anion superoxyde peut interagir avec le NO pour former spontanément du peroxynitrite (ONOO⁻). La formation de peroxynitrite diminue ainsi la disponibilité du NO affectant la régulation du tonus vasculaire et favorisant la dysfonction endothéliale. L'ensemble de ces événements est amplifié par le fait que les mécanismes de défenses anti-oxydantes sont altérés dans le diabète. L'activité des enzymes superoxyde dismutase, catalase et glutathione peroxidase est diminuée dans la rétine de rats diabétiques (Kowluru et Chan, 2007).

1.4.5 Le rôle de l'inflammation

L'inflammation est une réponse non spécifique de l'organisme suite à une agression qui engendre une cascade d'événements biochimiques et la production de plusieurs

médiateurs moléculaires (Kern, 2007). La réponse inflammatoire peut être divisée en deux phases : une phase vasculaire qui comprend la vasodilatation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire et une phase cellulaire dans laquelle il y a recrutement et migration des leucocytes au siège de la lésion. L'inflammation a des effets bénéfiques sur une base aigüe puisqu'elle contribue à la guérison mais peut avoir des effets néfastes lorsqu'elle persiste de façon chronique. Les facteurs de transcription tels le facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ B) jouent un rôle critique dans la réponse chronique puisque leur activation perpétue les processus inflammatoires en augmentant l'expression de plusieurs cytokines incluant la cyclooxygénase-2 (COX-2), l'interleukine-1 beta (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α) (Kern, 2007). Plusieurs changements moléculaires et fonctionnels caractéristiques de la réponse inflammatoire ont été identifiés dans la rétine chez des patients diabétiques ou des modèles animaux de diabète, suggérant ainsi un rôle pour l'inflammation dans le développement et la progression de la rétinopathie diabétique (Kern, 2007).

1.4.5.1 La production de médiateurs de l'inflammation

1.4.5.1.1 VEGF-A

Le VEGF-A est un facteur de croissance et une molécule pro-inflammatoire qui joue un rôle important dans la rétinopathie diabétique puisqu'il est impliqué dans la néovascularisation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne. Quatre variantes du VEGF-A sont formées par épissage alternatif : VEGF-121, VEGF-165, VEGF-189 et VEGF 206 (Penn *et al.*, 2008). L'expression de VEGF-A est régulée principalement par l'hypoxie via l'HIF-1 (*hypoxia inducible factor-1*) (Aiello *et al.*, 1995, Ikeda *et al.*, 2006) mais peut aussi s'accumuler dans la rétine dû à l'hyperglycémie et au stress oxydatif (Sone *et al.*, 1997; Kuroki *et al.*, 1996). Le VEGF-A est produit dans la rétine par plusieurs types de cellules incluant les cellules ganglionnaires, les cellules de Müller et les péricytes (Famiglietti *et al.*, 2003). Il se lie à deux types de récepteurs tyrosine kinase, le VEGF récepteur-1 (VEGF-R1/Flt-1) et le VEGF-R2 (KDR) (De Vries *et al.*, 1992; Quinn *et al.*,

1993). Mise à part le VEGF-A, la famille du VEGF comprend aussi le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et le facteur de croissance placentaire (PlGF) (Penn *et al.*, 2008).

L'une des premières études à s'être penché sur le rôle du VEGF dans la rétine a démontré que l'injection intravitréenne répétée de VEGF chez le singe non-diabétique induit des changements caractéristiques des premiers stades de la rétinopathie incluant la tortuosité des vaisseaux sanguins et le développement de microanévrismes (Tolentino *et al.*, 1996). Depuis, de nombreuses études ont examiné les propriétés inflammatoires du VEGF dans la rétinopathie diabétique. Chez le rat diabétique, le VEGF est surexprimé quelques semaines après l'induction du diabète et cette augmentation est corrélée avec l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'expression de la molécule d'adhésion intercellulaire-1 (ICAM-1) dans la rétine (Qaum *et al.*, 2001, Jousseaume *et al.*, 2002). De plus, l'inhibition du VEGF-A via l'injection intravitréenne d'un anti-VEGF, diminue la leucostase et inhibe l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne chez l'animal diabétique (Ishida *et al.*, 2003, Miyamoto *et al.*, 2000). Les niveaux de VEGF sont également élevés dans l'humeur vitrée des patients avec une rétinopathie diabétique ou de l'œdème maculaire (Aiello *et al.*, 1994; Adamis *et al.*, 1994). Chez l'homme, l'administration intravitréenne d'anticorps anti-VEGF a montré une amélioration de l'acuité visuelle, une diminution de la perméabilité vasculaire ainsi qu'une inhibition de la néovascularisation (Nguyen *et al.*, 2006; Chun *et al.*, 2006; Avery *et al.*, 2006), positionnant ainsi les inhibiteurs du VEGF comme des traitements de choix pour la rétinopathie diabétique.

1.4.5.1.2 TNF- α

Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire qui est impliquée dans plusieurs désordres immunologiques (Taylor *et al.*, 2004). Les macrophages sont la principale source cellulaire de TNF- α mais d'autres cellules du système immunitaire comme les lymphocytes T, les neutrophiles et une variété d'autres cellules incluant les cellules endothéliales peuvent également synthétiser le TNF- α . La stimulation des récepteurs du TNF- α peut mener à une multitude de réponses cellulaires incluant le recrutement des leucocytes et des monocytes, l'induction de l'apoptose, la stimulation de l'expression de molécules

d'adhésion et la relâche de plusieurs cytokines et médiateurs de l'inflammation. L'implication du TNF- α dans les pathologies vasculaires associées à la rétinopathie diabétique a été examinée dans la rétine de rat diabétique (Joussen *et al.*, 2002). L'administration systémique d'un inhibiteur compétitif du TNF- α diminue significativement l'expression de ICAM-1, l'adhésion des leucocytes et l'hyperperméabilité vasculaire rétinienne, sans toutefois affecter les niveaux de VEGF dans la rétine (Joussen *et al.*, 2002).

1.4.5.1.3 Interleukine-1 β

L'interleukine-1 β (IL-1 β) est une cytokine produite principalement par les cellules du système immunitaire lors de la réponse inflammatoire et elle est responsable, tout comme le TNF- α , de l'expression de molécules d'adhésion sur l'endothélium et de la transmigration des leucocytes. L'expression de l'IL-1 β est augmentée dans la rétine de rats diabétiques (Vincent *et al.*, 2007; Kowluru *et al.*, 2004; Krady *et al.*, 2005) et certaines études suggèrent que cette cytokine pourrait contribuer à la dégénérescence des cellules endothéliales des capillaires rétiniens via l'activation de la caspase-1 (Kowluru *et al.*, 2004; Vincent *et al.*, 2007).

1.4.5.1.4 iNOS

Les NO synthases (NOS) sont une famille d'enzymes qui catalyse la formation de NO à partir de la L-Arginine. Le NO, impliqué dans plusieurs voies de signalisation cellulaire, exerce un rôle vital essentiel dans plusieurs processus biologiques incluant le contrôle du tonus vasculaire, l'angiogénèse et le développement du système nerveux. La production de NO est contrôlée par trois isoenzymes, la NOS neuronale (nNOS), la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS inductible (iNOS). La iNOS est l'isoforme principalement impliqué dans les réponses immunitaires et inflammatoires, et permet la production d'une grande quantité de NO comme mécanisme de défense. Dans la rétine diabétique, plusieurs études ont rapporté une augmentation des niveaux des produits dérivés du NO (nitrotyrosine, nitrite, nitrate) ainsi qu'une surexpression de la iNOS (Abu El-Asrar *et al.*,

2001; Du *et al.*, 2002). Le rôle de la iNOS dans le développement de la rétinopathie diabétique a aussi été étudié chez des souris génétiquement modifiées. Chez les souris diabétiques et déficientes en iNOS, la leucostase, la dégénérescence des capillaires et la production d'anion superoxyde sont diminuées en comparaison aux souris diabétiques sauvages qui développent ces altérations structurales et fonctionnelles du lit vasculaire rétinien (Zheng *et al.*, 2007).

1.4.5.1.5 COX-2

Les cyclooxygénases (COX) sont des enzymes responsables de la formation des prostanoïdes à partir de l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est présent dans les membranes cellulaires et il est libéré par l'hydrolyse des phospholipides sous l'action de la phospholipase A₂ (PLA₂). Il est transformé en prostaglandine G₂ (PGG₂) par les COX. La PGG₂ est ensuite convertie en prostaglandine H₂ (PGH₂), le précurseur de la prostaglandine E₂ (PGE₂), de la prostacycline (PGI₂) et du tromboxane A₂ (TXA₂). COX-1, COX-2 et COX-3 sont les trois isoformes de l'enzyme cyclooxygénase. COX-3 est transcrite par le même gène que COX-1 mais conserve l'intron-1 dans son ARNm; elle est principalement exprimée dans le cortex cérébral (Chandrasekharan *et al.*, 2002). COX-1 et COX-2 possèdent sensiblement les mêmes fonctions, bien que la régulation de leur expression soit différente. COX-1 est exprimée de façon constitutive et se retrouve dans la plupart des cellules. À l'inverse, COX-2 est presque inexistante dans les tissus sains et elle est fortement induite dans les macrophages et autres cellules au site d'inflammation. Toutefois, l'expression de COX-2 est constitutive dans certains tissus comme le cerveau, le rein et la moelle épinière (Harris *et al.*, 2001; Yermakova *et al.*, 2000).

Plusieurs études ont montré une augmentation de l'expression de COX-2 ainsi que la production de prostaglandines dans la rétine d'animaux diabétiques (Du *et al.*, 2004; Ayalasonmayajula *et al.*, 2003; Naveh-Floman *et al.*, 1984; Johnson *et al.*, 1999). La production de PGE₂ dans la rétine est significativement diminuée par l'administration de Celecoxib, un inhibiteur sélectif de COX-2, mais n'est pas altérée par un inhibiteur de COX-1 (SC560) suggérant que COX-2 est le principal isoforme impliqué dans la

production de prostaglandines dans la rétine diabétique (Ayalasomayajula *et al.*, 2004). De plus, l'inhibition de COX-2 diminue l'hyperperméabilité vasculaire et la leucostase dans la rétine de rat diabétique, ainsi que la mort des cellules endothéliales en culture en présence d'une haute concentration de glucose (Joussen *et al.*, 2002; Ayalasomayajula *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2004).

1.4.5.2 L'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne

Chez les patients diabétiques, il est connu que l'augmentation de la perméabilité vasculaire est une composante importante du développement de l'œdème maculaire et contribue considérablement à la diminution de l'acuité visuelle. L'ouverture de la barrière hémato-rétinienne est un évènement qui se produit très tôt dans le développement de la rétinopathie diabétique et plusieurs données suggèrent que ce phénomène serait attribué à l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires et de facteurs de croissance dans la rétine diabétique (Kern *et al.*, 2007). L'augmentation de la perméabilité vasculaire serait aussi associée à des changements dans l'expression des molécules qui forment les jonctions cellulaires de la barrière hémato-rétinienne. Par exemple, des études ont montré une diminution de l'expression d'occludine et de ZO-1, des protéines qui constituent les jonctions serrées, chez le rat diabétique (Antonetti *et al.*, 1998; Barber *et al.*, 2000, Leal *et al.*, 2007).

1.4.5.3 La migration des leucocytes dans la rétine

Au cours de la réponse inflammatoire, les médiateurs de l'inflammation induisent l'expression de molécules d'adhérence cellulaire au niveau de l'endothélium des capillaires. Ce processus est connu comme l'activation de l'endothélium vasculaire. Les médiateurs de l'inflammation induisent aussi l'expression de molécules d'adhérence cellulaire complémentaires à la surface des monocytes et des neutrophiles circulants. Ces changements permettent aux leucocytes de se lier à l'endothélium vasculaire activé dans le foyer inflammatoire et de s'insérer entre les cellules endothéliales pour atteindre le tissu (Crane et Liversidge, 2008). Le processus de recrutement des leucocytes au site

d'inflammation s'accomplit en quatre phases : l'attachement, le roulement, l'activation et l'adhésion ferme, et la transmigration (Figure 1.6). La première étape consiste en une interaction entre les leucocytes circulants et la paroi des vaisseaux sanguins, ce qui ralentit le déplacement des leucocytes. Cette interaction nécessite la participation des sélectines, des molécules exprimées à la surface de la plupart des leucocytes, et des mucines, des protéines fortement glycosylées présentes à la surface de l'endothélium en conditions inflammatoires. Ces interactions réversibles permettent aux leucocytes d'adhérer à la paroi du vaisseau sanguin et de rouler lentement à sa surface. L'étape de l'activation et de l'adhésion ferme dépend des interactions entre les intégrines LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen 1*) présentes à la surface des leucocytes et les molécules d'adhérence cellulaire de l'endothélium, comme l'immunoglobuline ICAM-1 dont l'expression est régulée par TNF- α . En présence de cytokines chimiotactiques, les intégrines subissent des changements de conformation qui permettent l'adhésion ferme des leucocytes aux cellules endothéliales via la liaison avec ICAM-1. Les leucocytes peuvent par la suite s'insérer entre les cellules endothéliales et atteindre le tissu; c'est l'étape de la transmigration. Cette migration des leucocytes s'effectue le long des gradients d'agents chimiotactiques produits par le foyer d'inflammation (Crane et Liversidge, 2008).

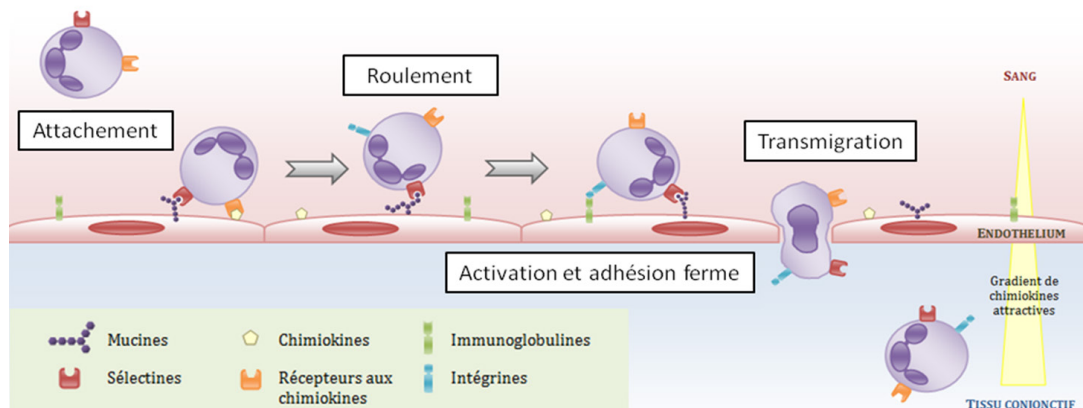


Figure 1.6 : Processus de recrutement des leucocytes au site d'inflammation

(Figure adaptée de <http://www.cours-pharmacie.com>)

Plusieurs évidences suggèrent que la rétinopathie diabétique serait associée à une augmentation des niveaux de leucocytes dans la rétine et une leucostase persistante. En effet, certaines études ont démontré que le nombre de neutrophiles est significativement augmenté dans les vaisseaux sanguins rétiniens de patients diabétiques et de modèle animaux de diabète (McLeod *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1998; Miyamoto *et al.*, 1999). Le diabète augmente aussi l'expression d'ICAM-1 dans la rétine et l'interaction de cette molécule d'adhésion endothéliale avec l'intégrine CD18 sur les leucocytes contribuerait à la leucostase dans les vaisseaux sanguins rétiniens (Miyamoto *et al.*, 1999; Jousseaume *et al.*, 2004). L'adhérence des leucocytes à la paroi des vaisseaux sanguins a été suggérée comme étant l'un des facteurs impliqués dans la mort des cellules endothéliales et pourrait également contribuer à l'altération de la perfusion rétinienne (Kern *et al.*, 2007; Jousseaume *et al.*, 2001) et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Del Maschio *et al.*, 1996).

1.4.6 Les traitements

La photocoagulation laser et l'intervention chirurgicale, développées respectivement dans les années 1950 et 1960, demeurent les traitements les plus couramment utilisés pour la rétinopathie diabétique (Wilkinson-Berka and Miller, 2008). Malheureusement, ces traitements ciblent uniquement les stades avancés de la maladie au moment où la prolifération des vaisseaux sanguins a déjà débuté et que la rétine est sérieusement endommagée. La photocoagulation laser, dans laquelle un laser est appliqué sur la rétine, détruit la néovascularisation et les tissus ischémiques de façon à limiter la stimulation de l'angiogénèse par des facteurs de croissance. La vitrectomie est également utilisée pour traiter la rétinopathie proliférative et a comme objectif premier d'enlever le sang et les tissus fibreux dans la cavité vitréenne qui causent une traction sur la rétine et qui pourraient mener à son détachement. Elle sert également à freiner la progression de la néovascularisation et de l'œdème maculaire. Bien que la photocoagulation laser et la vitrectomie permettent de réduire significativement les risques d'une perte sévère de la vision, ces procédures sont associées à plusieurs effets adverses (cataractes, altération de la vision des couleurs, néovascularisation de l'iris). De plus, chez certains patients, les

hémorragies vitréennes, l'œdème maculaire et le détachement de la rétine continuent à progresser en dépit des traitements (Wilkinson-Berka et Miller, 2008).

Plus récemment, des thérapies pour inhiber l'action du VEGF ont été développées. Le VEGF-A est reconnu comme un facteur important dans la pathogénèse de la rétinopathie diabétique puisqu'il stimule la néovascularisation, augmente la perméabilité vasculaire et l'inflammation. L'administration intra-vitréenne d'anticorps monoclonaux ciblant un ou plusieurs isoformes du VEGF-A, tels le Ranibizumab (Lucentis) et le Bevacizumab (Avastin), ont montré une amélioration de l'acuité visuelle, une diminution de la perméabilité vasculaire et une régression de la néovascularisation chez des patients atteints de rétinopathie diabétique (Nguyen *et al.*, 2006; Chun *et al.*, 2006; Avery *et al.*, 2006). Toutefois, les injections intra-vitréennes répétées augmentent les risques d'infection, de cataracte, de glaucome et de toxicité systémique. De plus, l'administration d'anti-VEGF pourrait influencer les fonctions physiologiques de la rétine étant donné le rôle important du VEGF dans le maintien de l'intégrité vasculaire et la survie des cellules neuronales (Wilkinson-Berka et Miller, 2008).

Plusieurs études ont également évalué l'efficacité des corticostéroïdes pour le traitement de la rétinopathie diabétique et de l'œdème maculaire. Les corticostéroïdes sont une classe de molécules connues pour leurs propriétés anti-inflammatoires. Dans des modèles pré-cliniques de maladies rétiniennes, l'administration de corticostéroïdes, tels l'acétonide de triamcinolone et la dexaméthasone, réduit la perméabilité vasculaire, l'inflammation et la prolifération des vaisseaux sanguins (Kim *et al.*, 2007a; Kim *et al.*, 2007b; Wang *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2005). Chez des patients avec une rétinopathie diabétique, l'administration intra-vitréenne d'acétonide de triamcinolone a également démontré des résultats bénéfiques, notamment une amélioration de l'acuité visuelle, une réduction de l'œdème maculaire ainsi qu'une diminution de la néovascularisation (Brooks *et al.*, 2004; Gillies *et al.*, 2006). Toutefois, les études cliniques ont aussi rapporté des effets adverses associés à l'injection de corticostéroïdes chez plusieurs patients, incluant une

augmentation de la pression intraoculaire et la formation de cataractes (Gillies *et al.*, 2006; Jonas *et al.*, 2006; Baath *et al.*, 2007).

Plusieurs études cliniques, chez des patients avec et sans rétinopathie diabétique, ont clairement démontré qu'un contrôle intensif des niveaux de glucose sanguin et de la pression artérielle permet de diminuer de façon substantielle les risques de développement de la rétinopathie diabétique et la progression de la maladie (Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1995; Schrier, 2002 ; UK Prospective Diabetes Study Group, 1998). Le contrôle de ces facteurs systémiques près des valeurs normales, en plus d'avoir des effets bénéfiques pour la rétinopathie diabétique, diminue également l'incidence de plusieurs autres complications du diabète.

1.5 Le système kallibréine-kinine

Le système kallibréine-kinine comprend les kinines, des peptides inflammatoires et vasoactifs, formés à partir des kininogènes de haut et de bas poids moléculaire, par les kallibréines tissulaire et plasmatique (Figure 1.7). Les kinines sont impliquées dans une variété d'effets biologiques tels la vasodilatation, l'inflammation et la douleur, et sont parmi les premiers médiateurs à être libérés dans les tissus lésés (Marceau *et al.*, 1998; Couture *et al.*, 2001).

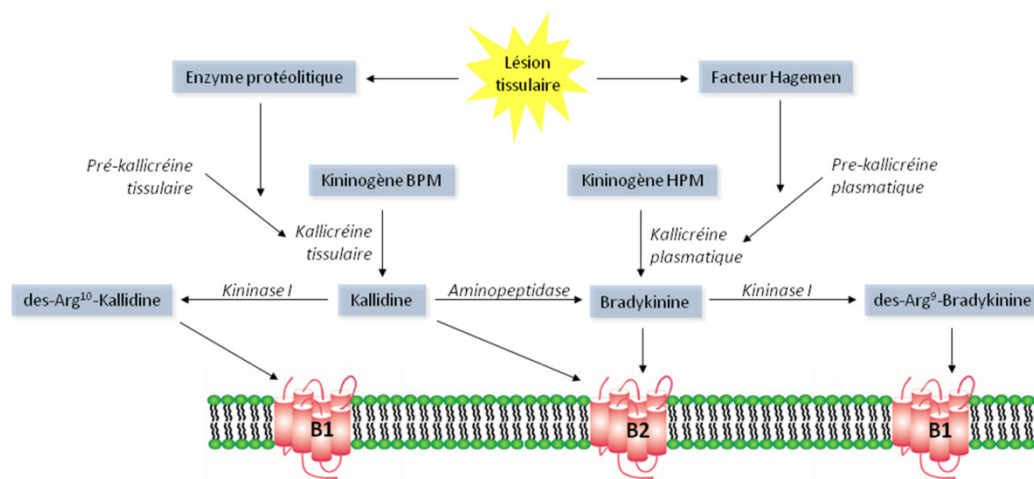


Figure 1.7 : Le système kallibréine-kinine

1.5.1 La formation des kinines

Les kinines appartiennent à une famille de peptides de structure primaire homologue possédant 9 à 11 acides aminés, incluant la bradykinine (BK), la kallidine (KD; Lys-BK) et leurs métabolites actifs dépourvus de l'arginine en position carboxy-terminale (des-Arg⁹-BK et des-Arg¹⁰-KD) (Tableau 1.1). La bradykinine et la kallidine sont formées par le clivage protéolytique de leurs précurseurs respectifs : le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM, 110 kDa) et le kininogène de bas poids moléculaire (KBPM, 70 kDa) (Bhoola *et al.*, 1992). La bradykinine et la kallidine sont produits par deux voies biochimiques distinctes, l'une plasmatique et l'autre tissulaire. Dans la voie plasmatique, la formation de la bradykinine est amorcée par l'activation du facteur de Hageman (facteur XII de la cascade de coagulation) suite au contact du plasma avec une surface chargée négativement (collagène, glycoprotéines, etc.). La pré-kallicréine plasmatique est ensuite transformée en kallicréine par le facteur de Hageman activé. Le kininogène de haut poids moléculaire est alors clivé par la kallicréine, ce qui libère la bradykinine (Kaplan *et al.*, 1997). Dans la voie tissulaire, des enzymes protéolytiques activent la pré-kallicréine tissulaire et la kallidine est libérée à partir du kininogène de bas poids moléculaire (Bhoola *et al.*, 1992).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bradykinine	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe	Arg-OH
Kallidine	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-Arg-OH
des-Arg ⁹ -bradykinine	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-OH	
des-Arg ¹⁰ -kallidine	Lys	Arg	Pro	Pro	Gly	Phe	Ser	Pro	Phe-OH

Tableau 1.1 : Structure primaire des kinines

1.5.2 La dégradation des kinines

Les kinines subissent une dégradation métabolique rapide par des amino-, endo- et carboxypeptidases retrouvés dans le sang, les tissus et les liquides biologiques. Les aminopeptidases, les carboxypeptidases, l'endopeptidase neutre ainsi que l'enzyme de conversion de l'angiotensine sont les principales enzymes responsables du métabolisme de la bradykinine et de la kallidine en fragments peptidiques actifs et inactifs (Gabra *et al.*, 2003). Ces enzymes également appelés kininases, font en sorte que la demi-vie des kinines ne dure que quelques secondes (Décarie *et al.*, 1996).

Les aminopeptidases sont des enzymes qui clivent les kinines en position N-terminale. L'aminopeptidase M, présente dans le plasma, clive la lysine en position N-terminale sur la kallidine et la des-Arg¹⁰-KD pour former la bradykinine et la des-Arg⁹-BK respectivement. L'aminopeptidase P clive l'arginine en position N-terminale en brisant le pont Arg-Pro pour donner la BK(2-9) ou des-Arg¹-BK (Kuoppala *et al.*, 2000; Couture et Girolami, 2004).

Les kininases I, incluant la carboxypeptidase M de la membrane cellulaire et la carboxypeptidase N du plasma, clivent l'arginine en position C-terminale. Elles sont responsables de seulement 10% du métabolisme des kinines mais jouent un rôle important car elles génèrent la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD, les métabolites actifs de la bradykinine et de la kallidine (Décarie *et al.*, 1996).

L'endopeptidase neutre et la kininase II, aussi appelée enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (ECA), dégradent la bradykinine en clivant le dipeptide Phe-Arg en position C-terminale formant ainsi la BK(1-7) inactive. La BK(1-7) peut de nouveau être dégradée par l'endopeptidase neutre ou l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 pour former les métabolites finaux de la bradykinine, soient la BK(1-4) et la BK(1-5) respectivement. L'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 métabolise aussi la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD en produits inactifs. Cet enzyme se retrouve principalement à la surface membranaire des cellulaires endothéliales et elle est responsable de plus de 75% de

l'inactivation des kinines dans la circulation sanguine (Marceau *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 2005).

1.5.3 Les récepteurs des kinines

Les kinines exercent leurs effets biologiques par l'activation de deux récepteurs : le récepteur B₁ (B₁R) et le récepteur B₂ (B₂R) (Regoli *et al.*, 2001; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Ces récepteurs possèdent sept domaines transmembranaux et font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G (G_{αq} et G_{αi}). L'homologie de la séquence des acides aminés entre les récepteurs B₁ et B₂ est de seulement 36% chez l'humain et 30% chez la souris (Gabra *et al.*, 2003). Plusieurs agonistes et antagonistes peptidiques et non-peptidiques ont été développés pour cibler les récepteurs B₁ et B₂ et moduler l'action pharmacologique des kinines dans la douleur, l'inflammation et la régulation du tonus vasculaire (Tableaux 1.2 et 1.3) (Moreau *et al.*, 2005).

1.5.3.1 Le récepteur B₂

Le récepteur B₂ est constitutif et possède une grande affinité pour la bradykinine et la kallidine. Il est exprimé de façon ubiquitaire et est présent notamment sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les neurones, les astrocytes et les neutrophiles (Bhooha *et al.*, 1992). Il est responsable de l'action pharmacologique des kinines dans la phase aiguë de l'inflammation (Couture *et al.*, 2001). Suite à la liaison d'un agoniste, le récepteur B₂ subit une désensibilisation fonctionnelle et une internalisation rapide (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Ce mécanisme est ainsi associé à une diminution du nombre de récepteurs exprimés à la surface cellulaire et à une réversibilité rapide des effets biologiques, ce qui explique la réponse aiguë associée au récepteur B₂.

1.5.3.2 Le récepteur B₁

Le récepteur B₁ est activé par la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD. Il est généralement absent dans les tissus sains mais il est fortement induit et surexprimé à la

suite de lésions tissulaires ou par la présence de stress oxydatif, d'endotoxines bactériennes, de facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires tels TNF- α et IL-1 β (Marceau *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 1998). L'induction du récepteur B₁ par les cytokines est régulée par la MAP kinase et le facteur de transcription nucléaire NF- κ B (Larrivée *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 1999). Contrairement au récepteur B₂, le récepteur B₁ participe à la phase chronique de la réponse inflammatoire (Couture *et al.*, 2001). L'activation du récepteur B₁ est associée à une faible désensibilisation, à une internalisation limitée et à une dissociation lente du ligand (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005; McLean *et al.*, 2000; Prado *et al.*, 2002).

Ligand	Structure	Application	Référence
Agonistes B₁			
R-838	Sar-[D-Phe ⁸]des-Arg ⁹ -BK		Drapeau <i>et al.</i> , 1991
Lys-des-Arg ⁹ -BK	H-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-OH	Ouverture de la barrière sang-tumeur	Côté <i>et al.</i> , 2012
NG ₂₉	Sar-Lys[D-Phe ⁸]des-Arg ⁹ -BK	Ouverture de la barrière sang-tumeur	Côté <i>et al.</i> , 2012
Antagonistes B₁			
Leu ⁸ -des-Arg ⁹ -BK	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Leu-OH	Douleur	Abbas <i>et al.</i> , 1998
[des-Arg ¹⁰]-Hoe 140	Des-Arg ⁹ -D-Arg-[Hyp ³ ,Thi ⁵ ,D-Tic ⁷ ,Oic ⁸]-BK		Sardi <i>et al.</i> , 1997
R-914	Ac-Lys-Lys-[α (Me)Phe ⁵ ,D-βNal ⁷ ,Ile ⁸]des-Arg ⁹ -BK		Gobeil <i>et al.</i> , 1999
R-715	Ac-Lys-[D-βNal ⁷ ,Ile ⁸]des-Arg ⁹ -BK	Inflammation allergique du poumon	Gobeil <i>et al.</i> , 1996
R-954	Ac-Orn-[Oic ² ,α(Me)Phe ⁵ , D-βNal ⁷ ,Ile ⁸]des-Arg ⁹ -BK	Inflammation allergique du poumon	Neugebauer <i>et al.</i> , 2002
LF22-0542	N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[[(4-methoxy-2,6-dimethylphenyl)sulfonyl]methylamino]ethoxy]-Nmethylacetamide fumarate	Douleur neuropathique	Porreca <i>et al.</i> , 2006
SSR240612	[(2R)2[[[(3R)3(1,3benzodioxol5yl)3[[[(6methoxy2naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]3(4[[[2R,6S)2,6dimethylpiperidiny]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N methylpropanamide hydrochloride]	Hyperalgésie, inflammation	Gougat <i>et al.</i> , 2004

Tableau 1.2 : Agonistes et antagonistes du récepteur B₁ des kinines (Adapté de Moreau *et al.*, 2005)

Ligand	Structure	Application	Référence
Agonistes B₂			
Labradimil	[Hyp ³ ,Thi ⁵ ,4-Me-Tyr ⁸ ψ(CH ₂ -NH)Arg ⁹]-BK	Perméabilité de la barrière cérébrovasculaire	Emerich <i>et al.</i> , 2001
FR190997	(8-[2,6-dichloro-3-[N-[(E)-4-(N-methylcarbamoyl)-cinnamidoacetyl]-N-methyl-amino]bezyloxy]-2-methyl-4-(2-pyridylmethoxy)quinoline)	Hypertension	Majima <i>et al.</i> , 2000
R523	[Phe ⁸ ψ(CH ₂ NH)Arg ⁹]-BK	Ouverture de la barrière cérébro-vasculaire	Côté <i>et al.</i> , 2010
Antagonistes B₂			
Hoe 140	D-Arg-[Hyp ³ ,Thi ⁵ ,D-Tic ⁷ ,Oic ⁸]-BK	Asthme, inflammation, douleur inflammatoire	Feletou <i>et al.</i> , 1995 Hock <i>et al.</i> , 1991
FR173657	(8-[3-[N-[(E)-3-(6-acetamidopyridin-3-yl)acryloylglycyl]-N-m ethylamino]-2,6-dichlorobenzyloxy]-2-methylquinoline)	Hyperalgésie, inflammation	Rizzi <i>et al.</i> , 1997 Asano <i>et al.</i> , 1997 Inamura <i>et al.</i> , 1997

Tableau 1.3 : Agonistes et antagonistes du récepteur B₂ des kinines (Adapté de Moreau *et al.*, 2005)

1.5.3.3 Les mécanismes d'induction du récepteur B₁

Le récepteur B₁ est induit par différentes cytokines pro-inflammatoires, incluant TNF- α , IL-1 β , et interféron- γ (INF- γ) (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Ces cytokines activent diverses voies de signalisation (PKC, MAPK, PI3-K) qui convergent toutes à l'activation d'un même mécanisme de transduction : l'activation du facteur de transcription nucléaire NF- κ B. NF- κ B est un régulateur important de l'expression génique de plusieurs médiateurs de l'inflammation et il est responsable de l'induction du récepteur B₁ à la membrane cellulaire. Le rôle essentiel de ce facteur de transcription a été démontré dans des fibroblastes pulmonaires humains et dans des cellules du muscle lisse vasculaire, où l'expression du récepteur B₁ en présence de cytokines était bloquée par l'inhibition de NF- κ B (Schanstra *et al.*, 1998; Ni *et al.*, 1998). L'activation du récepteur B₁ peut à son tour mener à l'activation de NF- κ B et ainsi amplifier la réponse inflammatoire par la production de TNF- α , d'IL-1 β et l'auto-induction de son propre récepteur (Schanstra *et al.*, 1998). Ces données suggèrent une interaction complexe entre le récepteur B₁, NF- κ B et les cytokines dans la phase chronique de la réponse inflammatoire. De plus, plusieurs composantes du système kallibréine-kinine, dont la kallibréine et les kininogènes, sont également augmentées au site d'inflammation et entretiennent la production locale de kinines et l'activation chronique du récepteur B₁ (Bhoola *et al.*, 1992). Des études suggèrent aussi que l'activation du récepteur B₂ pourrait contribuer à l'induction du récepteur B₁ via la production autocrine de cytokines ou l'activation directe de NF- κ B (Pan *et al.*, 1996; Phagoo *et al.*, 1999). L'expression du récepteur B₁ pourrait aussi être induite via la désensibilisation et l'internalisation du récepteur B₂ (Campos *et al.*, 1995). En effet, dans un modèle de souris génétiquement modifiée, l'invalidation du gène du récepteur B₂ entraîne une surexpression du récepteur B₁ (Duka *et al.*, 2001; Marin-Castano *et al.*, 2002).

1.5.3.4 Les voies de signalisation des récepteurs des kinines

Les deux récepteurs des kinines activent sensiblement les mêmes voies de signalisation. Ils interagissent directement avec les protéines G_{ai} et G_{aq}. La transduction des

signaux suite à l'activation des récepteurs B_1 et B_2 est relayée par différents systèmes de seconds messagers dépendant du type cellulaire. Le recrutement de la protéine $G_{\alpha q}$ entraîne l'activation de la phospholipase C (PLC) et la formation de l'inositol-1-4-5-triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG) menant respectivement à l'augmentation du calcium intracellulaire et à l'activation de la protéine kinase C (PKC). Le Ca^{2+} stimule la eNOS ce qui entraîne la production de NO dans les cellules endothéliales. L'activation de la phospholipase A_2 (PLA_2) par l'augmentation du calcium intracellulaire peut également entraîner la relâche de l'acide arachidonique et la production de prostaglandines. Dans les cellules musculaires lisses, l'activation de l'adénylate cyclase et de la guanylate cyclase entraîne la production d'AMPc et de GMPc (Figure 1.4). Via la protéine $G_{\alpha i}$, l'activation des récepteurs mène à l'inhibition de l'AMPc. Outre ces voies de signalisation classiques, les récepteurs des kinines peuvent également activer la voie des MAP-kinases et la voie JAK/STAT impliquées dans la régulation de la transcription de gènes spécifiques (Marceau *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 2005).

Même si les récepteurs B_1 et B_2 possèdent des mécanismes de transduction similaires, la durée et l'intensité de la variation des concentrations de Ca^{2+} intracellulaires sont différentes. Dans les cellules musculaires lisses, l'activation du récepteur B_2 entraîne une augmentation transitoire du Ca^{2+} intracellulaire tandis que l'activation du récepteur B_1 entraîne une réponse soutenue caractérisée par l'entrée de calcium extracellulaire dans la cellule (Marceau *et al.*, 1998).

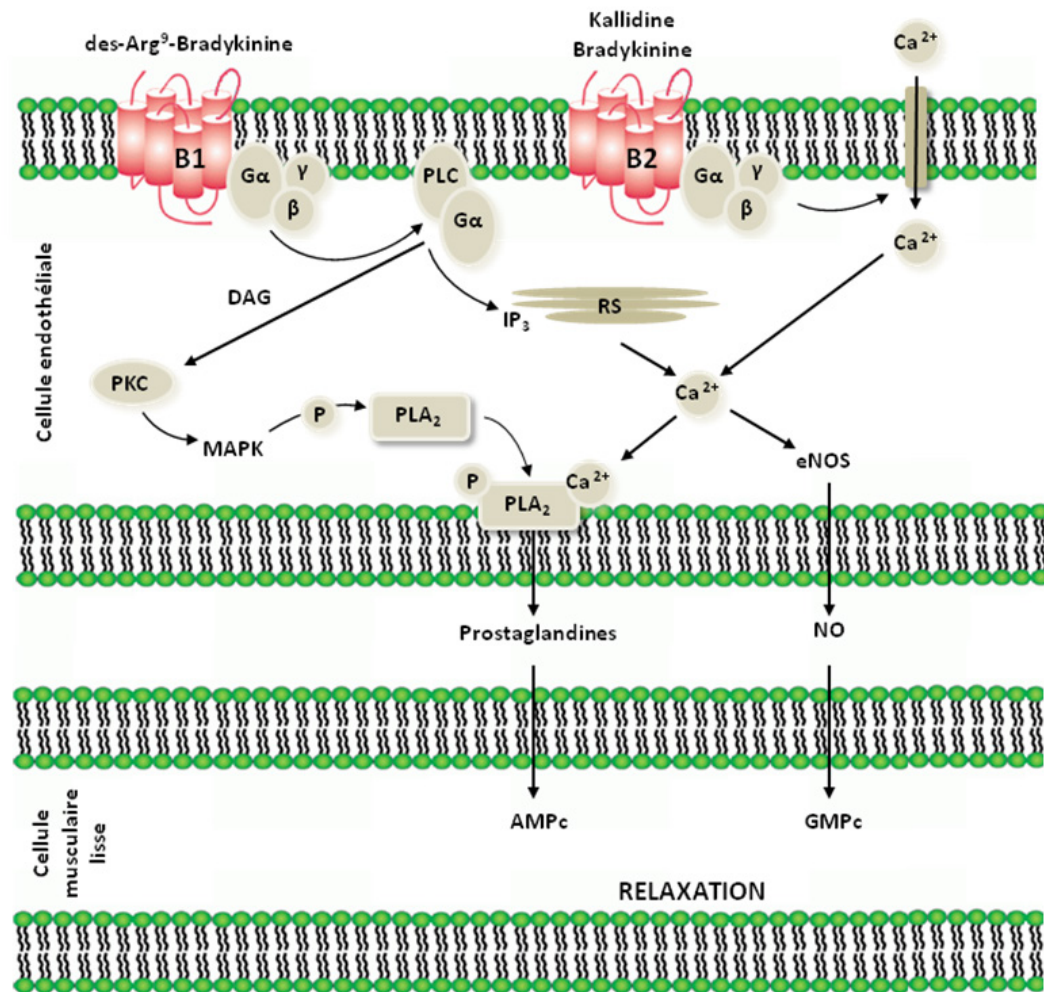


Figure 1.8 : Voies de signalisation des récepteurs B₁ et B₂ impliquées dans la dilatation des vaisseaux sanguins (Figure inspirée de Moreau *et al.*, 2005)

1.5.4 Le récepteur B₁ et le diabète

Plusieurs données expérimentales suggèrent que l'hyperglycémie causée par le diabète entraîne l'expression du récepteur B₁ dans différents tissus. Le diabète de type 1, aussi appelé diabète insulino-dépendant, est provoqué par une réponse auto-immune accompagnée d'une surproduction de cytokines (principalement TNF α et IL-1 β) menant à la destruction des cellules β responsables de la sécrétion d'insuline dans les îlots pancréatiques.

(Rabinovitch, 1998a; Rabinovitch, 1998b). L'hyperglycémie qui en résulte induit la production d'espèces réactives oxygénées qui entraînent l'activation de NF- κ B et l'expression du récepteur B₁ des kinines (Yerneni *et al.*, 1999, Couture et Girolami, 2004). Le modèle de diabète induit par la Streptozotocine (STZ) est le plus couramment utilisé pour étudier l'action du récepteur B₁ dans diverses complications du diabète. La STZ est un antibiotique extrait de *Streptomyces acromogenes* qui est sélectivement toxique pour les cellules β des îlots pancréatiques, entraînant ainsi une réaction inflammatoire et la production de cytokines. Cet agent alkylant inhibe la synthèse de l'ADN dans les cellules. Grâce à sa structure similaire au glucose, cette molécule est transportée dans les cellules par la protéine de transport du glucose GLUT2, mais n'est pas reconnue par les autres transporteurs de glucose. La STZ présente une toxicité sélective pour les cellules β du pancréas puisque ces cellules ont une grande concentration en transporteurs GLUT2.

Avec l'induction du diabète par la STZ chez le rat et la souris, des études moléculaires et pharmacologiques ont montré une augmentation de l'expression et de la fonction du récepteur B₁ dans plusieurs tissus ou parties du corps tels le cerveau, la moelle épinière, la patte, les poumons, les reins et la rétine (Vianna *et al.*, 2003; Abdouh *et al.*, 2003; Mage *et al.*, 2002; Campos *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2005; Ongali *et al.*, 2004; El Midaoui *et al.*, 2005). Chez le rat et la souris STZ, l'administration d'antagonistes du récepteur B₁ normalise l'hyperglycémie (Catanzaro *et al.*, 2010), la fonction rénale (Zuccollo *et al.*, 1996), l'hyperalgésie (Talbot *et al.*, 2010) et la perméabilité vasculaire (Abdouh *et al.*, 2008; Lawson *et al.*, 2005).

Le récepteur B₁ est également surexprimé dans la moelle épinière, le cerveau, et l'aorte chez des rats traités au glucose (10% dans l'eau à boire) pendant 4 à 12 semaines, un modèle expérimental qui développe une résistance à l'insuline associée à une hypertension artérielle, à une hyperinsulinémie et à une augmentation du stress oxydatif dans le cœur et l'aorte (El Midaoui *et al.*, 2005; El Midaoui et de Champlain, 2005; Lungu *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2010). La surexpression du récepteur B₁ et plusieurs symptômes du diabète dont l'hypertension artérielle, l'hyperinsulinémie et l'allodynie tactile et au froid sont corrigés

par une diète riche en anti-oxydant et l'administration prolongée (1 semaine) d'un antagoniste du récepteur B₁ (SSR240612), suggérant un lien entre le stress oxydatif, l'hyperglycémie et le récepteur B₁ (Dias *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2010; El Midaoui *et al.*, 2005). De plus, les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (IECA) s'avèrent des médicaments de choix dans le traitement du diabète et des complications cardiovasculaires car ils bloquent la voie de la NAD(P)H oxydase, principale source d'espèces réactives oxygénées dans les tissus vasculaires (Cai *et al.*, 2003; McFarlane *et al.*, 2003). Plusieurs évidences indiquent que le récepteur B₁ pourrait contribuer aux effets des IECA par une interaction avec l'angiotensine et le stress oxydatif. En effet, un traitement chronique avec le ramipril (IECA) prévient l'induction et la surexpression du récepteur B₁ dans un modèle de résistance à l'insuline (Ismael *et al.*, 2008). De plus, l'angiotensine II induit l'expression du récepteur B₁ dans des modèles *in vivo* et *in vitro* via l'augmentation du stress oxydatif (Morand-Contant *et al.*, 2010; Ceravolo *et al.*, 2007; De Brito Garipey *et al.*, 2010).

1.5.5 Le récepteur B₁ et la réponse inflammatoire

Le récepteur B₁, la kallibréine plasmatique et tissulaire et les kininogènes sont localisés à la surface des macrophages et des neutrophiles synoviaux et circulants, ainsi que sur les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Bockmann et Paegelow, 2000; Bhoola *et al.*, 2001; Araujo *et al.*, 2001). Dans les vaisseaux sanguins, la production locale de kinines contribue à la diapédèse des neutrophiles et à leur migration dans les tissus endommagés en réponse à l'attraction chimiotactique des cytokines. L'activation du récepteur B₁ induit les 3 phases du recrutement des leucocytes (roulement, adhésion et transmigration), associée à une augmentation de l'expression de la protéine et de l'ARNm du récepteur dans les veinules post-capillaires (McLean *et al.*, 2000; Duchene *et al.*, 2007). Chez le rat diabétique, l'administration de des-Arg⁹-BK entraîne l'infiltration des leucocytes dans la cavité pleurale (Vianna *et al.*, 1998; Vianna *et al.*, 2003). Toutes ces données suggèrent un rôle important pour le récepteur B₁ dans la phase cellulaire de la réponse inflammatoire. La migration des leucocytes via l'activation du récepteur B₁ serait

également favorisée par une augmentation concomitante de la perméabilité vasculaire. En effet, dans plusieurs lits vasculaires, l'activation du récepteur B₁ contribue à l'hyperperméabilité. Dans un modèle d'inflammation induit par les cytokines ou le lipopolysaccharide (LPS), l'expression du récepteur B₁ provoque l'œdème de la patte chez le rat (Campos *et al.*, 1998). Chez la souris et le rat STZ-diabétique, l'administration d'antagonistes du récepteur B₁ diminue la perméabilité vasculaire dans plusieurs tissus dont le foie, le pancréas, le cœur, le rein, la peau, le poumon et la rétine (Simard *et al.*, 2002; Lawson *et al.*, 2005a; Lawson *et al.*, 2005b; Abdouh *et al.*, 2008).

1.5.6 Le récepteur B₁ et la régulation du tonus vasculaire

L'une des fonctions les plus documentées des kinines et de leurs récepteurs est certainement la capacité à moduler le tonus vasculaire. La présence des récepteurs des kinines a été confirmée sur l'endothélium vasculaire et les cellules musculaires lisses des artères fémorales, rénales, pulmonaires, carotides et coronaires ainsi que sur la microvascularisation de la rétine (McLean *et al.*, 2000; Abdouh *et al.*, 2003). Dans des vaisseaux sanguins isolés, plusieurs études ont démontré l'action vasodilatatrice du récepteur B₁ suite à son activation sur les cellules endothéliales (Churchill et Ward, 1986; Rhaleb *et al.*, 1989; McLean *et al.*, 1999; Regoli et Barabé, 1980; Pruneau et Bélichard, 1993; Abdouh *et al.*, 2003). La stimulation du récepteur B₁ entraîne la production de médiateurs vasoactifs comme les prostaglandines et le NO qui régulent le débit sanguin local ainsi que la perméabilité vasculaire (Ahluwalia et Perretti, 1999). Dans des modèles animaux qui surexpriment le récepteur B₁, l'injection intraveineuse d'agonistes du récepteur B₁ cause une hypotension associée à une diminution de la résistance périphérique et à une augmentation compensatoire du débit cardiaque (Drapeau *et al.*, 1991; Bélichard *et al.*, 1996; Lamontagne *et al.*, 1996). Toutefois, dans certaines conditions *in vitro*, le récepteur B₁ peut aussi induire une vasoconstriction, tel que montré dans l'aorte de lapin et la veine rénale du porc et les cellules musculaires lisses humaines (McLean *et al.*, 2000). Généralement, cette vasoconstriction est indépendante de l'endothélium et implique une interaction directe entre la PKC et la relâche de calcium (McLean *et al.*, 2000).

Le récepteur B₁ est rapidement induit en conditions pathologiques, participant ainsi à la réponse inflammatoire et à plusieurs des effets délétères associés au diabète. Toutefois, la surexpression de ce récepteur pourrait avoir des avantages considérables dans certaines complications cardiovasculaires. Dans l'infarctus du myocarde, la surexpression et l'activation du récepteur B₁ stimule l'angiogénèse et la réparation tissulaire via la production de NO et l'expression de facteurs de croissance (Tschöpe *et al.*, 2000; Emanuelli et Madeddu, 2001; Parenti *et al.*, 2001). De plus, l'activation du récepteur B₁ inhibe les arythmies ventriculaires attribuées à une diminution de la relâche de noradrénaline lors de la reperfusion suivant l'ischémie cardiaque (Chahine *et al.*, 1993). Certaines études soulignent aussi que les récepteurs des kinines pourraient contribuer aux effets bénéfiques des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (IECA) dans l'hypertension et les maladies cardiovasculaires (Regoli *et al.*, 2012). Les IECA empêchent non seulement la transformation de l'angiotensine I en angiotensine II, un puissant vasoconstricteur, mais bloquent aussi la dégradation des kinines connues pour leurs effets vasodilatateurs. Ils pourraient également activer directement le récepteur B₁ entraînant une augmentation du Ca²⁺ intracellulaire et la relâche de NO menant à la vasodilatation (Ignjatovic *et al.*, 2002; Erdős *et al.*, 2010). Chez les rats normaux et spontanément hypertendus, l'administration chronique d'IECA entraîne une surexpression du récepteur B₁ dans les vaisseaux sanguins, le rein et la moelle épinière (Marin-Castano *et al.*, 2002; Ongali *et al.*, 2003; Duguay *et al.*, 2004). Chez des patients avec une insuffisance cardiaque, le récepteur B₁ contribue à l'augmentation du débit sanguin lors d'un traitement chronique avec un IECA (Wetherow *et al.*, 2001). Toutes ces données suggèrent un rôle cardioprotecteur pour le récepteur B₁, qui dans certaines conditions, se déroule parallèlement à ses effets délétères associés à l'inflammation.

1.5.7 Le récepteur B₁ et le stress oxydatif

Chez le rat insulino-résistant, l'expression du récepteur B₁ est inhibée par une diète riche en acide alpha-lipoïque ou par un traitement avec la N-Acétyl-L-Cystéine, deux antioxydants (Lungu *et al.*, 2007; Ismael *et al.*, 2008; El Midaoui *et al.*, 2005). De plus, la

suppression du récepteur B₁ par les diètes anti-oxydantes est associée à une amélioration des symptômes du diabète, incluant notamment une diminution de la résistance à l'insuline, de l'hypertension artérielle, de l'allodynie et de la production d'anion superoxyde dans le cœur et l'aorte (Lungu *et al.*, 2007; Ismael *et al.*, 2008). Le stress oxydatif pourrait donc contribuer à l'induction du récepteur B₁ et aux complications associées à la résistance à l'insuline. Le stress oxydatif peut activer NF-κB, qui est directement impliqué dans l'expression du récepteur B₁. Ces résultats sont appuyés par une récente étude qui montre qu'un traitement d'une semaine avec l'antagoniste du récepteur B₁, SSR240612, normalise l'expression du récepteur B₁ et la production d'anion superoxyde dans l'aorte via une inhibition de l'activité de la NAD(P)H oxydase (Dias *et al.*, 2010). Ce traitement a aussi renversé toutes les complications dans ce modèle : résistance à l'insuline, hypertension et neuropathie douloureuse.

1.5.8 Expression du système kallibréine-kinine dans l'œil

Toutes les composantes du système kallibréine-kinine sont présentes dans les différentes structures de l'œil. L'expression de la kallibréine plasmatique et tissulaire a été montrée chez le lapin dans plusieurs tissus oculaires tels l'iris, le corps ciliaire, la cornée, la rétine, l'humeur aqueuse et la glande lacrimale (Kuznetsova *et al.*, 1991). Chez le rat, la kallibréine plasmatique, le kininogène de haut poids moléculaire et le récepteur B₂ ont été identifiés dans la rétine (Takeda *et al.*, 1999; Phipps *et al.*, 2009). L'expression et la localisation des composantes clés du système kallibréine-kinine ont aussi été montrées chez l'homme (Ma *et al.*, 1996). La kallibréine tissulaire, le kininogène de bas poids moléculaire et les récepteurs des kinines sont présents dans la rétine, le nerf optique, la choroïde et le corps ciliaire. Ces composantes ont été identifiées sur les cellules neuronales de la rétine, incluant les couches nucléaires interne et externe et les cellules ganglionnaires, mais également sur les cellules endothéliales et musculaires lisses des vaisseaux sanguins, les cellules musculaires du corps ciliaire et les cellules épithéliales du cristallin (Ma *et al.*, 1996). Les cellules du réseau trabéculaire et les cellules épithéliales non-pigmentées du segment antérieur de l'œil expriment aussi les composantes de la voie tissulaire du système

kallicréine-kinine (Webb *et al.*, 2009). La colocalisation des enzymes de synthèse des kinines et de leurs récepteurs dans divers tissus oculaires suggèrent que les kinines agissent via une action paracrine ou autocrine, c'est-à-dire que les kinines sont sécrétées localement et interagissent avec des récepteurs situés sur la même cellule ou sur une cellule voisine (Webb *et al.*, 2011).

1.5.9 Les kinines et la rétinopathie diabétique

Bien que le rôle du système kallicréine-kinine dans l'inflammation soit reconnu depuis de nombreuses années, l'implication potentielle des kinines dans le développement de la rétinopathie diabétique n'a été soulevée que récemment. Les composantes du système kallicréine-kinine sont présentes dans la rétine et plusieurs études suggèrent que les altérations métaboliques associées au diabète peuvent engendrer la production de kinines dans la rétine. Chez les patients ayant une rétinopathie diabétique proliférative, la prékallicréine, le facteur XII, le kininogène de haut poids moléculaire et la kallicréine plasmatique sont augmentés dans l'humeur vitrée (Gao *et al.*, 2008). L'activation de la voie de la kallicréine plasmatique serait causée par une augmentation du pH de l'humeur vitrée. Les hémorragies associées à la néovascularisation rétinienne active l'enzyme anhydrase carbonique extracellulaire qui catalyse la réaction $CO_2 + H_2O \rightarrow H^+ + HCO_3^-$ menant à l'entrée de H^+ dans les cellules causant ainsi l'alcalinisation de l'humeur vitrée et l'activation de la kallicréine plasmatique (Gao *et al.*, 2007). Ces résultats sont consistants avec une étude précédente qui avait montré une réduction du KBP (*kallikrein binding protein*) dans la rétine de rat diabétique, suggérant ainsi une augmentation de la disponibilité de la kallicréine dans les tissus oculaires (Hatcher *et al.*, 1997). De plus, l'activation du système kallicréine-kinine contribuerait directement à l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans la rétine diabétique. En effet, l'injection intravitréenne de bradykinine ou de kallikréine plasmatique chez le rat entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire, un effet qui peut être atténué par l'administration d'antagonistes du récepteur B_2 des kinines ou d'inhibiteurs de la kallicréine plasmatique (Phipps *et al.*, 2009; Abdouh *et al.*, 2008). Chez le rat STZ-diabétique, le récepteur B_1 est surexprimé sur les

microvaisseaux de la rétine par un mécanisme impliquant le stress oxydatif (Abdouh *et al.*, 2003; Abdouh *et al.*, 2008). La stimulation du récepteur B₁ par un agoniste entraîne la vasodilatation des microvaisseaux rétiniens *in vitro* ainsi que l'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne chez le rat diabétique (Abdouh *et al.*, 2003; Abdouh *et al.*, 2008). Chez le rat STZ-diabétique à 4 et 12 semaines, l'administration sous-cutanée de R-954, un antagoniste du récepteur B₁, entraîne une diminution du NO, de la kallibréine et de la perméabilité vasculaire dans la rétine (Catanzaro *et al.*, 2012).

1.6 Hypothèses et objectifs

Un rôle délétère est suggéré pour le récepteur B₁ des kinines dans la rétinopathie diabétique; ce récepteur est induit et surexprimé sur les artérioles pré-capillaires, les capillaires et les veinules de la rétine en réponse à l'hyperglycémie pendant le diabète. Dans la rétine de rat diabétique, le récepteur B₁ participe à l'augmentation de la perméabilité vasculaire et son activation induit une vasodilatation des microvaisseaux rétiniens (Abdouh *et al.*, 2003; Abdouh *et al.*, 2008). Ainsi, le récepteur B₁ pourrait représenter une cible thérapeutique pour le traitement de la rétinopathie diabétique. La présente recherche a été effectuée afin de mieux comprendre le rôle du récepteur B₁ dans le développement de cette maladie et afin d'établir le potentiel thérapeutique d'un traitement oculaire avec un antagoniste du récepteur B₁. En utilisant le modèle de diabète induit par la STZ, les altérations vasculaires de la rétine ont été étudiées en examinant l'effet du blocage pharmacologique du récepteur B₁ sur le débit sanguin rétinien, la perméabilité vasculaire, l'expression de médiateurs de l'inflammation et le stress oxydatif. L'expression du récepteur B₁ et de cytokines pro-inflammatoires a aussi été mesurée dans la rétine de patients diabétiques.

1.6.1 Premier article

Pouliot M, Deschênes MC, Héту S, Chemtob S, Lesk MR, Couture R, Vaucher E. (2009) Quantitative and regional measurement of retinal blood flow in rats using N-isopropyl-p-[14C]-iodoamphetamine ([14C]-IMP). Exp Eye Res 89: 960-966.

L'objectif de cette étude était de mettre au point une technique permettant de mesurer de façon quantitative le débit sanguin rétinien dans un modèle animal. Le développement de cette méthode permettrait par la suite d'étudier les changements de débit sanguin chez le rat diabétique et l'action du récepteur B₁ sur le lit vasculaire rétinien. L'hypothèse était que le N-isopropyl-p-[¹⁴C]-iodoamphetamine ([¹⁴C]-IMP), un traceur radioactif couramment utilisé pour la mesure du débit sanguin cérébral, peut également être employé pour mesurer simultanément le débit sanguin dans la rétine. Grâce à ses propriétés lipophiles, le [¹⁴C]-IMP diffuse dans les tissus proportionnellement au flot sanguin et permet de mesurer le débit sanguin local par autoradiographie. Ainsi, cet article présente la technique d'autoradiographie quantitative pour évaluer le débit sanguin rétinien chez le rat éveillé en utilisant l'hypercapnie comme modulateur du débit sanguin. Les variations du débit sanguin rétinien ont été mesurées et comparées à celles du débit sanguin cérébral.

1.6.2 Deuxième article

Pouliot M, Héту S, Lahjouji K, Couture R, Vaucher E. (2011) Modulation of retinal blood flow by kinin B₁ receptor in Streptozotocin-diabetic rats. Exp Eye Res 92: 482-489.

L'hypothèse de cette recherche était que l'action vasoactive du récepteur B₁ des kinines, lequel est surexprimé sur les vaisseaux sanguins de la rétine, puisse contribuer aux changements du débit sanguin rétinien induits lors du diabète. Cette étude avait comme objectifs de caractériser les changements du débit sanguin rétinien chez le rat STZ-diabétique en utilisant la technique d'autoradiographie quantitative, puis de déterminer si le récepteur B₁ est impliqué dans les altérations de la perfusion rétinienne. L'expression du récepteur B₁ dans la rétine de rat diabétique a été mesurée par immunobuvardage de type Western et la modulation du débit sanguin rétinien a été évaluée suite à l'administration d'un antagoniste du récepteur B₁.

1.6.3 Troisième article

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

Cette recherche visait à déterminer si un antagoniste B₁ des kinines, administré sous forme de gouttes oculaires, pouvait renverser les altérations vasculaires rétiniennes caractéristiques de la rétinopathie diabétique. Étant donné le rôle important des kinines dans la réponse inflammatoire et le lien bien établi entre le récepteur B₁ et le stress oxydatif, le récepteur B₁ pourrait être situé en amont de la cascade inflammatoire à l'origine des lésions rétiniennes induites par l'hyperglycémie. Son inhibition pourrait ainsi avoir des effets positifs pour le traitement de la rétinopathie diabétique. Cet article montre les effets de l'administration topique d'un antagoniste du récepteur B₁ sur la perméabilité vasculaire, l'infiltration des leucocytes, l'expression de médiateurs de l'inflammation et la production d'anion superoxyde dans la rétine de rat diabétique.

1.6.4 Étude complémentaire

Expression du récepteur B₁ dans la rétine humaine diabétique

Le but de cette étude était de confirmer que le récepteur B₁, qui est surexprimé dans la rétine de rat diabétique, est également induit dans la rétine humaine. Ainsi, l'expression du récepteur B₁ et celle de deux cytokines pro-inflammatoires associées à son induction (TNF α et d'IL-1 β) ont été mesurées dans la rétine de patients diabétiques de type I et de type II et comparées à celle de patients témoins.

Chapitre 2 : Premier article

Experimental Eye Research, 2009 Dec;89(6):960-6

Quantitative and regional measurement of retinal blood flow in rats using N-isopropyl-p-[¹⁴C]-iodoamphetamine ([¹⁴C]-IMP)

Mylène Pouliot^{1,2}, Micheline C. Deschênes^{1,3,4}, Simon Héту^{1,2}, Sylvain Chemtob⁵, Mark R. Lesk^{3,4}, Réjean Couture² and Elvire Vaucher^{1*}

¹School of Optometry, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

² Department of Physiology, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

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

⁴Research Centre Guy-Bernier, University of Montreal, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 boul. L'Assomption, Montréal, QC, Canada, H1T 2M4.

⁵Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, Research Centre of Sainte-Justine Hospital, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5.

*Corresponding author: Elvire Vaucher, School of Optometry, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

2.1 Abstract

Quantitative and regional measurement of retinal blood flow in rodents is of prime interest for the investigation of regulatory mechanisms of ocular circulation in physiological and pathological conditions. In this study, a quantitative autoradiographic method using N-isopropyl-p-¹⁴C-iodoamphetamine ([¹⁴C]-IMP), a diffusible radioactive tracer, was evaluated for its ability to detect changes in retinal blood perfusion during hypercapnia. Findings were compared to cerebral blood flow values measured simultaneously. Hypercapnia was induced in awaken Wistar rats by inhalation of 5% or 8% CO₂ in medical air for five minutes. [¹⁴C]-IMP (100 μCi/kg) was injected in the femoral vein over a 30 second period and the rats were sacrificed two minutes later. Blood flow was calculated from whole-mount retinae and 20 μm thick brain sections in discrete regions of interest by quantitative autoradiography or from digested samples of retina and brain by liquid scintillation counting. Retinal blood flow values measured with quantitative and regional autoradiography were higher in the central (108 ± 20 ml/100g/min) than in peripheral (84 ± 15 ml/100g/min) retina. These values were within the same range as cortical blood flow values (97 ± 4 ml/100g/min). The retinal blood flow values obtained on whole-mount retinae were validated by the sampling method. Hypercapnia significantly increased overall blood flow in the retina (24 to 53%) with a maximal augmentation in the peripheral region and in the brain (22 to 142%). The changes were stronger in the brain compared to retina (p=0.016). These results demonstrate that retinal blood flow can be quantified using [¹⁴C]-IMP and compared with cerebral blood flow. This technique is a powerful tool to study how retinal blood flow is regulated in different regions of the rat retina.

Keywords: blood flow; retina; brain; autoradiography; hypercapnia; iodoamphetamine; microcirculation; imaging.

Abbreviations: CBF, cerebral blood flow; DLG, dorsal geniculate nucleus; IMP, iodoamphetamine; RBF, retinal blood flow.

2.2 Introduction

Deficit in blood supply in the retina contributes to the development of retinal diseases, such as diabetic retinopathy, age-related macular degeneration and glaucoma (Grunwald, Riva et al. 1984; Langham, Grebe et al. 1991; Atmaca, Batioglu et al. 1996). Rodent models are commonly used to study the development of these retinal damages and to test potential therapies. However, blood flow dysfunctions in rodents and their cellular and molecular mechanisms remain elusive. This is principally due to a lack of a technical approach which would adequately assess all the specific features of the rodent retinal microcirculation.

Due to its small size, laminar structure, location and apposition to the choroid, the rodent retina is particularly difficult to study. Optically based imaging techniques, including laser Doppler flowmetry (Tsujikawa, Kiryu et al. 2000; Yu, Townsend et al. 2005; Chauhan, Yu et al. 2006; Mori, Saito et al. 2007), on-line video angiography (Clermont, Brittis et al. 1994; Kunisaki, Bursell et al. 1998) or optical coherence tomography (Fujimoto, Brezinski et al. 1995) have a great temporal resolution but a poor spatial and laminar resolution and require a high transparency of the light paths (Glazer 1988; Duong, Pardue et al. 2008). Alternatively, quantitative techniques such as the use of systemic radioactive or non-radioactive microspheres (Chemtob, Beharry et al. 1991; Alm, Lambrou et al. 1997; Wang, Fortune et al. 2007) and magnetic resonance imaging (Sicard and Duong 2005; Duong, Pardue et al. 2008; Li, Cheng et al. 2008) are performed on anaesthetised animal which modifies cardiovascular parameters. The use of radioactive diffusible tracer iodoantipyrine commonly used for the measurement of cerebral blood flow (CBF) (Sakurada, Kennedy et al. 1978; Bryan, Myers et al. 1988; Vaucher, Borredon et al. 1997; Greenberg, Sohn et al. 1999) has also been tested for quantitative measurement of retinal blood flow by autoradiography in the cat, monkey (Sossi and Anderson 1983; Quigley, Hohman et al. 1985) and rat (O'Brien, Kelly et al. 1997), but post-mortem tracer diffusion limits its spatial resolution (Caprioli and Miller 1988).

In order to simultaneously provide quantitative and local measurement of discrete changes of the retinal blood flow (RBF) in conscious rats, the autoradiographic technique was adapted in the present study by using the radioactive diffusible tracer N-Isopropyl-p-[¹⁴C]-iodoamphetamine ([¹⁴C]-IMP). This tracer was chosen because it has an insignificant post-mortem diffusion so that tissue perfusion could be quantified in whole-mount retina isolated from the choroid. The principle of blood flow evaluation with [¹⁴C]-IMP is identical to that of micrometric microspheres (Wang, Fortune et al. 2007) except that this “molecular microsphere” –IMP– is freely diffusible (does not depend on the blood-retinal or blood-brain barrier) and is trapped within the tissue instead of the microvascular space. It is then possible to quantify tissue perfusion at a microvascular level throughout the retina by computerized autoradiography. Moreover, the use of a diffusible tracer avoids inaccuracies of the RBF measurement due to axial streaming, plugging or permeability changes as reported with the classical microsphere technique (Glazer 1988; Wang, Fortune et al. 2007). Autoradiography technique is usually performed on 20 µm thick brain sections, whereas the flat mount retina is on average 200 µm thick. In order to validate RBF values measured by autoradiography, samples of the retina were digested and analysed by liquid scintillation counting (O'Brien, Kelly et al. 1997). Finally, as hypercapnia is commonly used to test the metabolic vasodilatation, two hypercapnia regimens were used to challenge the sensitivity of this technique to assess RBF changes. In addition, this technique provided the opportunity to simultaneously assess the RBF and CBF, which is an additional advantage to assess the tissue specificity of the responses to diverse physiological stresses.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Animals

Male Wistar rats (n = 20; 200-250 g) purchased from Charles River (St-Constant, Qc, Canada) were used for the measurement of RBF and CBF using [¹⁴C]-IMP by autoradiography or the sampling method. Rats were housed individually and placed in a room at 23°C with a 12-hour light/dark adapted photoperiod, with food and water provided

ad libitum. All experimental methods and animal care procedures were approved by the local institutional animal care committee, “Comité de Déontologie de l’Expérimentation sur les Animaux” at the University of Montreal, under the auspices of the Canadian Council on Animal Care.

2.3.2 Surgical procedure

Polyurethane catheters were inserted into the femoral vein (Micro-Renathane, I.D. 0.040", O.D. 0.020", Braintree Scientific, Braintree, MA, USA) and artery (Tygon Micro Bore, I.D. 0.010", O.D. 0.030", Small Parts, Miramar, FL, USA) under 1.5 % isoflurane (induction of anesthesia with 3% isoflurane for 5 min). During this procedure, body temperature was monitored with a rectal thermometer and maintained at 37°C by a heating pad (FHC, Bowdoinham, ME). Both blood pressure and heart rate were monitored from the tail using a non-invasive blood pressure cuff system (BP1000, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA). Before and immediately after the surgery, the topical anaesthetic lidocaine hydrochloride 2% (AstraZeneca, Mississauga, Ont, Canada) was applied on the skin incision to minimize pain. Rats were then installed in a hammock and left under minimal restraint over a 2-hour period to recover from anesthesia. Body temperature was maintained at 37°C with a heating lamp and both blood pressure and heart rate were monitored until the initiation of measurement experiment for the retinal perfusion. As well, cardiovascular, chemistry and hematologic parameters were measured with a veterinarian clinical blood gases and electrolytes analyzer (i-STAT[®], HESKA, Fort Collins, CO), from arterial blood samples collected via the arterial catheter. These data were collected immediately prior to the initiation of hypercapnia to confirm the recovery to a normal physiologic level.

2.3.3 Induction of hypercapnia

Hypercapnic conditions were used to modulate RBF and CBF. Awake animals were acclimatized to a gentle flow of medical air (3 L/min; 21% O₂, 79% N₂) provided by a small mask placed on the nose and mouth. Following few minutes of normal air breathing,

hypercapnia was induced by inhalation of 5% CO₂ (n = 4) or 8% CO₂ (n = 5) in medical air. Elevation of CO₂ concentration in inspired air started 5 minutes prior to the injection of [¹⁴C]-IMP for retinal perfusion measurement and lasted until the animals were sacrificed. Cardiovascular and hematologic parameters were also monitored during hypercapnia induction. Control animals (n = 9) inhaled only medical air.

2.3.4 Principles of the evaluation of retinal tissue perfusion using IMP

To evaluate tissue perfusion in retina with a regional resolution, we chose the diffusible blood flow tracer [¹⁴C]-IMP because of its three essential properties for CBF measurement (Lear, Ackermann et al. 1982). First, [¹⁴C]-IMP has a high extraction at the first pass through the microvasculature, which allows a non-restrictive diffusion from blood to tissue despite the blood-retinal barrier. Second, [¹⁴C]-IMP has a low clearance rate and low post-mortem diffusion (Greenberg, Sohn et al. 1999) due to its high affinity for cerebral tissue. This property avoids the primary limitation to the classical diffusible tracer [¹⁴C]-iodoantipyrine autoradiographic technique (O'Brien, Kelly et al. 1997) or of the *n*-[¹⁴C]-butanol (Puchowicz, Xu et al. 2004), i.e. their time-dependent post-mortem intraparenchymal diffusion, which results in weakening the local tracer spatial gradients in tissues. Third, [¹⁴C]-IMP is chemically and biologically inert for the duration of the measurement period (Greenberg, Sohn et al. 1999). IMP has been successfully used in small animal research (Lear, Ackermann et al. 1982; Greenberg, Sohn et al. 1999; Temma, Magata et al. 2004) and in humans using Single Photon Emission Computerized Tomography (Lear, Ackermann et al. 1982).

2.3.5 Procedure for the measurement of retinal and cerebral blood flow

(D,L)-N-Isopropyl-4-[¹⁴C]-iodo(phenyl)amphetamine (100 μCi/kg; PerkinElmer, Boston, MA, USA, custom synthesis) was dissolved in 600 μL of saline (injectable 0.9% NaCl solution) and infused in fully conscious rats over a 30s period at a constant rate of 1.2 mL/min using an infusion pump (PHD 2000, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) through the femoral vein. An average of 20-24 arterial blood samples (10 μL) were

collected continuously from the beginning of [^{14}C]-IMP injection to the sacrifice of the animal (2 minutes) in order to evaluate the arterial contamination curve. Blood samples were digested in 300 μL of soluene (PerkinElmer, Boston, MA, USA) for two hours at 37°C. A total of 5 ml of scintillation fluid (Ultimagold, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) was then added and the radioactivity was counted in a scintillation counter (LS6500, Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). The rats were sacrificed by decapitation two minutes after the beginning of the infusion. The eyes and brain were quickly removed within 3 minutes. A small incision on the superior eyelid was made to indicate the orientation of the eyes and the eyes together with the attached superior eyelid were then harvested. The eyes were immediately excised, the lens removed and the eye cup immersed in a solution of 4% paraformaldehyde for post-fixation. After a one hour fixation, retinae were removed from the eye cup, and dissected into four quadrants (superior, inferior, nasal and temporal). The vitreous body was carefully removed from the retinae using fine paint brush. One retina was processed for the sampling method the other one for autoradiographic analysis.

Sampling method: The whole wet retina was weighed after removal of vitreous body and digested in 500 μL of soluene overnight at 37°C, then processed for liquid scintillation counting (see above). In addition, 3 retinae from distinct control animals (n=2) were microdissected (1 mm^2 strips from each isopter and quadrant), weighed and analyzed by liquid scintillation. The counts were expressed in $\mu\text{Ci/g}$.

Autoradiography: The retina of the opposite eye was whole-mounted on a glass slide with the ganglion cells layer away from the slide. A small incision was made on the retina to indicate the nasal quadrant. The whole-mount retina was then exposed to an X-ray film (Hyperfilm, GE Healthcare Ltd, UK) for 4 days together with a set of [^{14}C]-standards (ARC, St. Louis, USA). The autoradiograms were analyzed using the computerized image analysis MCID Basic Software (v7.0, Interfocus Imaging, Linton, England).

For the CBF quantification, a piece of the frontal cerebral cortex was dissected, weighed and digested in soluene overnight at 37°C for liquid scintillation counting, and the

remaining brain was frozen in isopentane (-55°C) for autoradiography. The frozen brain was subsequently sliced in 20 µm thick coronal sections using a cryostat (-22°C) and exposed on X-ray film for 8 days with [¹⁴C]-standards (Amersham Biosciences, UK). Optimal exposure time for brain and retina was determined from pilot experiments.

2.3.6 Calculation of retinal and cerebral blood flow

Retinal and cerebral blood flow was evaluated using the principle of indicator-fractionation technique (Lear, Ackermann et al. 1982; Greenberg, Sohn et al. 1999) using the equations Eq. 1 for sampling method and autoradiographic analysis performed with 20 µm thick sections and Eq.2 for autoradiographic analysis performed on whole-mount retinae.

$$F = [C_{IMP}(T) / \int_0^T Ca(t)] \quad (\text{Eq. 1})$$

$$F = [C_{IMP}(T) \times 10^{-1} / \int_0^T Ca(t)] \quad (\text{Eq. 2})$$

where F is the blood flow (ml/100g/min), $C_{IMP}(T)$ is the radioactivity measured on the autoradiogram or digested tissue (µCi/g) at the time T (min) of sacrifice and Ca(t) is the arterial concentration of radioactivity measured in the blood samples (µCi/ml). For autoradiographic measurements in the retina, $C_{IMP}(T)$ was read from circular regions of interest of 0.8 mm² (1 mm diameter) distributed at the 1, 2 and 3 mm isopters away from the center of the optic nerve head in all retinal quadrants (Fig. 1). Since the common radioactive standards used for autoradiography are calibrated for 20 µm thick sections and the rat retina thickness is 205 ± 11 µm (Duong, Pardue et al. 2008), the measured [¹⁴C]-IMP concentration values from autoradiograms ($C_{IMP}(T)$) were uniformly corrected by a factor 10. For the brain, 8 regions of interest (area adjusted to the region size, 2-9 mm²) related to vision or in control areas were selected and analyzed at 3 coronal levels from Bregma: AP + 1.6 mm; cingulate, frontal cortex, striatum; AP -4.5 mm; parietal cortex, hippocampus, dorsolateral geniculate nucleus (DLG); AP -6.3mm; occipital cortex, superior colliculus.

2.3.7 Statistical analysis

Non-parametric Mann-Whitney tests were performed to compare both hypercapnic groups with control group and compare 5% CO₂ group with 8% CO₂ group for (1) the physiological parameters, (2) the regional RBF of each isopter, (3) the total RBF in digested tissue and (4) the CBF. For intragroup comparison of regional RBF, non parametric Mann-Whitney tests were performed to compare isopter3 mm with optic nerve head and isopter1 mm. A significance level of $p < 0.05$ was chosen.

2.4 Results

2.4.1 Quantitative and regional measurement of retinal blood flow in control animals

Pseudocolor autoradiograms of whole-mount retinae displayed a gradient of blood flow from the center of the retina to the periphery (Fig. 2, Table 1). The blood flow values were significantly higher in the optic nerve head region (108 ± 20 ml/100g/min) and isopter 1 mm ($112-120$ ml/100g/min, according to the quadrants examined) than in the isopter 3 mm ($82-86$ ml/100g/min, according to the quadrants examined, $p < 0.05$, Table 1). The values of blood flow throughout each concentric isopter were homogeneous. To validate the whole-mount measurements, sampling by isopter was performed by solouene digestion of retina samples controlled for their weight. The same center-to-periphery gradient of RBF values was observed with this method (optic nerve head, 138 ± 18 vs. Isopter 3 mm, 89 ± 13 ml/100g/min, $p = 0.04$, Table 2).

The values of RBF measured using the autoradiographic or sampling methods were within the same range, i.e. $80-120$ ml/100g/min (Fig. 2, Table 1, 2). This equivalence validates the correction factor ($\times 10^{-1}$) of the measured [¹⁴C]-IMP concentration values from whole-mount retina autoradiograms. However, it has to be considered that the peripheral retina might be slightly thinner than its central part whereas the correction for the retina thickness performed was a constant. This could introduce a slight quantitative bias when

comparing central vs. peripheral values but not when comparing counterparts regions from one retina to the other.

Moreover, our quantitative results showed that RBF values were within the same range that the cortical blood flow values, using both methods (80-120 vs. 70-127ml/100g/min, respectively, Table 1).

2.4.2 Physiological parameters

Before the inhalation of CO₂ (pre-hypercapnic values), physiological parameters were not different in the hypercapnic groups than in the control group ($p > 0.05$, Table 3). pCO₂, pO₂ and HCO₃ were significantly increased in the 5% CO₂ group ($p = 0.029$) and 8% CO₂ group ($p = 0.008$). The pH was significantly decreased in the 5% group ($p = 0.029$) and 8% CO₂ group ($p = 0.008$) compared to pre-hypercapnic values as commonly found in hypercapnia studies (Dauphin, Lacombe et al. 1991). Body temperature, blood pressure and heart rate were not affected by hypercapnia ($p > 0.05$, Table 3).

2.4.3 Effects of hypercapnia on retinal and cerebral blood flow

The hypercapnia induced a significant increase in the RBF ranging from 24% to 34% in the 5% CO₂ group and from 31% to 53% in the 8% CO₂ group ($p < 0.05$, Table 1, Fig. 3). This effect was observed in each region of interest of the retina compared to the control group. The exception was for the 1 mm isopter in the nasal and inferior quadrants and the 2 mm isopter in the inferior quadrant in the 5% CO₂ group. It appeared that changes seem stronger in peripheral regions (34-53%) than in the center of the retina (30-31%) but this did not reach significance (Fig. 3). Results from whole retina sampling method showed the same significant increase (33%) of RBF values in the 8% CO₂ group compared to control group (92 ± 21 vs. 121 ± 7 ml/100g/min, $p = 0.019$, Fig. 3, Table 1).

Hypercapnia also induced a robust increase in blood supply in the brain. Increases in CBF induced by hypercapnia were seen in all regions measured by autoradiography and reached about a two-fold increase (Fig. 4, Table 1) in the 8% CO₂ group compared to

control. The 5% CO₂ group displayed a significant increase of CBF in the hippocampus (53%, $p=0.01$), dorsal geniculate nucleus (49%, $p=0.019$) and superior colliculus (31%, $p=0.038$) compared to control group, but was not statistically different in cortex and striatum (Fig. 4, Table 1). CBF increases measured by the sampling method were also statistically significant for both hypercapnic groups compared to control group ($p=0.034$). The blood flow changes induced by hypercapnia were lower in the retina (24-53%) than the brain (22-142%, Fig. 3, 4, Table 1, $p=0.016$).

2.5 Discussion

This study used an autoradiographic method for the simultaneous quantification of RBF and CBF in non-anesthetised rats. The use of the diffusible tracer [¹⁴C]-IMP provided quantitative measurements of RBF in discrete regions of the retina ranging from the central to peripheral retina. This technique was sensitive enough to quantify differential RBF changes related to two different hypercapnia regimens. Moreover, it allowed for the comparison of blood flow values of the retina to those of the brain.

2.5.1 Quantitative and regional measurement of retinal blood flow with [¹⁴C]-IMP

The autoradiographic investigation of RBF using [¹⁴C]-IMP described here provided a high resolution quantitative cartography of RBF. Blood tissue perfusion was higher in the central as compared to peripheral retina with autoradiography and sampling method by isopters, as seen in monkey (Alm and Bill 1973). The RBF values were within the same range as reported in other studies using iodoantipyrine as a tracer (O'Brien, Kelly et al. 1997), but slightly larger than those obtained using microsphere method (Ido, Chang et al. 2004; Wang, Fortune et al. 2007) and smaller than those obtained using hydrogen clearance (Cringle, Yu et al. 1993), magnetic resonance imaging (Li, Cheng et al. 2008) or perfusion by butanol (Puchowicz, Xu et al. 2004). Fluctuations in RBF values according to the technique used could result from the use of anaesthetics or invasive procedures that might alter the systemic and retinal (Li, Cheng et al. 2008) blood flow. An advantage of the

present technique is the homeostatic preservation of the eye and the cardiovascular system, as well as the vigilant state of the animals. Nevertheless, restraint stress of the animal and acute ischemic tissue injury caused by cannulation of femoral artery and vein could have a slight influence on physiological parameters such as heart rate (Yoshimoto, Wehrwein et al. 2008). The dual vascular supply of the retina from central retinal artery and choroid is a puzzling issue for assessing RBF. In the present technique we cannot exclude that a fraction of [^{14}C]-IMP entrapped in the isolated retina could have diffused from the choroidal circulation through the pigmented epithelium. However, blood flow values would have been much more elevated in that case since choroid blood flow is known to be 10 times higher than RBF (Alm and Bill 1973; Wang, Fortune et al. 2007). The conformity of the present measured RBF values with previous studies supports an absence of a significant contamination from choroidal circulation, which is an advantage of the use of [^{14}C]-IMP over [^{14}C]-iodoantipyrine (Sossi and Anderson 1983; Quigley, Hohman et al. 1985; McFadzean, Graham et al. 1989; O'Brien, Kelly et al. 1997). The strong post-mortem diffusion of iodoantipyrine requires an immediate freezing of the tissue after the sacrifice of the animal, limiting the study of RBF to cross-sections of the eye globe. On those autoradiograms, the apposition of the choroid to the retina makes it difficult to differentiate the RBF from the choroidal blood flow (Caprioli and Miller 1988), which is not the case with flat mount retinae. The main limitation of the autoradiographic technique is that it provides a snapshot measurement of RBF unlike microsphere technique which permits a small number of consecutive measurements to be made in one animal (Alm and Bill 1973; Wang, Grant et al. 2008).

Results showed that hypercapnia significantly increased the retinal blood flow as reported in a previous study using the microsphere method in rats (Wang, Grant et al. 2008). The technique showed a good sensitivity since the changes measured were proportional to the pCO_2 of the animals. This validates the ability of the method to assess graduated variations of RBF. There was a good correspondence in percentage of change in blood flow in hypercapnic conditions using the sampling or autoradiography method,

indicating that autoradiographic RBF measurements allowed valid intergroup comparisons of retinal regions.

2.5.2 Comparison of retinal blood flow with cerebral blood flow

Our findings demonstrated that under normocapnic conditions, retinal perfusion was similar to blood flow in cerebral cortex, i.e. in the range of 95 ml/100g/min. These results agree with previous studies using the microsphere method which showed that RBF was similar to CBF in rats (Tilton, Chang et al. 1988; Tilton, Chang et al. 1999) and monkeys (Alm and Bill 1973). Results from the n-[¹⁴C]Butanol method suggested RBF is lower than CBF in rats (Puchowicz, Xu et al. 2004) which may be caused by post-mortem diffusion of the tracer. Evaluation of blood flow with blood-oxygenation level dependent (BOLD) functional magnetic resonance imaging indicated that RBF was five-fold greater than CBF in rats (Sicard and Duong 2005; Li, Cheng et al. 2008; Li, Cheng et al. 2008). However the resolution level might not have been adequate to discriminate retinal from choroidal blood flow. The current technique appears to provide an advantage over other techniques in terms of comparison of blood perfusion in different organs. This is important to evaluate the impact of a treatment on different vascular beds.

Our results showed a higher reactivity of blood flow in the brain than in the retina during CO₂ inhalation. Blood flow in the brain reached up to 142% augmentation in the 8% CO₂ group while mean RBF was increased up to 53%. These results suggest that the cerebral vascular bed might be more reactive to pCO₂ changes than the retina. Such findings have been observed in a study using microsphere method in piglets (Stiris, Odden et al. 1989).

2.6 Conclusion

In summary, we demonstrated that RBF can be quantitatively and regionally measured with [¹⁴C]-IMP in rats. This offers a beneficial opportunity for ophthalmology research since most ocular diseases are characterized by discrete and circumscribed

changes in blood flow. The possibility to compare quantitative data of RBF in different groups is essential for the evaluation of pharmaceutical treatments or to detect the subtle changes of blood flow in the retina of ocular diseases models.

2.7 Acknowledgements

The authors would like to thank Florence Dotigny for her technical assistance, Denis Latendresse for his graphical help, Mark Burke and Pierre Lacombe (Université Paris VII) for careful reading of the manuscript and helpful discussion. This study was supported by CNIB Baker New Researcher Fund, Canadian Foundation for Innovation (E.V.) and the Vision Research Network (FRSQ). MP is a recipient of the graduate student scholarship from the Foundation Fighting Blindness. EV received a Chercheur-Boursier salary support from Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ).

2.8 References

- Alm, A., Bill, A., 1973. Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Exp. Eye Res.* 15, 15-29.
- Alm, A., Lambrou, G.N., Maepea, O., Nilsson, S.F., Percicot, C., 1997. Ocular blood flow in experimental glaucoma: a study in cynomolgus monkeys. *Ophthalmologica* 211, 178-182.
- Atmaca, L.S., Batioglu, F., Atmaca, P., 1996. Evaluation of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration with fluorescein and indocyanine green videoangiography. *Ophthalmologica* 210, 148-151.
- Bryan, R.M., Jr., Myers, C.L., Page, R.B., 1988. Regional neurohypophysial and hypothalamic blood flow in rats during hypercapnia. *Am. J. Physiol.* 255, R295-302.
- Caprioli, J., Miller, J.M., 1988. Measurement of optic nerve blood flow with iodoantipyrine: limitations caused by diffusion from the choroid. *Exp. Eye Res.* 47, 641-652.
- Chauhan, B.C., Yu, P.K., Cringle, S.J., Yu, D.Y., 2006. Confocal scanning laser Doppler flowmetry in the rat retina: origin of flow signals and dependence on scan depth. *Arch. Ophthalmol.* 124, 397-402.
- Chemtob, S., Beharry, K., Rex, J., Chatterjee, T., Varma, D.R., Aranda, J.V., 1991. Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 1799-1807.
- Clermont, A.C., Brittis, M., Shiba, T., McGovern, T., King, G.L., Bursell, S.E., 1994. Normalization of retinal blood flow in diabetic rats with primary intervention using insulin pumps. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 981-990.

- Cringle, S.J., Yu, D.Y., Alder, V.A., Su, E.N., 1993. Retinal blood flow by hydrogen clearance polarography in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 1716-1721.
- Dauphin, F., Lacombe, P., Sercombe, R., Hamel, E., Seylaz, J., 1991. Hypercapnia and stimulation of the substantia innominata increase rat frontal cortical blood flow by different cholinergic mechanisms. *Brain Res.* 553, 75-83.
- Duong, T.Q., Pardue, M.T., Thule, P.M., Olson, D.E., Cheng, H., Nair, G., Li, Y., Kim, M., Zhang, X., Shen, Q., 2008. Layer-specific anatomical, physiological and functional MRI of the retina. *NMR Biomed.* 21, 978-996.
- Fujimoto, J.G., Brezinski, M.E., Tearney, G.J., Boppart, S.A., Bouma, B., Hee, M.R., Southern, J.F., Swanson, E.A., 1995. Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography. *Nat. Med.* 1, 970-972.
- Glazer, L.C., 1988. Methods for determination of optic nerve blood flow. *Yale J. Biol. Med.* 61, 51-60.
- Greenberg, J.H., Sohn, N.W., Hand, P.J., 1999. Nitric oxide and the cerebral-blood-flow response to somatosensory activation following deafferentation. *Exp. Brain Res.* 129, 541-550.
- Grunwald, J.E., Riva, C.E., Brucker, A.J., Sinclair, S.H., Petrig, B.L., 1984. Altered retinal vascular response to 100% oxygen breathing in diabetes mellitus. *Ophthalmology* 91, 1447-1452.
- Ido, Y., Chang, K., Williamson, J.R., 2004. NADH augments blood flow in physiologically activated retina and visual cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 101, 653-658.
- Kunisaki, M., Bursell, S.E., Umeda, F., Nawata, H., King, G.L., 1998. Prevention of diabetes-induced abnormal retinal blood flow by treatment with d-alpha-tocopherol. *Biofactors* 7, 55-67.
- Langham, M.E., Grebe, R., Hopkins, S., Marcus, S., Sebag, M., 1991. Choroidal blood flow in diabetic retinopathy. *Exp. Eye Res.* 52, 167-173.

- Lear, J.L., Ackermann, R.F., Kameyama, M., Kuhl, D.E., 1982. Evaluation of [123I]isopropylidoamphetamine as a tracer for local cerebral blood flow using direct autoradiographic comparison. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2, 179-185.
- Li, Y., Cheng, H., Duong, T.Q., 2008. Blood-flow magnetic resonance imaging of the retina. *Neuroimage* 39, 1744-1751.
- Li, Y., Cheng, H., Shen, Q., Kim, M., Thule, P.M., Olson, D.E., Pardue, M.T., Duong, T.Q., 2009. Blood-Flow Magnetic Resonance Imaging of Retinal Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 1824-1830.
- McFadzean, R.M., Graham, D.I., Lee, W.R., Mendelow, A.D., 1989. Ocular blood flow in unilateral carotid stenosis and hypotension. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30, 487-490.
- Mori, A., Saito, M., Sakamoto, K., Nakahara, T., Ishii, K., 2007. Intravenously administered vasodilatory prostaglandins increase retinal and choroidal blood flow in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 103, 103-112.
- O'Brien, C., Kelly, P.A., Ritchie, I.M., 1997. Effect of chronic inhibition of nitric oxide synthase on ocular blood flow and glucose metabolism in the rat. *Br. J. Ophthalmol.* 81, 68-71.
- Puchowicz, M.A., Xu, K., Magness, D., Miller, C., Lust, W.D., Kern, T.S., LaManna, J.C., 2004. Comparison of glucose influx and blood flow in retina and brain of diabetic rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24, 449-457.
- Quigley, H.A., Hohman, R.M., Sanchez, R., Addicks, E.M., 1985. Optic nerve head blood flow in chronic experimental glaucoma. *Arch. Ophthalmol.* 103, 956-962.
- Sakurada, O., Kennedy, C., Jehle, J., Brown, J.D., Carbin, G.L., Sokoloff, L., 1978. Measurement of local cerebral blood flow with iodo [14C] antipyrine. *Am. J. Physiol.* 234, H59-66.
- Sicard, K.M., Duong, T.Q., 2005. Effects of hypoxia, hyperoxia, and hypercapnia on baseline and stimulus-evoked BOLD, CBF, and CMRO₂ in spontaneously breathing animals. *Neuroimage* 25, 850-858.

- Sossi, N., Anderson, D.R., 1983. Effect of elevated intraocular pressure on blood flow. Occurrence in cat optic nerve head studied with iodoantipyrine I 125. *Arch. Ophthalmol.* 101, 98-101.
- Stiris, T., Odden, J.P., Hansen, T.W., Hall, C., Bratlid, D., 1989. The effect of arterial PCO₂-variations on ocular and cerebral blood flow in the newborn piglet. *Pediatr. Res.* 25, 205-208.
- Temma, T., Magata, Y., Mukai, T., Kitano, H., Konishi, J., Saji, H., 2004. Availability of N-isopropyl-p-[125I]iodoamphetamine (IMP) as a practical cerebral blood flow (CBF) indicator in rats. *Nucl. Med. Biol.* 31, 811-814.
- Tilton, R.G., Chang, K., Weigel, C., Eades, D., Sherman, W.R., Kilo, C., Williamson, J.R., 1988. Increased ocular blood flow and 125I-albumin permeation in galactose-fed rats: inhibition by sorbinil. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29, 861-868.
- Tilton, R.G., Chang, K.C., LeJeune, W.S., Stephan, C.C., Brock, T.A., Williamson, J.R., 1999. Role for nitric oxide in the hyperpermeability and hemodynamic changes induced by intravenous VEGF. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40, 689-696.
- Tsujikawa, A., Kiryu, J., Nonaka, A., Yamashiro, K., Ogura, Y., Honda, Y., 2000. Reproducibility of scanning laser Doppler flowmetry in the rat retina and optic nervehead. *Jpn. J. Ophthalmol.* 44, 257-262.
- Vaucher, E., Borredon, J., Bonvento, G., Seylaz, J., Lacombe, P., 1997. Autoradiographic evidence for flow-metabolism uncoupling during stimulation of the nucleus basalis of Meynert in the conscious rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 686-694.
- Wang, L., Fortune, B., Cull, G., McElwain, K.M., Cioffi, G.A., 2007. Microspheres method for ocular blood flow measurement in rats: size and dose optimization. *Exp. Eye Res.* 84, 108-117.
- Wang, L., Grant, C., Fortune, B., Cioffi, G.A., 2008. Retinal and choroidal vasoreactivity to altered PaCO₂ in rat measured with a modified microsphere technique. *Exp. Eye Res.* 86, 908-913.
- Yoshimoto, M., Wehrwein, E.A., Novotny, M., Swain, G.M., Kreulen, D.L., Osborn, J.W., 2008. Effect of stellate ganglionectomy on basal cardiovascular function and

responses to beta1-adrenoceptor blockade in the rat. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 295, H2447-2454.

Yu, D.Y., Townsend, R., Cringle, S.J., Chauhan, B.C., Morgan, W.H., 2005. Improved interpretation of flow maps obtained by scanning laser Doppler flowmetry using a rat model of retinal artery occlusion. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 46, 166-174.

2.9 Figures

Figure 2.1: Schematic representation of a whole-mount retina showing the regions of interest measured. The retina was divided into four quadrants (the notch indicates the nasal quadrant). The radioactivity concentration, $C_{IMP}(T)$, was measured in a circular region of interest (filled circles, area 0.8 mm^2) in the center of the retina (optic nerve head) and in each quadrant at each isopter (light circular lines at 1, 2 and 3 mm away from the center of optic nerve head).

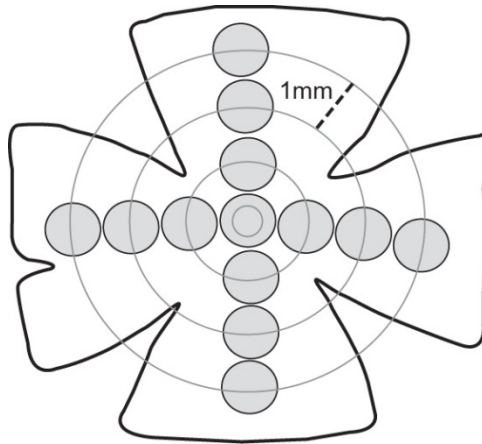


Figure 2.2: Representative whole-mount retina (A) and brain (B) autoradiograms displayed in pseudocolor from a control and two hypercapnic rats (5% CO₂ and 8% CO₂). The correspondence between pseudocolor scale and blood flow values (ml/100g/min) is represented on the right side of the figure. For the retinae as well as for the brains, the tissue concentration of [14C]-IMP was higher in hypercapnic rats than in control rats, indicating that the blood perfusion was greater. (A) Retinal blood flow was increased in both hypercapnic groups compared to control group. (B) Representative autoradiograms of 20 µm coronal brain sections at the level of the dorsal geniculate nucleus (- 4.6 mm from Bregma). The cerebral blood flow changes induced by hypercapnia varied according to the region examined.

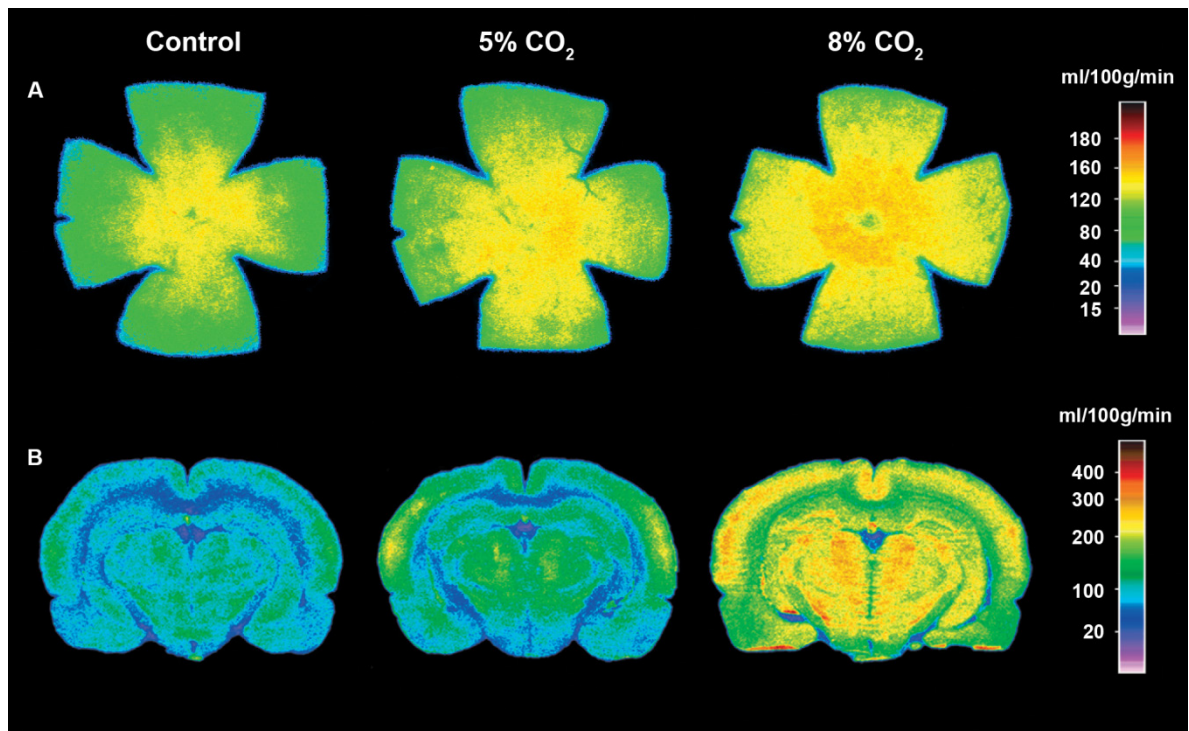


Figure 2.3: Percent change (versus control) of the retinal blood flow during hypercapnia. The retinal blood flow was measured on whole retina by sampling method (left panel) or on each isopter by autoradiography (right panel). The retinal blood flow was significantly increased in both hypercapnic groups (5% CO₂ and 8% CO₂) compared to control group at each isopter. * p<0.05 and ** p<0.01, significantly different from control group.

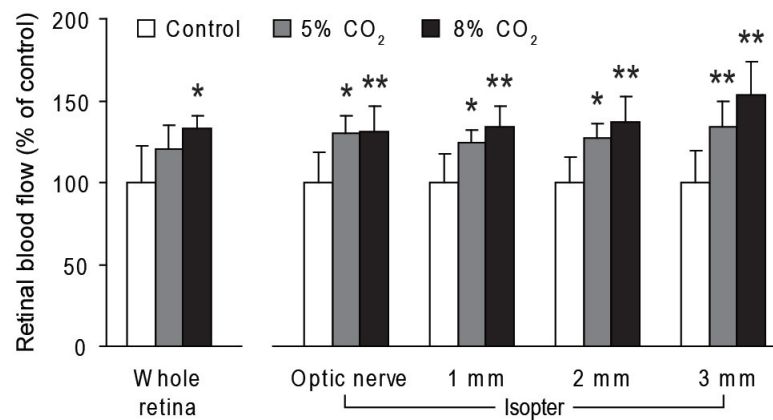


Figure 2.4: Percent change (versus control) of the cerebral blood flow during hypercapnia. The cerebral blood flow was measured on a piece of frontal cortex by the sampling method (left panel) or in different brain regions by autoradiography (right panel). Cerebral blood flow was significantly increased in the hippocampus, DLG and superior colliculus of the 5% CO₂ group and in every region measured for the 8% CO₂ group compared to control group. * p < 0.05.

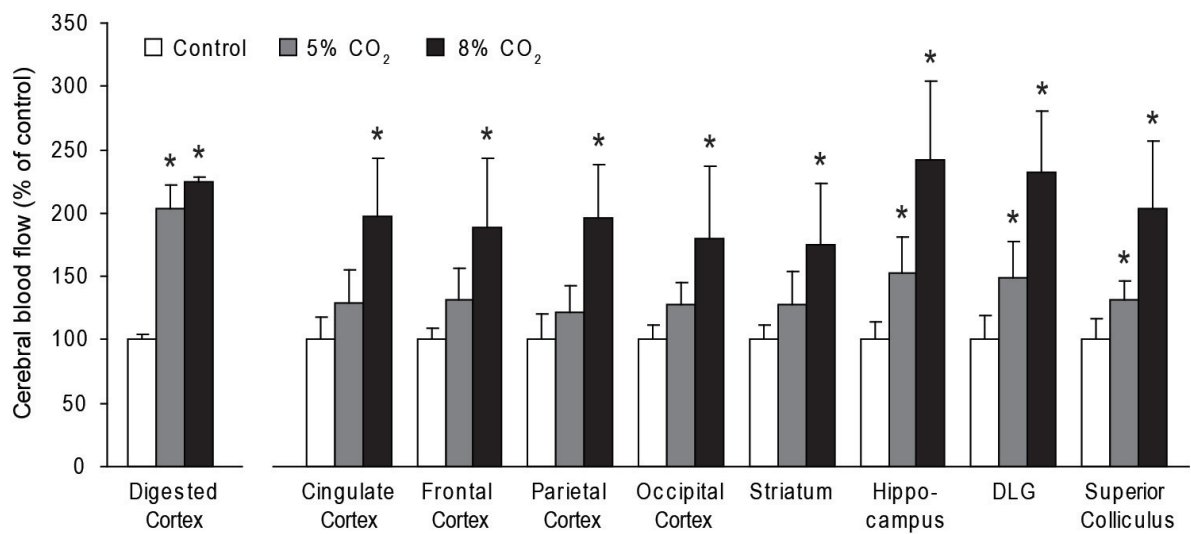


Table 2.1: Effect of hypercapnia on retinal and cerebral blood flow measured by autoradiography and sampling method

	Control	5% CO ₂	8% CO ₂
<i>Tissue sampling method</i>			
RBF	92 ± 21(n=9)	110 ± 13(n=4)	121 ± 7*(n=5)
CBF	97 ± 4(n=3)	197 ± 18*(n=4)	218 ± 3*(n=4)
<i>Autoradiography</i>			
<i>Whole-mount retina</i>			
Optic nerve head	108 ± 20	140 ± 12*	141 ± 16*
Nasal			
1 mm	119 ± 24	143 ± 5	158 ± 16*
2 mm	102 ± 18	131 ± 10*	145 ± 18**
3 mm	84 ± 15‡	112 ± 14*	131 ± 16**
Temporal			
1 mm	119 ± 20	149 ± 15*	158 ± 19**
2 mm	109 ± 18	137 ± 7**	142 ± 20*
3 mm	86 ± 21	117 ± 12*	132 ± 22**
Superior			
1 mm	113 ± 21	148 ± 8*	157 ± 16**
2 mm	98 ± 16	132 ± 7**	145 ± 14**
3 mm	82 ± 17†	111 ± 14*	135 ± 18**
Inferior			
1 mm	122 ± 22	144 ± 11	158 ± 15
2 mm	109 ± 20	131 ± 16	142 ± 16*
3 mm	86 ± 18	114 ± 14*	119 ± 16**
<i>Brain sections</i>			
Cingulate Cx	120 ± 22	156 ± 30	237 ± 56*
Frontal Cx	127 ± 12	166 ± 32	239 ± 68*
Parietal Cx	113 ± 23	138 ± 24	222 ± 48*
Occipital Cx	100 ± 12	128 ± 18	180 ± 58*
Striatum	108 ± 12	138 ± 28	189 ± 52*
Hippocampus	70 ± 10	106 ± 20*	168 ± 44*
Dorsal geniculate nucleus	112 ± 22	167 ± 31*	259 ± 55*
Superior Colliculus	112 ± 19	147 ± 16*	229 ± 60*

All values are means \pm SD and are expressed in ml/100g/min. For brain sections autoradiography values, the control group was consisted of n = 6 animals and both hypercapnic groups were consisted of n = 4 animals. * p < 0.05, ** p < 0.01 compared with control group. †p<0.05, ‡p<0.01 isopter 3 mm compared with optic nerve head.

Table 2.2: Regional measurement of retinal blood flow using the sampling method

	Tissue sampling (n = 3)	Autoradiography (n = 9)
<i>Isopter</i>		
Optic nerve head	138 ± 18	108 ± 20
1 mm	124 ± 27	119 ± 24
2 mm	114 ± 8	102 ± 18
3 mm	89 ± 13†	84 ± 15†

All values are means ± SD and are expressed in ml/100g/min. † p<0.05 isopter 3 mm compared with optic nerve head.

Table 2.3: Effect of hypercapnia on the physiological parameters monitored in the conscious rats after two hours of recovery from anaesthesia and prior to the injection of [¹⁴C]-IMP.

	<i>Control Group</i>	<i>5%CO₂ Group (n=4)</i>		<i>8%CO₂ Group (n=5)</i>	
	<i>(n=9)</i>	<i>Baseline</i>	<i>During</i>	<i>Baseline</i>	<i>During</i>
Body temperature (°C)	37.4 ± 0.3	38.1 ± 0.3	38.3 ± 0.4	37.9 ± 0.6	37.9 ± 1.0
Blood pressure					
systolic (mmHg)	132 ± 12	130 ± 6	138 ± 3	137 ± 10	138 ± 3
diastolic (mmHg)	104 ± 13	108 ± 7	105 ± 2	110 ± 5	105 ± 2
mean (mmHg)	113 ± 13	115 ± 6	116 ± 5	119 ± 6	116 ± 2
Heart Rate (Beats/min)	500 ± 53	449 ± 20	435 ± 12	461 ± 48	515 ± 83
Arterial pH	7.45 ± 0.01	7.45 ± 0.01	7.27 ± 0.02*	7.45 ± 0.01	7.07 ± 0.04**
Arterial pO ₂ (mmHg)	85.8 ± 3.6	86.8 ± 4.3	106.8 ± 9.0*	85.8 ± 5.2	103.2 ± 7.3*
Arterial pCO ₂ (mmHg)	37.8 ± 1.8	35.1 ± 2.2	57.6 ± 3.4*	35.6 ± 1.4	103.9 ± 16.1**
Arterial HCO ₃ (mmol/L)	26.3 ± 1.3	24.2 ± 1.2	26.3 ± 0.4*	24.8 ± 0.8	29.9 ± 1.3**
Hematocrit (% PVC)	40.7 ± 3.4	37.0 ± 2.8	37.8 ± 3.2	40.0 ± 1.6	43.0 ± 0.7**

Values are means ± SD. pO₂, pCO₂, partial gas pressure of oxygen and carbon dioxide, respectively; HCO₃, bicarbonate; *Baseline*, measure made before the induction of hypercapnia; *During*, measure made 5 minutes after induction of hypercapnia. * p<0.05, ** p<0.01 compared with prehypercapnic values.

Chapitre 3 : Deuxième article

Experimental Eye Research, 2011 Jun;92(6):482-9

Modulation of retinal blood flow by kinin B₁ receptor in Streptozotocin-diabetic rats

Mylène Pouliot^{1,2}, Simon Héту^{1,2}, Karim Lahjouji², Réjean Couture² and Elvire Vaucher^{1*}

¹École d'optométrie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

²Département de Physiologie, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

*Corresponding author: Elvire Vaucher, School of Optometry, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

3.1 Abstract

The vasoactive kinin B₁receptor (B₁R) is overexpressed in the retina of diabetic rats in response to hyperglycaemia and oxidative stress. The aim of the present study was to determine whether B₁R could contribute to the early retinal blood flow changes occurring in diabetes. Male Wistar rats were rendered diabetic with a single i.p. injection of Streptozotocin (STZ) and studied 4 days or 6 weeks after diabetes induction. The presence of B₁R in the retina was confirmed by Western blot. The impact of oral administration of the B₁R selective antagonist SSR240612 (10 mg/kg) was measured on alteration of retinal perfusion in awaked diabetic rats by quantitative autoradiography. Data showed that B₁R was upregulated in the STZ-diabetic retina at 4 days and 6 weeks. Retinal blood flow was not altered in 4-day diabetic rats compared with age-matched controls but was significantly decreased following SSR240612 treatment. In 6-week diabetic rats, retinal blood flow was markedly reduced compared to control rats and SSR240612 did not further decrease the blood flow. These results suggest that B₁R is upregulated in STZ-diabetic retina and has a protective compensatory role on retinal microcirculation at 4 days but not at 6 weeks following diabetes induction.

Keywords: Kinins, B₁ receptor, retina, blood flow, diabetes, autoradiography.

Abbreviations: B₁R, B₁ receptor; B₂R, B₂ receptor; BK, bradykinin; CBF, cerebral blood flow; DLG, dorsal geniculate nucleus; KD, kallidin; IMP, iodoamphetamine; RBF, retinal blood flow; STZ, Streptozotocin.

3.2 Introduction

The kallikrein-kinin system is involved in micro- and macro-vascular complications associated with diabetic nephropathy, cardiomyopathy and polyneuropathy (Couture and Girolami 2004; Gabra, Benrezzak et al. 2005; Buleon, Allard et al. 2008; Westermann, Walther et al. 2009). Through the activation of two G-protein coupled receptors, named B₁ (B₁R) and B₂ (B₂R) (Regoli and Barabe 1980); (Regoli, Nsa Allogho et al. 1998), these inflammatory peptides mediate enhanced capillary permeability, edema, leukocytes infiltration, vasodilation and regulation of local blood flow (Couture, Harrison et al. 2001);(Marceau, Hess et al. 1998). The activation of either receptor induces release of nitric oxide (NO) and prostaglandins (PGs) from vascular endothelial cells which consequently promote vasodilation (Ahluwalia and Perretti 1999; McLean, Perretti et al. 1999). The widely distributed B₂R mediates the acute effects of bradykinin (BK) and kallidin (KD). In contrast, B₁R is virtually absent in physiological conditions and is highly inducible in inflammatory, cardiovascular and neurological diseases (Pesquero, Araujo et al. 2000; Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005; Rodi, Couture et al. 2005). The preferential endogenous agonists of B₁R are the kininase I metabolites des-Arg⁹-BK and des-Arg¹⁰-KD (Marceau 1995; Marceau, Larrivee et al. 1997).

Recent findings suggest that the kallikrein-kinin system could also contribute to the development of diabetic retinopathy (Wilkinson-Berka and Fletcher 2004; Phipps and Feener 2008). Diabetic retinopathy is characterized by progressive alterations of the retinal microvasculature leading to breakdown of the blood-retinal barrier, angiogenesis, retinal detachment and vision loss. Hyperglycemia initiates a series of pathological events in the retinal vessels including pericyte and endothelial cells loss, basement membrane thickening, microaneurysms and vascular leakage. Retinal haemorrhages and capillary occlusion induces the formation of areas of vascular non-perfusion which trigger the proliferation of new blood vessels (Frank 2004). Endothelial cell dysfunction and retinal blood flow alterations also contribute to the development of diabetic retinopathy. Alterations of retinal blood flow are known to appear early in the progression of diabetic

retinopathy in patients (Kawagishi, Nishizawa et al. 1995; Bursell, Clermont et al. 1996; Grunwald, DuPont et al. 1996; Clermont and Bursell 2007) and in animal models of diabetes (Sutera, Chang et al. 1992; Cringle, Yu et al. 1993; Alder, Su et al. 1998; Higashi, Clermont et al. 1998; Clermont and Bursell 2007). Components of the kallikrein-kinin system are known to be expressed in the human, rabbit and rat retina (Kuznetsova, Chesnokova et al. 1991; Ma, Song et al. 1996; Takeda, Kimura et al. 1999; Lim, Park et al. 2008). Particularly, B₁R is overexpressed in the retina of Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats as early as 4 days after diabetes induction through a mechanism involving oxidative stress (Abdouh, Khanjari et al. 2003; Abdouh, Talbot et al. 2008). In STZ-diabetic rats, B₁R mediates vasodilation of retinal microvessels *in vitro* (Abdouh, Khanjari et al. 2003) and contributes to the breakdown of blood-retinal barrier *in vivo* (Lawson, Gabra et al. 2005; Abdouh, Talbot et al. 2008). These results suggest a role for B₁R in the development of vascular alterations in the diabetic retina.

Therefore, the objective of the present study was to determine whether B₁R is involved in retinal blood flow changes in the early stages of diabetes in the model of STZ-treated rat. The presence of B₁R in the retina of 4-day and 6-week STZ-diabetic rats was assessed by Western blot analysis. The ability of the B₁R antagonist SSR240612 (Gougat, Ferrari et al. 2004) to prevent retinal perfusion abnormality was measured by quantitative autoradiography. The impact of the antagonist was compared to cortical blood flow changes in the same animals.

3.3 Materials and methods

3.3.1 STZ-diabetic rats

All experimental methods and animal care procedures were approved by the local institutional animal care committee at the University of Montreal, in accordance to the Canadian Council on Animal Care. Male Wistar rats (n=77) weighting 200-250 g were purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada) and housed two per cage in a room under controlled temperature (23°C), humidity (50%) and lighting (12-hour light/dark

cycle) with food and water provided *ad libitum*. For the induction of diabetes, rats received a single i.p. injection of Streptozotocin (STZ, 65 mg/kg, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Age-matched controls were injected with vehicle (sterile saline 0.9%, pH. 7.4). Glucose concentrations were measured in blood samples obtained from the tail vein with a commercial blood glucose analyzer (Accusoft; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) 48 h following STZ injection. Only STZ-treated rats with blood glucose concentration higher than 20 mmol/L were considered as diabetic. Rats showing a normal glycemia after STZ injection were discarded. Glycemia was measured once a week and just before experimentation to confirm that STZ-treated rats were diabetic.

3.3.2 Measurement of B₁R expression in the retina of control and diabetic rats by Western blot analysis

An anti-B₁R antibody was raised in rabbits (Biotechnology Research Institute, Montreal, QC, Canada; <http://www.irb.cnrc.gc.ca>) against a conserved amino acid sequence from the B₁R protein of mouse and rat aligned using ClustalW software (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2>). The used epitope contained 15 amino acids (VFAGRLLKTRVLGTL) localized in the C-terminal part of the B₁R protein. Care was taken to avoid sequence regions containing significant similarities to related mammalian proteins, including B₂R. Two negative controls were run: first, the pre-immune serum was tested and second, B₁R antibodies were pre-absorbed with the peptide which served for immunization. The specificity of B₁R antibodies was further determined in knock-out mice tissues and the results showed the absence of B₁R protein in knock-out mouse and very low expression in wild type mouse (Lin, Talbot et al. 2010).

Control (n=8) and diabetic (n=8) rats were anaesthetised with pentobarbital (60 mg/kg, i.p.). The eyes were dissected out, the retinæ were isolated, immediately frozen in isopentane (-55°C) and stored at -80°C. The presence of B₁R in other ocular tissues was not assessed. Retinæ were homogenised in Phosphate Buffer Saline (PBS) containing a cocktail of proteases inhibitors (Sigma-Aldrich, Canada). The homogenates were then

centrifuged at 500 g for 5 min. Supernatants were recovered and protein concentration was determined by the BCA method (Thermo Scientific, USA), and Bovine Serum Albumin (BSA) was used as standard protein. Ten μg of total proteins were loaded in each well of 10% SDS-PAGE. The samples were electrophoresed and transferred onto nitrocellulose membranes. The efficiency of the overall procedure was monitored by Ponceau red staining. The membranes were blocked with a commercial blocking buffer from Thermo in PBS-T (Phosphate Buffer Saline -Tween 20, 0.1%), probed with the specific antibody at 1/1000 dilution followed by probing with an HRP (Horseradish Peroxidase)-linked goat anti-rabbit secondary antibody (Santa Cruz Biotech, CA, USA) at 1/25000 dilution. All incubations with antibodies were performed in the commercial blocking buffer. Membranes were rinsed adequately between every step with PBS-T and revealed using Enhanced Chemiluminescence Detection System (ECL) (Super-Signal[®], Thermo Scientific, Canada). Dynein was used as standard protein and revealed with mouse anti-dynein monoclonal antibody (Santa Cruz Biotech, CA, USA) at a 1:25000 dilution. HRP-linked goat anti-mouse (Santa Cruz Biotech, CA, USA) was used as secondary antibody at a 1:25000 dilution. A quantitative analysis of the protein was performed by densitometry using an MCID[™] image analysis system (Imaging Research, St. Catharines, ON, Canada).

3.3.3 Measurement of retinal and cerebral blood flow in diabetic rats by quantitative autoradiography

Changes of retinal and cerebral blood flow were measured at 4 days and 6 weeks after the induction of diabetes by quantitative autoradiography using the diffusible radioactive tracer N-isopropyl-p-¹⁴C-iodoamphetamine ([¹⁴C]-IMP) as previously described (Deschenes, Descovich et al. 2010); (Pouliot, Deschenes et al. 2009). Polyurethane catheters were inserted into the femoral vein (Micro-Renathane, I.D. 0.040", O.D. 0.020", Braintree Scientific, Braintree, MA, USA) and artery (Tygon Micro Bore, I.D. 0.010", O.D. 0.030", Small Parts, Miramar, FL, USA) under 1.5 % isoflurane (induction of anesthesia with 3% isoflurane for 5 min). During this procedure, body temperature was monitored

with a rectal thermometer and maintained at 37°C by a heating pad (FHC, Bowdoinham, ME). Before and immediately after the surgery, the topical anaesthetic lidocaine hydrochloride 2% (AstraZeneca, Mississauga, ON, Canada) was applied on the skin incision to minimize pain. Rats were then installed in a hammock and left under minimal restraint over a 2-h period to recover from anesthesia. Body temperature was maintained at 37°C with a heating lamp and both blood pressure and heart rate were monitored from the tail using a non-invasive blood pressure cuff system (BP1000, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA) until the measurement of the retinal and cerebral blood flow. Blood chemistry was measured with a veterinarian clinical blood gases and electrolytes analyzer (i-STAT[®], HESKA, Fort Collins, CO), from arterial blood samples collected via the arterial catheter.

For both duration of diabetes, rats were divided in 4 groups: control, control treated with the B₁R antagonist SSR240612, STZ-diabetic and STZ-diabetic treated with SSR240612. SSR240612 ((2*R*)-2-(((3*R*)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-{{(6-methoxynaphthyl) sulphonyl} amino}propanoyl)amino]-3-(4-{{(2*R*,6*S*)-2,6 dimethylpiperidinyl)methyl} phenyl)-*N*-isopropyl-*N*-methylpropanamidefumarate) (Sanofi-Aventis R&D, Montpellier, France) is an highly selective ligand for B₁R (Gougat, Ferrari et al. 2004). It was given by gavage (10 mg/kg) 3 h before the autoradiography. The dose of 10 mg/kg was found effective to block B₁R-mediated effects in several paradigms *in vivo* (Gougat, Ferrari et al. 2004); Dias, Ismael et al. 2007; Dias et al., 2010). SSR240612 was dissolved in a solution of dimethylsulphoxide (0.5%), ethanol (5%) and Tween-80 (5%) and the solution was completed with distilled water (vehicle) and administered in a volume of 1 ml by 100 g of body weight to control and STZ-diabetic rats. Untreated control and STZ-diabetic rats received the vehicle by gavage.

[¹⁴C]-IMP ((D,L)-*N*-Isopropyl-4-[¹⁴C]-iodo(phenyl)amphetamine, 100 μCi/kg; PerkinElmer, Boston, MA, USA, custom synthesis) was dissolved in 600μl of saline (injectable 0.9% NaCl solution) and infused in fully conscious rats over a 30s period at a constant rate of 1.2 ml/min using an infusion pump (PHD 2000, Harvard Apparatus,

Holliston, MA, USA) through the femoral vein. An average of 20-24 arterial blood samples (10 μ l) were collected continuously from the beginning of [14 C]-IMP injection to the sacrifice of the animal (2 min) in order to evaluate the arterial contamination curve. Blood samples were digested in 300 μ l of solouene (PerkinElmer, Boston, MA, USA) for 2 h at 37°C. A total of 5 ml of scintillation fluid (Ultimagold, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) was then added and the radioactivity was counted in a scintillation counter (LS6500, Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). The rats were sacrificed by decapitation 2 min after the beginning of the infusion. The eyes and brain were quickly removed within 3 min. A small incision on the superior eyelid was made to indicate the orientation of the eyes and the eyes together with the attached superior eyelid were then harvested. The eyes were immediately excised, the lens removed and the eye cup immersed in a solution of 4% paraformaldehyde for post-fixation. After a one h fixation, retinae were removed from the eye cup, and dissected into four quadrants (superior, inferior, nasal and temporal). The vitreous body was carefully removed from the retinae using fine paint brush. Retinae were whole-mounted on a glass slide with the ganglion cells layer away from the slide. A small incision was made on the retina to indicate the nasal quadrant. The whole-mount retina was then exposed to an X-ray film (Hyperfilm, GE Healthcare Ltd, UK) for 4 days together with a set of [14 C]-standards (ARC, St. Louis, USA). The autoradiograms were analyzed using the computerized image analysis MCID Basic Software (v7.0, Interfocus Imaging, Linton, UK). For the CBF quantification at 4 days of diabetes, the brain was frozen in isopentane (-55°C) and subsequently sliced in 20 μ m thick coronal sections using a cryostat (-22°C) for autoradiography. Slices were exposed on X-ray film for 8 days with [14 C]-standards (Amersham Biosciences, UK). For experiment at 6 weeks of diabetes, a piece of the frontal cerebral cortex was dissected, weighted and digested in solouene overnight at 37°C for liquid scintillation counting. Previous study showed that the values measured by the two methods of sampling are equivalent (Pouliot, Deschenes et al. 2009).

3.3.4 Calculation of retinal and cerebral blood flow

Retinal and cerebral blood flow was evaluated using the principle of indicator-fractionation technique (Lear, Ackermann et al. 1982; Greenberg, Sohn et al. 1999; Pouliot, Deschenes et al. 2009) using the equations Eq. 1 for digested cortex and autoradiographic analysis of CBF performed with 20 μm thick sections and Eq.2 for autoradiographic analysis performed on whole-mount retinae.

$$F = [C_{\text{IMP}}(T) / \int_0^T Ca(t)] \quad (\text{Eq. 1})$$

$$F = [C_{\text{IMP}}(T) \times 10^{-1} / \int_0^T Ca(t)] \quad (\text{Eq. 2})$$

where F is the blood flow (ml/100g/min), $C_{\text{IMP}}(T)$ is the radioactivity measured on the autoradiogram or digested tissue ($\mu\text{Ci/g}$) at the time T (min) of sacrifice and $Ca(t)$ is the arterial concentration of radioactivity measured in the blood samples ($\mu\text{Ci/ml}$). For autoradiographic measurements in the retina, $C_{\text{IMP}}(T)$ was read from circular regions of interest of 0.8 mm^2 (1 mm diameter) distributed at the 1, 2 and 3 mm isopters away from the center of the optic nerve head in all retinal quadrants (Pouliot, Deschenes et al. 2009). Since the common radioactive standards used for autoradiography are calibrated for 20 μm thick sections and the rat retina thickness is $205 \pm 11 \mu\text{m}$ (Duong, Pardue et al. 2008), the measured [^{14}C]-IMP concentration values from autoradiograms ($C_{\text{IMP}}(T)$) were uniformly corrected by a factor 10 (Pouliot, Deschenes et al. 2009). For the brain, 8 regions of interest (area adjusted to the region size, 2-9 mm^2) related to vision or in control areas were selected and analyzed at 3 coronal levels from Bregma: AP + 1.6 mm; cingulate, frontal cortex, striatum; AP -4.5 mm; parietal cortex, hippocampus, dorsolateral geniculate nucleus (DLG); AP -6.3mm; occipital cortex, superior colliculus.

3.3.5 Statistical analysis

Student's *t*-test on unpaired samples was used for comparison of B_1R expression in the retina of control and STZ-diabetic rats. One-way ANOVA and Bonferroni post-hoc

tests were performed for comparison between control group, control group treated with SSR240612, diabetic group and diabetic group treated with SSR240612 for each duration of diabetes separately (4 days and 6 weeks of diabetes) for (1) the physiological parameters, (2) the regional RBF in each isopter, (3) the CBF. A significance level of $p < 0.05$ was chosen.

3.4 Results

3.4.1 Physiological parameters

Glycemia was significantly increased in 4-day and 6-week diabetic rats compared to age-matched control rats ($p < 0.001$, Table 1). Treatment with SSR240612 had no effect on glycemia in both control and STZ-diabetic rats at both end points. All other physiological parameters were not changed in 4-day diabetic group treated or not with SSR240612 compared to the control group. Body temperature, blood pressure, heart rate, pH and pO_2 were not affected in 6-week diabetic rats treated or not with SSR240612 ($p > 0.05$, Table 1). However, body weight was significantly decreased in 6-week diabetic rats treated or not with SSR240612 compared to age-matched controls ($p < 0.01$, Table 1), which is commonly found in diabetic animals. pCO_2 and HCO_3^- were significantly decreased ($p < 0.01$) and hematocrit was significantly increased ($p = 0.02$), in 6-week diabetic rats not treated with SSR240612 compared to age-matched controls, which might indicate a slight acid-base imbalance which are often seen in diabetic animals. This deregulation of acid-base balance was not seen in SSR240612 treated animals ($p > 0.05$, Table 1), which needs further clarification.

3.4.2 Expression and vasoactive function of B_1R in the retina of diabetic rats

The level of B_1R protein measured by Western blotting was significantly increased in the retina of 4-day (326%, $p = 0.000$) and 6-week (237%, $p = 0.001$) diabetic rats compared to age-matched controls (Fig. 1).

3.4.3 Effect of B₁R antagonist SSR240612 on retinal blood flow measured by quantitative and regional autoradiography

RBF was not affected by hyperglycemia in 4-day diabetic rats compared to age-matched control rats for all the retina subregions measured ($p > 0.05$, Table 2, Fig. 2-3). B₁R antagonist SSR240612 treatment had no effect on RBF in control animals ($p > 0.05$, Table 2, Fig. 2-3) – the slight non-significant decrease of RBF may be attributed to a low level of B₁R expression in control animals – but significantly decreased RBF in 4-day diabetic rats compared to control rats at 2 mm isopter (21%, $p = 0.026$) and 3 mm isopter (26%, $p = 0.005$, Table 2, Fig.2-3).

In contrast, RBF was significantly decreased in 6-week diabetic rats compared to control rats at 1 mm isopter (29%, $p = 0.003$), 2 mm isopter (29%, $p = 0.006$) and 3 mm isopter (39%, $p = 0.001$). In the optic nerve region, RBF was also decreased by 29% but this was not statistically significant ($p = 0.171$). B₁R antagonist SSR240612 treatment significantly decreased RBF in 6-week diabetic rats compared to age-matched control rats at 1 mm isopter (24%, $p = 0.016$), 2 mm isopter (24%, $p = 0.034$) and 3 mm isopter (29%, $p = 0.012$). However, this decrease was not significant compared to 6-week diabetic rats not treated with SSR240612 (Table 2, Fig. 3).

3.4.4 Effect of B₁R antagonist SSR240612 on cerebral blood flow

Blood flow in frontal cortex was not altered in 4-day diabetic rats compared to controls and not changed by the B₁R antagonist treatment ($p > 0.05$, Table 2, Fig. 4). However, it was significantly reduced (32%) in comparison to age-matched controls in 6-week diabetic rats treated ($p = 0.012$, Table 2, Fig. 4) or not ($p = 0.014$, Table 2, Fig. 4) with SSR240612, as shown in the retina of diabetic rats. Treatment with SSR240612 had no effect on CBF in 6-week control rats ($p > 0.05$). There was no regional variation since cerebral blood flow measured by autoradiography in cingulate cortex, striatum, parietal cortex, hippocampus, DLG, occipital cortex, and superior colliculus was not altered by diabetes and B₁R antagonist treatment (data not shown).

3.5 Discussion

The results clearly show that kinin B₁R is upregulated in the STZ-rat retina up to 6 weeks following diabetes induction. The B₁R blockade reduced the RBF at 4 days but not at 6 weeks. These results suggest that the B₁R is tonically activated by endogenous kinins and contributes to prevent diabetes-induced reduction of retinal blood flow 4 days following STZ injection. This positive effect of kinins on retinal blood flow was not maintained 6 weeks following STZ injection.

3.5.1 Retinal blood flow in diabetic rats

Our results demonstrated that retinal blood flow was not altered in 4-day diabetic rats but was significantly decreased in 6-week diabetic rats compared with age-matched controls. This is the first study evaluating RBF in the early days of diabetes onset. Previous studies using fluorescein angiography reported decreased RBF in STZ-diabetic rats at one (Bursell, Clermont et al. 1992; Clermont, Brittis et al. 1994; Takagi, Bursell et al. 1996), 2 and 4 weeks (Higashi, Clermont et al. 1998) of diabetes, although some studies using microsphere technique or hydrogen clearance reported increased RBF in STZ-diabetic rats from 3 to 6 weeks after diabetes induction (Tilton, Chang et al. 1989; Pugliese, Tilton et al. 1990; Suter, Chang et al. 1992; Cringle, Yu et al. 1993). Our findings suggest a reduction of blood flow in the diabetic rat retina. Moreover, our results show that the deficit of blood flow is not a primary event since it is not present at the fourth day of diabetes induction. In diabetic patients, previous studies on retinal blood flow have also provided diverse results. Decreased retinal blood flow in diabetic patients with absent or mild diabetic retinopathy was reported (Feke, Buzney et al. 1994; Bursell, Clermont et al. 1996; Feng, Bursell et al. 2000) as well as a tendency to increased blood flow as retinopathy progresses (Clermont, Aiello et al. 1997). Other studies also reported increased blood flow in diabetic patients with no or mild diabetic retinopathy (Grunwald, DuPont et al. 1996). However, most of the studies agree that impairment of retinal blood flow occurs in the early steps of diabetic retinopathy progression and even prior to the development of clinical signs of the disease.

3.5.2 Effect of the selective B₁R antagonist SSR240612 on retinal blood flow

The principal series of results show that the B₁R in the retina of STZ-diabetic rat could be involved in blood flow regulation during diabetes in the presence of appropriate endogenous ligands. Accordingly, B₁R appeared to maintain the blood flow in the diabetic retina at 4 days but not at 6 weeks. The B₁R protein expression within the retina early on after diabetes induction (4 days) corroborates previous findings on B₁R binding sites (Abdouh, Khanjari et al. 2003), but its presence at 6 weeks after diabetes onset is shown here for the first time. B₁R being indicative of inflammatory or oxidative processes, this data suggests that the retina undergoes a stress from the beginning of the hyperglycemia, which persists as long as hyperglycemia was maintained. The cumulative effect of this process would most likely damage the retina. Previous *in vitro* study showed selective and dose-dependent vasodilation of retinal vessels in isolated retina of STZ-diabetic rats in the presence of selective B₁R agonists; a response that involved intracellular calcium mobilization, release of nitric oxide and prostaglandins in endothelial cells (Abdouh, Khanjari et al. 2003). Thus, the B₁R seems to have a direct action on blood vessel endothelium. The effect of B₁R is most likely directly related to hyperglycemia and is not due inflammation caused by STZ since it has already been shown that retinal vessels from 4-day STZ-rats that failed to develop hyperglycemia do not dilate in response to B₁R agonist (Abdouh et al., 2003). As RBF was slightly but not significantly decreased in 4-day diabetic rats without SSR240612 treatment but was strongly decreased with SSR240612 treatment, this suggests that endogenous kinins may act on B₁R to induce vasodilation and maintain a normal blood flow in the diabetic retina. This suggests a protective role for B₁R on the retinal circulation at the very early stage of diabetes.

The positive effect of B₁R on retinal perfusion that was present in 4-day diabetic rats was not preserved 6 weeks following diabetes induction since B₁R blockade did not alter the blood flow level compared to diabetic rats without SSR240612 treatment. The decrease of blood flow in diabetic animals as well as the absence of a physiological

response to the B₁R antagonist is indicative of either an absence of endogenous kinins that could activate B₁R or the presence of other vasoactive substances that could contribute to regulation of blood flow. The unbalance between vasoconstrictors and vasodilators molecules in the diabetic retina is a major cause of RBF alteration. Vasoactive molecules such as Endothelin-1 (ET-1) and Angiotensin-II (Ang-II) are known to be expressed in the retina and contribute to retinal vasoconstriction and reduction of RBF in diabetic rats (Bursell, Clermont et al. 1995; Horio, Clermont et al. 2004). The modulation of RBF by vasoconstrictive molecules could therefore partially mask the vasodilatory effect of B₁R at 6 weeks of diabetes. On the other hand, the vasodilatory effect of B₁R could be altered because of an endothelial dysfunction and decreased NO-mediated response in 6-week diabetic rats, since B₁R is known to cause vasodilation of retinal vessels via an endothelium-dependent mechanism (Abdouh et al., 2003). In the retina and many vascular beds, endothelium-dependent vasodilation was found to be diminished in diabetes (Oyama, Kawasaki et al. 1986; Taylor, McCarthy et al. 1992; Schmetterer, Findl et al. 1997; De Vriese, Verbeuren et al. 2000; Edgley, Tare et al. 2008; Tabit, Chung et al. 2010).

3.5.3 Effect of the selective B₁R antagonist SSR240612 on cerebral blood flow in diabetic rats

Our results show that blood flow in frontal cortex was not altered 4 days after diabetes induction but was strongly reduced at 6 weeks. Previous studies have also reported decreased blood flow in cortex in diabetic rats 2 to 5 weeks post-STZ injection using *n*-[¹⁴C]butanol (Harik and LaManna 1988) and [¹⁴C]-iodoantipyrine (Duckrow, Beard et al. 1987). A reduction of blood flow was also reported at 16 and 20 weeks following diabetes induction (Knudsen, Gobel et al. 1991; Manschot, Biessels et al. 2003). However, some studies reported normal (Granstam and Granstam 2003) and increased blood flow (Sutera, Chang et al. 1992) in the brain of STZ-diabetic rats. In diabetic rats, changes of blood flow in frontal cortex were similar to changes of retinal blood flow since blood flow was not changed at 4 days but significantly decreased at 6 weeks in both organs. This suggests that the diabetes has a tendency to induce a general deficit in blood flow to the same extent in

the retina and frontal cortex. However, B₁R antagonist in 4-day diabetic rats induced a strong decrease of blood flow in the retina, whereas it had no effect on blood flow in frontal cortex. These results suggest that B₁R, which is overexpressed in the cortex of diabetic rats as early as 4 days after diabetes induction (Campos, Ongali et al. 2005) does not exert the same protective effect on cortical blood flow as seen in the retina. This may reflect the lower level of endogenous kinins or B₁R in the brain compared to retina. This could be related to the stronger reactivity of the retina to oxidative stress compared to the brain (Grammas and Riden 2003).

3.6 Conclusion

In summary, our results demonstrated that B₁R is overexpressed in the diabetic rat retina and exerts a protective effect to reduce RBF deficit in 4-day diabetic rats but is not involved in the RBF reduction present at 6 weeks of diabetes. Its involvement in other aspects of diabetic retina damage deserves further investigation.

3.7 Acknowledgements

The authors would like to thank Florence Dotigny for her technical assistance and Denis Latendresse for the artwork. This study was supported by the Canadian Foundation for Innovation, the Vision Research Network (FRSQ) and “Le Fonds de la Recherche en Ophtalmologie de l’Université de Montréal”. MP and SH are recipients of a Studentship from the Foundation Fighting Blindness (Canada) and the Vision Research Network (FRSQ), respectively.

3.8 References

- Abdouh, M., Khanjari, A., Abdelazziz, N., Ongali, B., Couture, R., Hassessian, H.M., 2003. Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br. J. Pharmacol.* 140, 33-40.
- Abdouh, M., Talbot, S., Couture, R., 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.
- Ahluwalia, A., Perretti, M., 1999. B1 receptors as a new inflammatory target. Could this be the 1? *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 100-104.
- Alder, V.A., Su, E.N., Yu, D.Y., Cringle, S., Yu, P., 1998. Overview of studies on metabolic and vascular regulatory changes in early diabetic retinopathy. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* 26, 141-148.
- Bader, M., Bohnemeier, H., Zollmann, F.S., Lockley-Jones, O.E., Ganten, D., 2000. Transgenic animals in cardiovascular disease research. *Exp. Physiol.* 85, 713-731.
- Buleon, M., Allard, J., Jaafar, A., Praddaude, F., Dickson, Z., Ranera, M.T., Pecher, C., Girolami, J.P., Tack, I., 2008. Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294, F1249-1256.
- Bursell, S.E., Clermont, A.C., Kinsley, B.T., Simonson, D.C., Aiello, L.M., Wolpert, H.A., 1996. Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 886-897.
- Bursell, S.E., Clermont, A.C., Oren, B., King, G.L., 1995. The in vivo effect of endothelins on retinal circulation in nondiabetic and diabetic rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36, 596-607.
- Bursell, S.E., Clermont, A.C., Shiba, T., King, G.L., 1992. Evaluating retinal circulation using video fluorescein angiography in control and diabetic rats. *Curr. Eye Res.* 11, 287-295.

- Campos, M.M., Ongali, B., De Souza Buck, H., Schanstra, J.P., Girolami, J.P., Chabot, J.G., 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, 29-37.
- Clermont, A.C., Aiello, L.P., Mori, F., Aiello, L.M., Bursell, S.E., 1997. Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for vascular endothelial growth factor in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.* 124, 433-446.
- Clermont, A.C., Brittis, M., Shiba, T., McGovern, T., King, G.L., Bursell, S.E., 1994. Normalization of retinal blood flow in diabetic rats with primary intervention using insulin pumps. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 981-990.
- Clermont, A.C., Bursell, S.E., 2007. Retinal blood flow in diabetes. *Microcirculation* 14, 49-61.
- Couture, R., Girolami, J.P., 2004. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 467-485.
- Couture, R., Harrisson, M., Vianna, R.M., Cloutier, F., 2001. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 161-176.
- Cringle, S.J., Yu, D.Y., Alder, V.A., Su, E.N., 1993. Retinal blood flow by hydrogen clearance polarography in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 1716-1721.
- De Vriese, A.S., Verbeuren, T.J., Van de Voorde, J., Lameire, N.H., Vanhoutte, P.M., 2000. Endothelial dysfunction in diabetes. *Br. J. Pharmacol.* 130, 963-974.
- Deschenes, M.C., Descovich, D., Moreau, M., Granger, L., Kuchel, G.A., Mikkola, T.S., Fick, G.H., Chemtob, S., Vaucher, E., Lesk, M.R., 2010. Postmenopausal hormone therapy increases retinal blood flow and protects the retinal nerve fiber layer. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51, 2587-2600.

- Dias, J.P., Ismael, M.A., Pilon, M., de Champlain, J., Ferrari, B., Carayon, P., Couture, R., 2007. The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br. J. Pharmacol.* 152, 280-287.
- Dias, J.P., Talbot, S., Sénécal, J., Carayon, P., Couture, R., 2010. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One.* 5, 1-14.
- Duckrow, R.B., Beard, D.C., Brennan, R.W., 1987. Regional cerebral blood flow decreases during chronic and acute hyperglycemia. *Stroke* 18, 52-58.
- Duong, T.Q., Pardue, M.T., Thule, P.M., Olson, D.E., Cheng, H., Nair, G., Li, Y., Kim, M., Zhang, X., Shen, Q., 2008. Layer-specific anatomical, physiological and functional MRI of the retina. *NMR Biomed.* 21, 978-996.
- Edgley, A.J., Tare, M., Evans, R.G., Skordilis, C., Parkington, H.C., 2008. In vivo regulation of endothelium-dependent vasodilation in the rat renal circulation and the effect of streptozotocin-induced diabetes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R829-839.
- Feke, G.T., Buzney, S.M., Ogasawara, H., Fujio, N., Goger, D.G., Spack, N.P., Gabbay, K.H., 1994. Retinal circulatory abnormalities in type 1 diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35, 2968-2975.
- Feng, D., Bursell, S.E., Clermont, A.C., Lipinska, I., Aiello, L.P., Laffel, L., King, G.L., Tofler, G.H., 2000. von Willebrand factor and retinal circulation in early-stage retinopathy of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 23, 1694-1698.
- Frank, R.N., 2004. Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 350, 48-58.
- Gabra, B.H., Benrezzak, O., Pheng, L.H., Duta, D., Daull, P., Sirois, P., Nantel, F., Battistini, B., 2005. Inhibition of type 1 diabetic hyperalgesia in streptozotocin-induced Wistar versus spontaneous gene-prone BB/Worcester rats: efficacy of a selective bradykinin B1 receptor antagonist. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64, 782-789.

- Gougat, J., Ferrari, B., Sarran, L., Planchenault, C., Poncelet, M., Maruani, J., Alonso, R., Cudennec, A., Croci, T., Guagnini, F., Urban-Szabo, K., Martinolle, J.P., Soubrie, P., Finance, O., Le Fur, G., 2004. SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl)amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6dimethylpiperidiny]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 661-669.
- Grammas, P., Riden, M., 2003. Retinal endothelial cells are more susceptible to oxidative stress and increased permeability than brain-derived endothelial cells. *Microvasc. Res.* 65, 18-23.
- Granstam, E., Granstam, S.O., 2003. Involvement of nitric oxide in the regulation of regional hemodynamics in streptozotocin-diabetic rats. *Physiol. Res.* 52, 159-169.
- Greenberg, J.H., Sohn, N.W., Hand, P.J., 1999. Nitric oxide and the cerebral-blood-flow response to somatosensory activation following deafferentation. *Exp. Brain Res.* 129, 541-550.
- Grunwald, J.E., DuPont, J., Riva, C.E., 1996. Retinal haemodynamics in patients with early diabetes mellitus. *Br. J. Ophthalmol.* 80, 327-331.
- Harik, S.I., LaManna, J.C., 1988. Vascular perfusion and blood-brain glucose transport in acute and chronic hyperglycemia. *J. Neurochem.* 51, 1924-1929.
- Higashi, S., Clermont, A.C., Dhir, V., Bursell, S.E., 1998. Reversibility of retinal flow abnormalities is disease-duration dependent in diabetic rats. *Diabetes* 47, 653-659.
- Horio, N., Clermont, A.C., Abiko, A., Abiko, T., Shoelson, B.D., Bursell, S.E., Feener, E.P., 2004. Angiotensin AT(1) receptor antagonism normalizes retinal blood flow and acetylcholine-induced vasodilatation in normotensive diabetic rats. *Diabetologia* 47, 113-123.
- Kawagishi, T., Nishizawa, Y., Emoto, M., Konishi, T., Maekawa, K., Hagiwara, S., Okuno, Y., Inada, H., Isshiki, G., Morii, H., 1995. Impaired retinal artery blood flow in

- IDDM patients before clinical manifestations of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 18, 1544-1549.
- Knudsen, G.M., Gobel, U., Paulson, O.B., Kuschinsky, W., 1991. Regional density of perfused capillaries and cerebral blood flow in untreated short-term and long-term streptozotocin diabetes. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11, 361-365.
- Kocharyan, A., Fernandes, P., Tong, X.K., Vaucher, E., Hamel, E., 2008. Specific subtypes of cortical GABA interneurons contribute to the neurovascular coupling response to basal forebrain stimulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28, 221-231.
- Kuznetsova, T.P., Chesnokova, N.B., Paskhina, T.S., 1991. [Activity of tissue and plasma kallikrein and level of their precursors in eye tissue structures and media of healthy rabbits]. *Vopr. Med. Khim.* 37, 79-82.
- Lawson, S.R., Gabra, B.H., Nantel, F., Battistini, B., Sirois, P., 2005. Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: distinct vasculopathic profile of major key organs. *Eur. J. Pharmacol.* 514, 69-78.
- Lear, J.L., Ackermann, R.F., Kameyama, M., Kuhl, D.E., 1982. Evaluation of [¹²³I]isopropylidoamphetamine as a tracer for local cerebral blood flow using direct autoradiographic comparison. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2, 179-185.
- Leeb-Lundberg, L.M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D.J., 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.
- Lim, S.K., Park, M.J., Jung, H.K., Park, A.Y., Kim, D.I., Kim, J.C., Bae, C.S., Kim, K.Y., Yoon, K.C., Han, H.J., Park, S.H., 2008. Bradykinin stimulates glutamate uptake via both B1R and B2R activation in a human retinal pigment epithelial cells. *Life Sci.* 83, 761-770.
- Lin, J.C., Talbot, S., Lahjouji, K., Roy, J.P., Senecal, J., Couture, R., Morin, A., 2010. Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways. *Peptides* 31, 1940-1945.

- Ma, J.X., Song, Q., Hatcher, H.C., Crouch, R.K., Chao, L., Chao, J., 1996. Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Exp. Eye Res.* 63, 19-26.
- Manschot, S.M., Biessels, G.J., Cameron, N.E., Cotter, M.A., Kamal, A., Kappelle, L.J., Gispen, W.H., 2003. Angiotensin converting enzyme inhibition partially prevents deficits in water maze performance, hippocampal synaptic plasticity and cerebral blood flow in streptozotocin-diabetic rats. *Brain Res.* 966, 274-282.
- Marceau, F., 1995. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* 30, 1-26.
- Marceau, F., Hess, J.F., Bachvarov, D.R., 1998. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 50, 357-386.
- Marceau, F., Larrivee, J.F., Saint-Jacques, E., Bachvarov, D.R., 1997. The kinin B1 receptor: an inducible G protein coupled receptor. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 75, 725-730.
- McLean, P.G., Perretti, M., Ahluwalia, A., 1999. Inducible expression of the kinin B1 receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg⁹bradykinin-induced coronary vasodilation. *Br. J. Pharmacol.* 128, 275-282.
- Oyama, Y., Kawasaki, H., Hattori, Y., Kanno, M., 1986. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. *Eur. J. Pharmacol.* 132, 75-78.
- Pemp, B., Polska, E., Garhofer, G., Bayerle-Eder, M., Kautzky-Willer, A., Schmetterer, L., 2010. Retinal blood flow in type 1 diabetic patients with no or mild diabetic retinopathy during euglycemic clamp. *Diabetes Care* 33, 2038-2042.
- Phipps, J.A., Feener, E.P., 2008. The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy: lessons for the kidney. *Kidney Int.* 73, 1114-1119.
- Pouliot, M., Deschenes, M.C., Hetu, S., Chemtob, S., Lesk, M.R., Couture, R., Vaucher, E., 2009. Quantitative and regional measurement of retinal blood flow in rats using N-isopropyl-p-[¹⁴C]-iodoamphetamine ([¹⁴C]-IMP). *Exp. Eye Res.* 89, 960-966.
- Pugliese, G., Tilton, R.G., Speedy, A., Santarelli, E., Eades, D.M., Province, M.A., Kilo, C., Sherman, W.R., Williamson, J.R., 1990. Modulation of hemodynamic and

- vascular filtration changes in diabetic rats by dietary myo-inositol. *Diabetes* 39, 312-322.
- Regoli, D., Barabe, J., 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32, 1-46.
- Regoli, D., Nsa Allogho, S., Rizzi, A., Gobeil, F.J., 1998. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 348, 1-10.
- Rodi, D., Couture, R., Ongali, B., Simonato, M., 2005. Targeting kinin receptors for the treatment of neurological diseases. *Curr. Pharm. Des.* 11, 1313-1326.
- Schmetterer, L., Findl, O., Fasching, P., Ferber, W., Strenn, K., Breiteneder, H., Adam, H., Eichler, H.G., Wolzt, M., 1997. Nitric oxide and ocular blood flow in patients with IDDM. *Diabetes* 46, 653-658.
- Sutera, S.P., Chang, K., Marvel, J., Williamson, J.R., 1992. Concurrent increases in regional hematocrit and blood flow in diabetic rats: prevention by sorbinil. *Am. J. Physiol.* 263, H945-950.
- Tabit, C.E., Chung, W.B., Hamburg, N.M., Vita, J.A., 2010. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 11, 61-74.
- Takagi, C., Bursell, S.E., Lin, Y.W., Takagi, H., Duh, E., Jiang, Z., Clermont, A.C., King, G.L., 1996. Regulation of retinal hemodynamics in diabetic rats by increased expression and action of endothelin-1. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2504-2518.
- Takeda, H., Kimura, Y., Higashida, H., Yokoyama, S., 1999. Localization of B2 bradykinin receptor mRNA in the rat retina and sclerocornea. *Immunopharmacology* 45, 51-55.
- Taylor, P.D., McCarthy, A.L., Thomas, C.R., Poston, L., 1992. Endothelium-dependent relaxation and noradrenaline sensitivity in mesenteric resistance arteries of streptozotocin-induced diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.* 107, 393-399.
- Tilton, R.G., Chang, K., Pugliese, G., Eades, D.M., Province, M.A., Sherman, W.R., Kilo, C., Williamson, J.R., 1989. Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors. *Diabetes* 38, 1258-1270.

- Vaucher, E., Borredon, J., Bonvento, G., Seylaz, J., Lacombe, P., 1997. Autoradiographic evidence for flow-metabolism uncoupling during stimulation of the nucleus basalis of Meynert in the conscious rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 686-694.
- Westermann, D., Walther, T., Savvatis, K., Escher, F., Sobirey, M., Riad, A., Bader, M., Schultheiss, H.P., Tschöpe, C., 2009. Gene deletion of the kinin receptor B1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 58, 1373-1381.
- Wilkinson-Berka, J.L., 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.

3.9 Figures

Figure 3.1: Protein expression of B₁R in the retina of diabetic rats measured by Western blot. B₁R was upregulated in the retina at 4 days (A) and 6 weeks (B) after the induction of diabetes. ***p < 0.001, significantly different from control group.

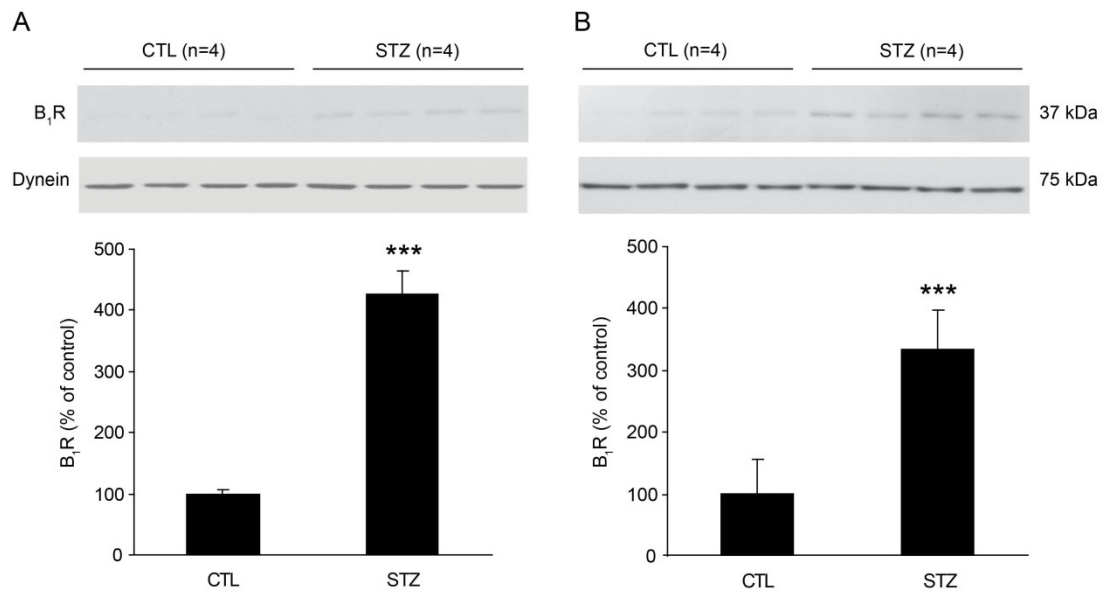


Figure 3.2: Representative whole-mount retina autoradiograms displayed in pseudocolor from a control rat treated with vehicle, a control rat treated with the selective B₁R antagonist SSR240612, a STZ-diabetic rat treated with vehicle and a STZ-diabetic rat treated with SSR240612 at 4 days (A) and 6 weeks (B) after diabetes induction. The correspondence between pseudocolor and blood flow values (ml/100g/min) is represented on the scale on the right side of the figure.

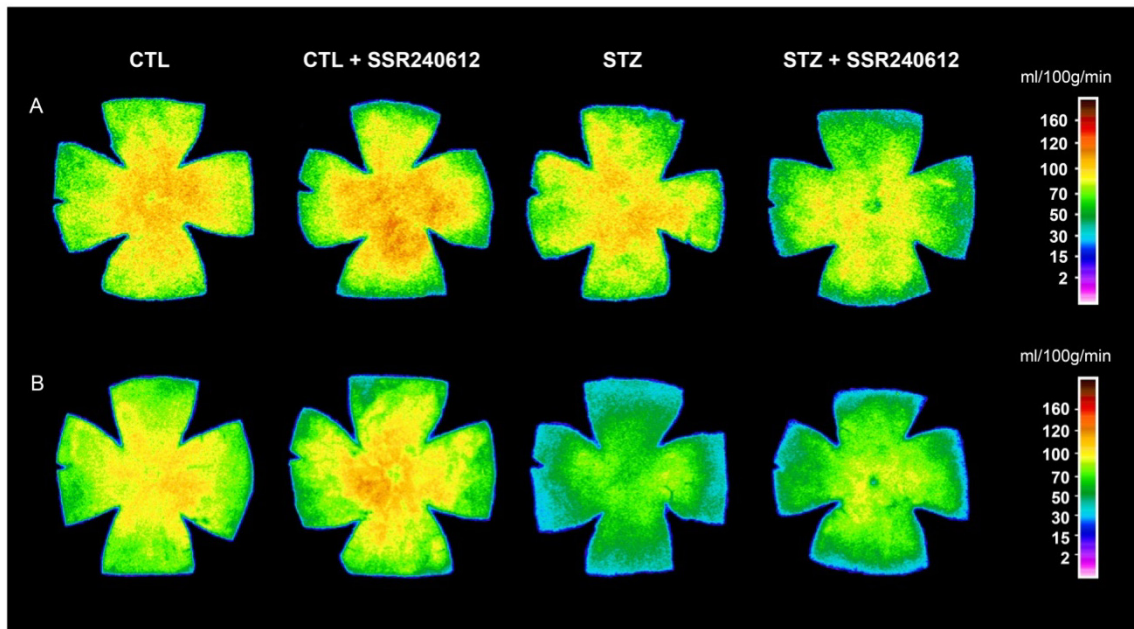


Figure 3.3: Effect of the treatment with the selective B₁R antagonist SSR240612 on retinal blood flow. Percent change (versus control) of retinal blood flow were measured in diabetic rats treated with the selective B₁R antagonist SSR240612 (STZ+SSR) or vehicle (STZ) at 4 days (A) and 6 weeks (B) after diabetes induction and compared with aged matched sham animals (CTL and CTL+SSR). Regional blood flow was measured on each isopter by autoradiography. *p < 0.05, significantly different from control group.

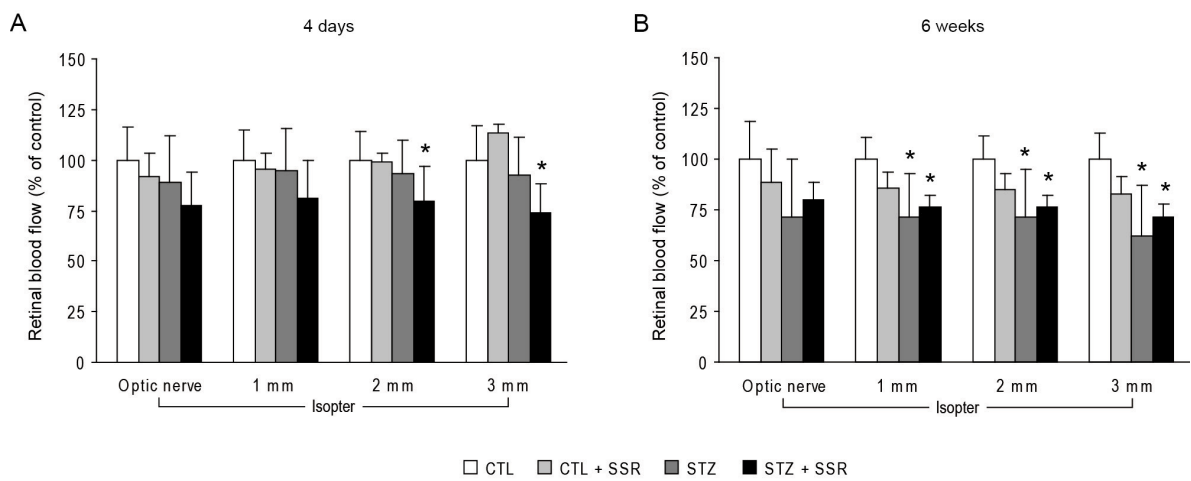


Figure 3.4: Effect of the treatment with the selective B₁R antagonist SSR240612 on retinal blood flow. Percent change (versus control) of cerebral blood flow was measured in control and diabetic rats treated with B₁R antagonist SSR240612 compared with CTL and STZ groups treated with vehicle only. The blood flow was measured in frontal cortex 4 days and 6 weeks after diabetes induction. * $p < 0.05$, significantly different from control group.

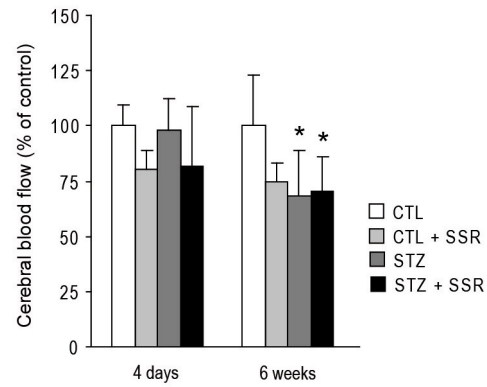


Table 3.1: Effect of diabetes and B₁R antagonist SSR240612 on the physiological parameters monitored in the conscious rats after two hours of recovery from anaesthesia and prior to the injection of [¹⁴C]-IMP.

	4 days				6 weeks			
	CTL (n=12)	CTL+SSR (n=6)	STZ (n=8)	STZ+SSR (n=8)	CTL (n=7)	CTL+SSR (n=6)	STZ (n=7)	STZ+SSR (n=7)
Body weight (g)	257±17	260±29	239±26	255±17	419±31	472±28	319±71*	314±65**
Glycemia (mmol/L)	6±1	7±1	26±5***	29±5***	7±2	7±2	31±4***	31±5***
Body temperature (°C)	37.5±0.3	37.8±0.3	37.2±0.3	37.4±0.3	37.9±0.4	37.7±0.4	37.5±0.3	37.7±0.3
Mean blood pressure (mmHg)	116±13	120±5	126±10	126±11	119±15	117±10	122±9	127±12
Heart Rate (Beats/min)	503±52	475±33	459±56	497±35	419±52	528±134	469±130	473±84
Arterial pH	7.45±0.01	7.45±0.02	7.45±0.03	7.45±0.02	7.47±0.02	7.45±0.01	7.42±0.05	7.45±0.04
Arterial pO ₂ (mmHg)	86±4	85±3	85±5	82±2	86±4	85±6	87±6	87±4
Arterial pCO ₂ (mmHg)	38±2	38±3	38±1	39±2	39±1	40±2	33±5**	39±2
Arterial HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	26±1	26±1	26±2	27±1	28±2	27±1	21±4**	27±3
Hematocrit (% PVC)	40±4	39±2	41±2	42±1	44±2	45±3	50±6*	48±2

Values are means ± SD. The selective B₁R antagonist SSR240612 was administered in the CTL+SSR and STZ+SSR groups. The vehicle only was administered in CTL and STZ groups. pO₂, pCO₂, partial gas pressure of oxygen and carbon dioxide, respectively; HCO₃⁻, bicarbonate; CTL, control group; STZ, diabetic group; SSR, SSR240612. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared with control group.

Chapitre 4 : Troisième article

PLoS One, 2012;7(3):e33864

Ocular application of the kinin B₁ receptor antagonist LF22-0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats

Mylène Pouliot^{1,2}, Sébastien Talbot², Jacques Sénécal², Florence Dotigny¹, Elvire Vaucher¹ and Réjean Couture^{2*}

¹École d'optométrie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

² Département de Physiologie, Université de Montréal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

*Corresponding author: Réjean Couture Ph.D.

4.1 Abstract

Purpose: Kinin B₁ receptor (B₁R) is upregulated in retina of Streptozotocin (STZ)-diabetic rats and contributes to vasodilation of retinal microvessels and breakdown of the blood-retinal barrier. Systemic treatment with B₁R antagonists reversed the increased retinal plasma extravasation in STZ rats. The present study aims at determining whether ocular application of a water soluble B₁R antagonist could reverse diabetes-induced retinal inflammation and oxidative stress. *Methods:* Wistar rats were made diabetic with STZ (65 mg/kg, i.p.) and 7 days later, they received one eye drop application of LF22-0542 (1% in saline) twice a day for a 7 day-period. The impact was determined on retinal vascular permeability (Evans blue exudation), leukostasis (leukocyte infiltration using Fluorescein-isothiocyanate (FITC)-coupled Concanavalin A lectin), retinal mRNA levels (by qRT-PCR) of inflammatory (B₁R, iNOS, COX-2, ICAM-1, VEGF-A, VEGF receptor type 2, IL-1 β and HIF-1 α) and anti-inflammatory (B₂R, eNOS) markers and retinal level of superoxide anion (dihydroethidium staining). *Results:* Retinal plasma extravasation, leukostasis and mRNA levels of B₁R, iNOS, COX-2, VEGF receptor type 2, IL-1 β and HIF-1 α were significantly increased in diabetic retinae compared to control rats. All these abnormalities were reversed to control values in diabetic rats treated with LF22-0542. B₁R antagonist also significantly inhibited the increased production of superoxide anion in diabetic retinae. *Conclusion:* B₁R displays a pathological role in the early stage of diabetes by increasing oxidative stress and pro-inflammatory mediators involved in retinal vascular alterations. Hence, topical application of kinin B₁R antagonist appears a highly promising novel approach for the treatment of diabetic retinopathy.

Keywords: B₁ receptor, diabetes, inflammation, kinins, leukostasis, oxidative stress, retina, vascular permeability.

4.2 Introduction

Recent findings suggest a role for the kallikrein-kinin system in the development of diabetic retinopathy [1], [2], [3]. Kinins are important inflammatory mediators involved in tissue edema, leukocytes infiltration, vasodilation and regulation of local blood flow [4]. These peptides are produced at the site of inflammation and exert their effects through the activation of two G-protein-coupled receptors named B₁ (B₁R) and B₂ (B₂R) [5], [6]. B₂R is constitutively expressed and mediates mainly the acute effects of kinins due to its rapid desensitization. In contrast, B₁R is expressed at very low levels in physiological conditions. This inducible receptor is upregulated in response to tissue injury, by pro-inflammatory cytokines or by the oxidative stress associated to hyperglycemia. The B₁R is involved in the chronic phase of the inflammatory response which is compatible with its low desensitization mechanism [7], [8], [9]. Bradykinin (BK) and kallidin (KD) mediate the action of B₂R while their kininase I metabolites des-Arg⁹-BK and des-Arg¹⁰-KD are the preferential agonists for B₁R [7], [8]. The activation of these receptors induces the release of nitric oxide (NO), prostaglandins and pro-inflammatory cytokines [4], [10], [11].

Most components of the kallikrein-kinin system have been identified in the human, rabbit and rat retina [12], [13], [14], [15]. Particularly, B₁R was found overexpressed in the retina of Streptozotocin (STZ)-diabetic rats through a mechanism involving oxidative stress [16], [17]. In STZ-diabetic rats, B₁R mediates vasodilation of *ex vivo* retinal microvessels [16] and contributes to the breakdown of the blood-retinal barrier *in vivo* [17]. Collectively, these results suggest a pathological role for B₁R in the development of retinal damage in diabetes and the progression of diabetic retinopathy.

Diabetic retinopathy is characterized by vascular alterations including retinal blood flow changes, endothelial cells dysfunction, breakdown of the blood-retinal barrier, ischemia and neovascularisation [18]. Oxidative stress and inflammatory processes are thought to contribute largely to the development of the disease [19], [20], [21]. Hyperglycemia induces the production of reactive oxygen species (ROS) and the

expression of many pro-inflammatory factors in the diabetic retina including inducible nitric oxide synthase (iNOS), interleukin-1 β (IL-1 β), cyclooxygenase-2 (COX-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) [20]. Vasodilation, increased vascular permeability and adhesion of inflammatory cells to the vascular wall are also part of the inflammatory response occurring in the retina during diabetes [22], [23], [24].

The present study aims at determining whether topical ocular application of LF22-0542, a non-peptide water soluble B₁R antagonist, could reverse diabetes-induced retinal inflammation and oxidative stress. Our data show that the enhanced retinal vascular permeability, leukostasis, the enhanced expression of several inflammatory mediators and higher production of superoxide anion levels were significantly decreased in the retina of STZ-diabetic rats treated with LF22-0542. This provides the first demonstration that ocular application of a kinin B₁R antagonist could be an effective strategy in the treatment of diabetic retinopathy.

4.3 Materials and methods

4.3.1 STZ-diabetic rats

All experimental methods and animal care procedures were approved by the animal care committee of the Université de Montréal (protocol 09-030), in accordance with the Canadian Council on Animal Care. Male Wistar rats weighting 200–250 g were purchased from Charles River (St-Constant, QC, Canada) and housed two per cage in a room under controlled temperature (23°C), humidity (50%) and lighting (12-hour light/dark cycle) with food and water provided *ad libitum*. Rats were rendered diabetic by a single i.p. injection of Streptozotocin (STZ, Zanosar 65 mg/kg, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Age-matched control rats were injected with vehicle (sterile saline 0.9%, pH. 7.4). Glucose concentrations were measured in blood samples obtained from the tail vein with a commercial blood glucose analyzer (Accusoft; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Only STZ-treated rats with blood glucose concentration higher than 20 mmol/L were considered as diabetic and included in the study. Glycemia and body weight were recorded twice a week and on the day of the experiment.

4.3.2 Topical ocular treatment with B₁R antagonist LF22-0542

Seven days after diabetes induction, rats were treated twice a day (8:30 AM and 5:30 PM) with one eye drop application of the water soluble B₁R antagonist LF22-0542 (1% in saline) for a 7-day period. LF22-0542 (*N*-[[4-(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[4-methoxy-2,6 dimethylphenyl)sulfonyl]methylamino]ethoxy]-*N*-methyl-acetamide, fumarate) is a competitive non-peptide B₁R antagonist which was synthesized and provided by Fovea Pharmaceuticals SA, Paris, France. The chemical structure of LF22-0542 is presented in Figure 1. LF22-0542 showed high affinity for human and mouse B₁R with virtually no affinity for the human B₂R; a selectivity index of at least 4000 times was obtained when LF22-0542 was profiled throughout binding or cell biology assays on 64 other G-protein-coupled receptor, 10 ion channels, and seven enzymes

[25]. LF22-0542 blocked pain behavior in various inflammatory and neuropathic pain models in rats and mice and was found inactive in B₁R knockout mice models of inflammatory pain [25], [26], [27]. Fresh solution was prepared daily by dissolving the compound in saline 0.9% and sterilizing the solution by filtration (0.20 µm mesh). For ocular instillation, rats were firmly maintained and a drop of solution (10 µl) was instilled on the surface of the eye using a micropipette. Animals were maintained 10 s in order to make sure that the drop effectively remained on the surface of the eye. Every day, the rats were visually inspected to detect the presence of ocular irritation such as redness, porphyrin secretion or corneal opacity. All end points were determined on the last day of treatment.

4.3.3 Measurement of retinal vascular permeability

Retinal vascular permeability was assessed using Evans blue dye extravasation technique as previously described [17]. Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) and a catheter (Micro-Renathane, I.D. 0.040", O.D. 0.020", Braintree Scientific, Braintree, MA, USA) was inserted into the right femoral vein. Evans blue dye (45 mg/ml in saline) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was injected i.v. over 10 s. The dye was allowed to circulate for 2 h and then saline (25 ml) was infused through the left ventricle, to wash out intravascular dye. Following enucleation, retinæ were dissected out and immediately weighed. Evans blue dye was then 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, USA) at 620 nm (excitation) and 680 nm (emission).

4.3.4 Measurement of retinal leukostasis

Rats were anesthetized with isoflurane, the chest cavity was opened and a 16G cannula was inserted into the left heart ventricle. Rats were perfused with phosphate buffer saline (PBS) over 1 min (35 ml/min) to eliminate erythrocytes and non-adherent leukocytes. Fluorescein-isothiocyanate(FITC)-coupled Concanavalin A lectin (20 µg/ml in PBS, 5 mg/kg; Vector Labs, Burlington, ON, Canada) was infused at 30 ml/min to label

adherent leukocytes and vascular endothelial cells. Rats were perfused with 4% paraformaldehyde over 4 min followed by 1% Albumin in PBS over 1 min and PBS over 2 min (35 ml/min). Retinae were dissected out, flat mounted on a glass slide and imaged using a fluorescence microscope (Leica microsystems Co., Germany). The total number of leukocytes in each retina was determined under microscope examination at 40X.

4.3.5 Measurement of retinal inflammatory mediators by quantitative RT-PCR

Rats were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) and the eyes were dissected out. The retinae were isolated and put in RNA*later* stabilization reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Total RNA was extracted from retinae using a commercial kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA). 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, USA) was performed as previously described [17]. 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [28].

4.3.6 Measurement of superoxide anion production in the retina

Rats were sacrificed with CO₂ inhalation and the eyes were dissected out, frozen in isopentane (-55°C), cut into 20- μ m thick sections and placed on glass slides. Superoxide anion (O₂^{•-}) production was measured in retina using the oxidative fluorescent dye dihydroethidium (DHE) as described earlier [29]. Cells are permeable to hydroethidine and,

in the presence of $O_2^{\bullet-}$, it is oxidized to fluorescent ethidium bromide (EtBr) which is trapped by intercalation with DNA. EtBr is excited at 518 nm with an emission spectrum of 605 nm. Dihydroethidium (2 μ M) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was applied to 20- μ m thick eye sections and the slides were then incubated in a light-protected humidified chamber at 37°C for 30 min. Nuclei of retinal cells were stained with TO-PRO-3 (Molecular Probes, Eugene, Ore, USA). Images were obtained with a Leica TCS SP confocal microscope equipped with an argon laser (Leica microsystems Co., Germany). Tissues from each experimental group were processed and imaged in parallel. Laser settings were identical for acquisition of images from all sections. Leica LCS Lite software was used to quantify the mean pixel energy of DHE and TO-PRO-3 in the retinal ganglion cells (RGC) layer, the inner nuclear layer (INL) and the outer nuclear layer (ONL). Data were expressed as the mean pixel energy ratio between DHE and TO-PRO-3 from an average of 10 nuclei in the RGC layer or 20 nuclei in the INL and ONL for each retinal image quantified in 3 rats.

4.3.7 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm s.e.m. and n represents the number of rats used in each experiment. Multiple comparisons between groups were performed using the non-parametric Mann-Whitney test for retinal leukostasis. One-way ANOVA and the Bonferroni *post-hoc* test were used for Table 2 data, vascular permeability, expression of inflammatory mediators and superoxide anion measurement. Only probability values (P) less than 0.05 were considered to be statistically significant.

4.4 Results

4.4.1 Physiological parameters

As shown in Table 2, blood glucose concentration was significantly increased in STZ-diabetic rats at the time of sacrifice when compared to age-matched control rats ($P < 0.001$). One-week eye drops application of LF22-0542 had no effect on glycemia in both control and STZ-diabetic rats ($P > 0.05$). Body weight was significantly reduced in STZ-diabetic rats treated or not with LF22-0542 compared to controls ($P < 0.001$). Treatment of diabetic rats with LF22-0542 had no effect on body weight when compared to diabetic rats treated with the vehicle ($P > 0.05$). Control and STZ-diabetic rats that received eye drops of LF22-0542 did not show symptoms of ocular irritation (redness or corneal opacity) or the presence of porphyrin secretion around the eyes during the whole period of treatment.

4.4.2 Effect of LF22-0542 on retinal vascular permeability

Evans Blue extravasation ($\mu\text{g/g}$ of fresh tissue) was significantly increased by 31% in STZ-diabetic rats compared to control rats ($P < 0.05$). Topical ocular administration of LF22-0542 reversed retinal vascular hyperpermeability to control values in STZ-diabetic rats ($P < 0.05$) (Figure 2).

4.4.3 Effect of LF22-0542 on retinal leukostasis

Retinal adherent leukocytes were labelled with FITC-Concanavalin A lectin (Figure 3A). Total number of adherent leukocytes in the retinal wall was significantly increased in STZ-diabetic rats compared to control rats ($P < 0.05$) (Figure 3B). One-week eye drops administration of LF22-0542 to diabetic rats significantly decreased retinal leukostasis ($P < 0.05$). B_1R antagonist treatment had no significant effect on leukocytes number in control retina ($P > 0.05$).

4.4.4 Effect of LF22-0542 on the expression of inflammatory mediators

All inflammatory mediators were expressed at very low levels in the retina of control rats (Figure 4). In STZ-diabetic rats ($n=7$), retinal mRNA levels of B₁R, iNOS, IL-1 β , COX-2, VEGF-R₂ and HIF-1 α were significantly increased (4 to 16-fold) compared to control rats ($n=7$, $P<0.05$). These increases were restored to control values in rats treated with LF22-0542 ($n=7$). The increase mRNA levels of B₂R, ICAM-1, eNOS and VEGF-A did not reach statistical significance in STZ-diabetic retinæ, yet LF22-0542 treatment abolished to control values this trend.

4.4.5 Effect of LF22-0542 on oxidative stress

Production of superoxide anion (O₂⁻) in the retina measured with the oxidative fluorescent dye dihydroethidine is shown in Figure 5. DHE staining of STZ-diabetic retinal sections displayed a higher intensity of fluorescence than controls (Figure 5A). Quantification of the O₂⁻ retinal levels (mean pixel energy ratio of DHE staining versus TO-PRO-3) showed a significant increase in the retinal ganglion cells layer (RGC) ($P<0.01$), the inner nuclear layer (INL) ($P<0.01$) and the outer nuclear layer (ONL) ($P<0.01$) of STZ-diabetic rats compared to control rats (Figure 5B). Importantly, one-week topical administration of LF22-0542 to STZ-diabetic rats markedly reduced O₂⁻ levels in the 3 retinal nuclear layers ($P<0.05$). Administration of LF22-0542 had no significant effect on basal production of O₂⁻ in the retina of control animals ($P>0.05$).

4.5 Discussion

This study provides the first demonstration that prolonged ocular application of a water soluble non-peptide kinin B₁R antagonist is an effective and non-toxic approach to inhibit diabetes-induced retinal inflammation and oxidative stress. The results clearly show that the B₁R antagonist reversed the increased vascular permeability, leukostasis, the enhanced expression of several inflammatory mediators and the higher production of reactive oxygen species.

4.5.1 Retinal vascular permeability

Breakdown of the blood-retinal barrier appears early in the progression of diabetic retinopathy and often leads to the development of macular edema which is a major cause of visual impairment in diabetic patients [30], [31]. Retinal vascular permeability has been largely studied in experimental models of diabetes and evidence was provided that breakdown of the blood-retinal barrier occurs as early as one week following diabetes induction in rats [24], [32]. The present study shows that 7-day eye drops application of the B₁R antagonist LF22-0542 completely reversed increased retinal vascular permeability in 2-week STZ-diabetic rats. This is consistent with the inhibition of retinal plasma extravasation following a 7-day i.v. treatment with the peptide B₁R antagonist R-715 in STZ-diabetic rats [17]. Likewise, s.c. or i.v. injection of the peptide B₁R antagonist R-954 reversed the enhanced vascular permeability in the retina and other target tissues in mice and rats treated with STZ 1 and 4 weeks earlier [33], [34], [35]. Our results are also consistent with a previous study that showed a decrease in retinal vascular permeability following treatment with a selective plasma kallikrein inhibitor in STZ-diabetic rats [36].

The alleviation of enhanced vascular permeability by B₁R antagonism could be explained by the concomitant reduction in gene expression of iNOS, COX-2 and VEGF-R₂ in rats treated with LF22-0542. Nitric oxide pathway, prostaglandins and VEGF are known to play a role in breakdown of the blood-retinal barrier through a mechanism involving the upregulation of intercellular adhesion molecules (ICAM-1) and the downregulation of tight junctions proteins in the retinal vasculature [37], [38], [39]. Moreover, B₁R is known to be expressed on retinal vessels and could therefore directly increase vascular permeability through the release of NO and prostaglandins following its activation.

In addition to supporting a key role for kinin B₁R in retinal vascular permeability, our results demonstrate that LF22-0542 reached the rat retina when given by eye drops application. This is the first use of a B₁R antagonist as ocular treatment. LF22-0542 had a specific action at the ocular level and was not detected in the blood circulation after prolonged ocular administration in rabbits (unpublished data). Therefore, eye drops

application provides the advantage of avoiding systemic effects for potential clinical treatment. Moreover, topical treatment is the less invasive route of administration for treatment of ocular disease and would be beneficial for the treatment of diabetic retinopathy. Current therapies for these patients include laser induced retinal photocoagulation and repetitive intravitreal injections of anti-VEGF molecules, which are very expensive and associated with significant risks of infection, retinal lesion and pain. These treatments help to reduce the progression of diabetic retinopathy in advanced stages of the disease but are not curative. Topical B₁R antagonist is therefore a very promising approach for the treatment of early pathological changes in the diabetic retina.

4.5.2 Leukostasis

Leukocytes adhesion to the retinal vasculature is thought to be associated with endothelial cell death, capillary occlusion and increased vascular permeability, which all contribute to the progression of diabetic retinopathy [21], [22]. Following their adherence to the retinal vessels of diabetic rats, leukocytes exit the vasculature and transmigrate to the neural retina [24], [40], [41]. Our data suggest that B₁R antagonism is a possible therapeutic strategy for reversing retinal leukostasis and the associated vascular alterations in diabetes. Previously, B₁R has been shown to be involved in all 3 phases of the leukocyte recruitment process in inflamed tissue [42], [43]. B₁R agonist caused leukocytes rolling, adhesion and emigration in mouse mesenteric postcapillary venules [44] and leukocytes migration and infiltration in the pleural cavity [45], [46].

Leukocytes bind to ICAM on the surface of endothelial cells to adhere to the vasculature. Previous studies reported that the increased number of adherent leukocytes in the diabetic retina is mediated by the concomitant increase of ICAM-1 expression in the retinal vasculature [24], [47]. Importantly, our results show a reduced level of expression of ICAM-1 in the retina of STZ-diabetic rats treated with LF22-0542 in parallel with the decrease of leukostasis.

4.5.3 Expression of B₁R and B₂R

Real time RT-PCR analysis revealed that B₁R was significantly upregulated in the retina of STZ-diabetic rats which is consistent with the increased density of B₁R binding sites previously reported by autoradiography [16] and with the increased B₁R protein expression by western blot [48]. The activation of B₁R is known to induce the production of pro-inflammatory cytokines that can directly cause the expression of B₁R. The prolonged ocular treatment with B₁R antagonist inhibits both the inflammatory response and expression of B₁R. Level of B₂R gene expression in the retina of diabetic rats was slightly but not significantly increased in the diabetic retina, yet it was reduced to control values in diabetic rats treated with LF22-0542. Further studies are needed to clarify the contribution of B₂R in the effects mediated by B₁R blockade.

4.5.4 Expression of inflammatory mediators

Our results demonstrate that B₁R plays a central role in retinal inflammation by interacting with many pro-inflammatory factors involved in vascular alterations. mRNA levels of IL-1 β , COX-2 and VEGF-R₂ were increased in diabetic retinas compared to control rats and were restored to control values with LF22-0542 treatment. Previous studies also reported increased expression of IL-1 β and COX-2 in the retina of diabetic rats [49], [50]. VEGF is also known to play a central role in the development of diabetic retinopathy since it is involved in neovascularisation and increased vascular permeability [38], [39], [50]. Moreover, our results show that iNOS gene expression was significantly increased in the diabetic retina as previously shown in diabetic rodents and patients [51], [52], and this was normalized by LF22-0542. Whereas B₂R-mediated eNOS activation leads to a transient (5 min) output of NO, B₁R-mediated iNOS activation leads to a very high and prolonged (90 min) NO production in human endothelial cells which is consistent with the detrimental effect of iNOS on vascular function [53]. The protective vascular function of eNOS through the release of NO appears intact in STZ-diabetic retina at this early stage as evidenced by the lack of alterations in eNOS expression. This is supported by a recent study on retinal

blood flow showing that the endothelium-dependent relaxation mediated by B₁R agonist was not impaired in this model up to 6 weeks post-STZ (Pouliot, M., Héту S., Vaucher, E., Couture, R., unpublished data).

Our results also demonstrate that HIF-1 α was increased in diabetic retina and normalized with B₁R antagonist. HIF-1 α is a transcription factor that accumulates in cells during hypoxia and heterodimerizes with the constitutively expressed HIF-1 β subunit, triggering the activation of many genes such as VEGF. Retinal HIF-1 α was previously found to be activated in 2-week STZ-diabetic rats and to directly regulate VEGF gene expression [54]. Ischemia takes place early in the diabetic retina and our results show that B₁R antagonism may be effective in reducing HIF-1 α expression and subsequent retinal ischemia.

4.5.5 Oxidative stress

Compelling evidence suggests that oxidative stress induced by hyperglycemia plays an important role in the development of vascular alterations in the retina [19], [55]. Oxidative stress is produced by multiple cell types in the retina including endothelial cells, pericytes and glial cells [19], [56], [57], [58]. In agreement with previous studies conducted in diabetic mice and rats [56], [59], [60], we found increased production of superoxide anion in the retina of STZ-diabetic rats, which was reversed by LF22-0542. Since retinal B₁R overexpression was reversed by an antioxidant in STZ-diabetic rats [17], it was concluded that the oxidative stress associated with hyperglycemia is responsible for the induction of B₁R in the retina. Herein, data suggest that the stimulation of B₁R can perpetuate the harmful production of ROS, and therefore the blockade of B₁R should interrupt this deleterious vicious cycle, since inflammation can induce oxidative stress and *vice versa*. This is in keeping with other relevant findings. In cardiac tissue, nitrotyrosine protein level, a marker of oxidative stress, was reduced in B₁R knockout diabetic mice [61]. In a rat model of insulin resistance, one-week treatment with the orally active B₁R antagonist SSR240612 reversed increased levels of superoxide anion and B₁R expression in the aorta through the inhibition of NADPH oxidase [62].

The alleviation of oxidative stress in the diabetic retina by B₁R antagonist could explain the reduction in the expression of inflammatory mediators. It is known that oxidative stress resulting from the production of ROS triggers the activation of the nuclear transcription factor kappa B (NF- κ B) [63]. NF- κ B is a widely expressed inducible transcription factor and an important regulator of many genes involved in inflammatory and immune responses including IL-1 β , ICAM-1, iNOS, COX-2 and B₁R [20], [64]. Therefore, by reducing oxidative stress in the retina, B₁R antagonist could indirectly inhibit NF- κ B activation and thereby inflammation, including the expression of its own receptor.

4.6 Conclusion

The findings suggest that B₁R is involved in the inflammatory cascade leading to retinal vascular damage in the early stages of diabetes. The oxidative stress associated with hyperglycemia induces the expression of B₁R in the retina. In turn, the activation of B₁R may perpetuate the production of ROS to enhance the expression of vascular pro-inflammatory mediators (COX-2, IL-1 β , ICAM-1, VEGF and HIF-1 α). Those mediators in concert with B₁R could enhance leukostasis and vascular permeability in the diabetic retina. These pathological events are likely to contribute to the development of diabetic retinopathy. Hence, the ocular application of LF22-0542, a highly potent antagonist at human B₁R, represents a promising therapeutic approach in diabetic retinopathy.

4.7 Acknowledgements

This work was funded by Grants-in-Aid from the Vision Research Network of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Canadian Diabetes Association (OG-3-07-2428). PhD Studentship Awards were obtained from the Foundation Fighting Blindness (MP), the FRSQ (MP, ST) and the Canadian Institutes of Health Research (ST). Authors are thankful to Denis Latendresse for the artwork.

4.8 Competing Interests

RC has received research funds from Fovea Pharmaceuticals, the manufacturer of the compound LF22-0542. Fovea Pharmaceuticals provided the compound LF22-0542 employed in this study. This does not alter the authors' adherence to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials.

4.9 References

1. Phipps JA, Feener EP (2008) The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy: lessons for the kidney. *Kidney Int* 73: 1114-1119.
2. Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL (2004) Angiotensin and bradykinin: targets for the treatment of vascular and neuro-glial pathology in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des* 10: 3313-3330.
3. Feener EP (2010) Plasma kallikrein and diabetic macular edema. *Curr Diab Rep* 10: 270-275.
4. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429: 161-176.
5. Regoli D, Barabe J (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 32: 1-46.
6. Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ (1998) Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 348: 1-10.
7. Marceau F (1995) Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology* 30: 1-26.
8. Marceau F, Larrivee JF, Saint-Jacques E, Bachvarov DR (1997) The kinin B1 receptor: an inducible G protein coupled receptor. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 725-730.
9. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57: 27-77.
10. Ahluwalia A, Perretti M (1999) B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B the 1? *Trends Pharmacol Sci* 20: 100-104.
11. McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A (1999) Inducible expression of the kinin B1 receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg⁹bradykinin-induced coronary vasodilation. *Br J Pharmacol* 128: 275-282.

12. Kuznetsova TP, Chesnokova NB, Paskhina TS (1991) [Activity of tissue and plasma kallikrein and level of their precursors in eye tissue structures and media of healthy rabbits]. *Vopr Med Khim* 37: 79-82.
13. Ma JX, Song Q, Hatcher HC, Crouch RK, Chao L, et al. (1996) Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Exp Eye Res* 63: 19-26.
14. Takeda H, Kimura Y, Higashida H, Yokoyama S (1999) Localization of B2 bradykinin receptor mRNA in the rat retina and sclerocornea. *Immunopharmacology* 45: 51-55.
15. Lim SK, Park MJ, Jung HK, Park AY, Kim DI, et al. (2008) Bradykinin stimulates glutamate uptake via both B1R and B2R activation in a human retinal pigment epithelial cells. *Life Sci* 83: 761-770.
16. Abdouh M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R, et al. (2003) Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br J Pharmacol* 140: 33-40.
17. Abdouh M, Talbot S, Couture R, Hassessian HM (2008) Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol* 154: 136-143.
18. Frank RN (2004) Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 350: 48-58.
19. Kowluru RA, Chan PS (2007) Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007: 43603.
20. Kern TS (2007) Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007: 95103.
21. Jousseaume AM, Poulaki V, Le ML, Koizumi K, Esser C, et al. (2004) A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J* 18: 1450-1452.
22. Jousseaume AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, Bursell SE, et al. (2001) Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol* 158: 147-152.

23. Miyamoto K, Hiroshiba N, Tsujikawa A, Ogura Y (1998) In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2190-2194.
24. Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, Murata T, et al. (1999) Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10836-10841.
25. Porreca F, Vanderah TW, Guo W, Barth M, Dodey P, et al. (2006) Antinociceptive pharmacology of N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[4-methoxy-2,6-dimethylphenyl]sulfonyl]methylamino]ethoxy]-N-methylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel nonpeptidic bradykinin B1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 195-205.
26. Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, et al. (2007) Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* 41: 375-387.
27. Petcu M, Dias JP, Ongali B, Thibault G, Neugebauer W, et al. (2008) Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain. *Int Immunopharmacol* 8: 188-196.
28. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods* 25: 402-408.
29. Miller FJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL (1998) Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 82: 1298-1305.
30. Moss SE, Klein R, Klein BE (1998) The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology* 105: 998-1003.
31. Jousseaume AM, Smyth N, Niessen C (2007) Pathophysiology of diabetic macular edema. *Dev Ophthalmol* 39: 1-12.

32. Qaum T, Xu Q, Jousen AM, Clemens MW, Qin W, et al. (2001) VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2408-2413.
33. Lawson SR, Gabra BH, Guerin B, Neugebauer W, Nantel F, et al. (2005) Enhanced dermal and retinal vascular permeability in streptozotocin-induced type 1 diabetes in Wistar rats: blockade with a selective bradykinin B1 receptor antagonist. *Regul Pept* 124: 221-224.
34. Lawson SR, Gabra BH, Nantel F, Battistini B, Sirois P (2005) Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: distinct vasculopathic profile of major key organs. *Eur J Pharmacol* 514: 69-78.
35. Simard B, Gabra BH, Sirois P (2002) Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 1203-1207.
36. Clermont A, Chilcote TJ, Kita T, Liu J, Riva P, et al. (2011) Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes* 60: 1590-1598.
37. Leal EC, Manivannan A, Hosoya K, Terasaki T, Cunha-Vaz J, et al. (2007) Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 5257-5265.
38. Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Moromizato Y, Aiello LP, et al. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol* 156: 1733-1739.
39. Amrite AC, Ayalasomayajula SP, Cheruvu NP, Kompella UB (2006) Single periocular injection of celecoxib-PLGA microparticles inhibits diabetes-induced elevations in retinal PGE2, VEGF, and vascular leakage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 1149-1160.

40. Miyahara S, Kiryu J, Yamashiro K, Miyamoto K, Hirose F, et al. (2004) Simvastatin inhibits leukocyte accumulation and vascular permeability in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Am J Pathol* 164: 1697-1706.
41. Noda K, Nakao S, Zandi S, Engelstadter V, Mashima Y, et al. (2009) Vascular adhesion protein-1 regulates leukocyte transmigration rate in the retina during diabetes. *Exp Eye Res* 89: 774-781.
42. Araujo RC, Kettritz R, Fichtner I, Paiva AC, Pesquero JB, et al. (2001) Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. *Biol Chem* 382: 91-95.
43. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA, Jr., et al. (2000) Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8140-8145.
44. McLean PG, Ahluwalia A, Perretti M (2000) Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J Exp Med* 192: 367-380.
45. Vianna RM, Calixto JB (1998) Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg⁹-BK in mouse pleurisy. *Br J Pharmacol* 123: 281-291.
46. Vianna RM, Ongali B, Regoli D, Calixto JB, Couture R (2003) Up-regulation of kinin B1 receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence. *Br J Pharmacol* 138: 13-22.
47. McLeod DS, Lefter DJ, Merges C, Luttly GA (1995) Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *Am J Pathol* 147: 642-653.
48. Pouliot M, Héту S, Lahjouji K, Couture R, Vaucher E (2011) Modulation of retinal blood flow by kinin B₁ receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res* 92: 482-489.
49. Kowluru RA, Odenbach S (2004) Role of interleukin-1beta in the development of retinopathy in rats: effect of antioxidants. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 4161-4166.

50. Ayalasonmayajula SP, Kompella UB (2003) Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits retinal vascular endothelial growth factor expression and vascular leakage in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Eur J Pharmacol* 458: 283-289.
51. Du Y, Sarthy VP, Kern TS (2004) Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R735-741.
52. Abu El-Asrar AM, Desmet S, Meersschaert A, Dralands L, Missotten L, et al. (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.
53. Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA (2010) Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* 44: 145-154.
54. Poulaki V, Jousseaume AM, Mitsiades N, Mitsiades CS, Iliaki EF, et al. (2004) Insulin-like growth factor-I plays a pathogenetic role in diabetic retinopathy. *Am J Pathol* 165: 457-469.
55. Kowluru RA, Tang J, Kern TS (2001) Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 50: 1938-1942.
56. Du Y, Miller CM, Kern TS (2003) Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radic Biol Med* 35: 1491-1499.
57. Kowluru RA, Atasi L, Hu Y (2006) Role of mitochondrial superoxide dismutase in the development of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 1594-1599.
58. Cui Y, Bi H, Zhu Q, Wu J, Xia X, Qiushi R, Ho PC (2006) Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 83: 807-16.

59. Kanwar M, Chan PS, Kern TS, Kowluru RA (2007) Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 3805-3811.
60. Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Kubota S, Yuki K, et al. (2010) Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia* 53: 971-979.
61. Westermann D, Walther T, Savvatis K, Escher F, Sobirey M, et al. (2009) Gene deletion of the kinin receptor B1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 58: 1373-1381.
62. Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, Couture R (2010) Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One* 5: e12622.
63. Couture R, Girolami JP (2004) Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 500: 467-485.
64. Ni A, Chao L, Chao J (1998) Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem* 273: 2784-2791.

4.10 Figures

Figure 4.1: Chemical structure of LF22-0542

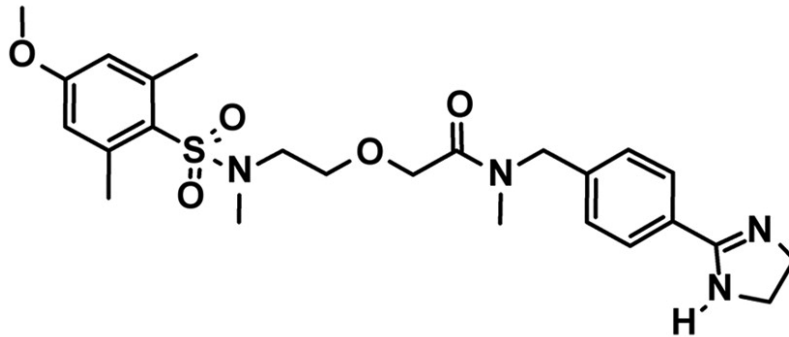


Figure 4.2: Effect of LF22-0542 on retinal vascular permeability in STZ-diabetic rats. Data are mean \pm s.e.m. of values obtained from 9 to 11 rats. Statistical comparison with control (*) or STZ (+) rats is indicated by *⁺P < 0.05.

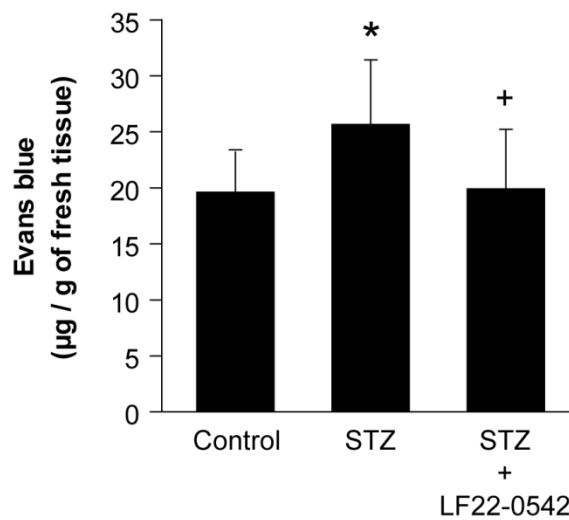


Figure 4.3: Effect of LF22-0542 on retinal leukostasis in STZ-diabetic rats.

(A) Representative pictures of adherent leucocytes in retinal vessels of a control rat, a control rat treated with LF22-0542, a STZ-diabetic rat and a STZ-diabetic rat treated with LF22-0542. Scale bar is 50 μm . (B) Number of adherent leukocytes per retina. Data are mean \pm s.e.m. of values obtained from 5 to 7 rats in each group. Statistical comparison with control (*) or STZ (+) rats is indicated by * $^+P < 0.05$.

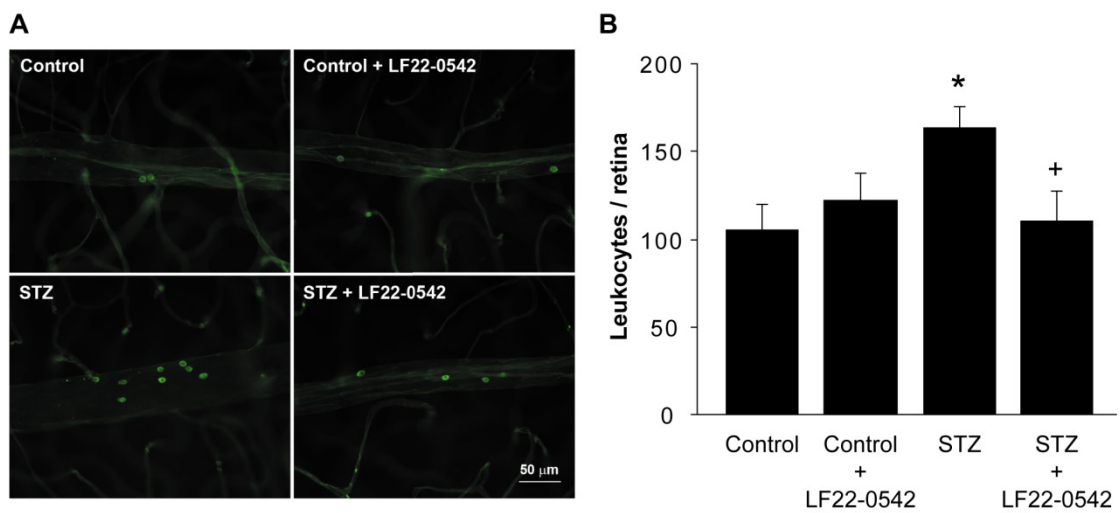


Figure 4.4: Effect of LF22-0542 on the expression of retinal inflammatory mediators in STZ-diabetic rats. mRNA levels of B₁R, B₂R, eNOS, iNOS, ICAM-1, IL-1 β , COX-2, HIF-1 α , VEGF-R₂ and VEGF-A. Data are mean \pm s.e.m. of values obtained from 7-8 rats in each group. Statistical comparison with control rats (*) is indicated by *P < 0.05, **P < 0.01.

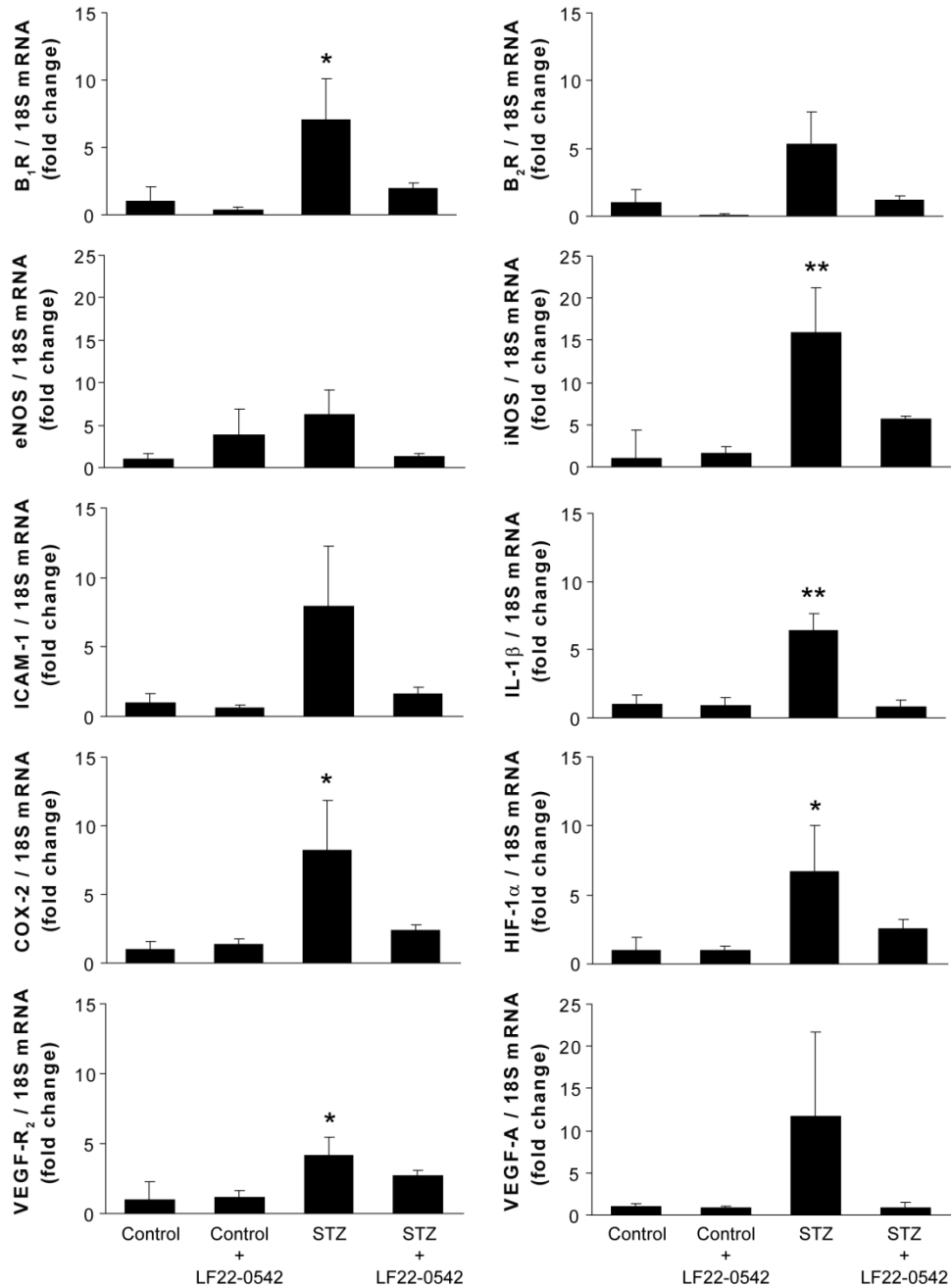


Figure 4.5: Effect of LF22-0542 on retinal oxidative stress in STZ-diabetic rats.

(A) Representative pictures of superoxide anion production stained with dihydroethidine on retinal section from a control rat, a control rat treated with LF22-0542, a STZ-diabetic rat and a STZ-diabetic rat treated with LF22-0542. Scale bar is 75 μm . (B) Fluorescence intensity of superoxide anion was quantified by the evaluation of mean pixel energy ratio of DHE staining versus TO-PRO-3 in the retinal ganglion cells layer (RGC), the inner nuclear layer (INL) and the outer nuclear layer (ONL). Data are mean \pm s.e.m. of values obtained from 3 rats in each group. Statistical comparison with control (*) or STZ (+) rats is indicated by ** $P < 0.01$, + $P < 0.05$, +++ $P < 0.001$.

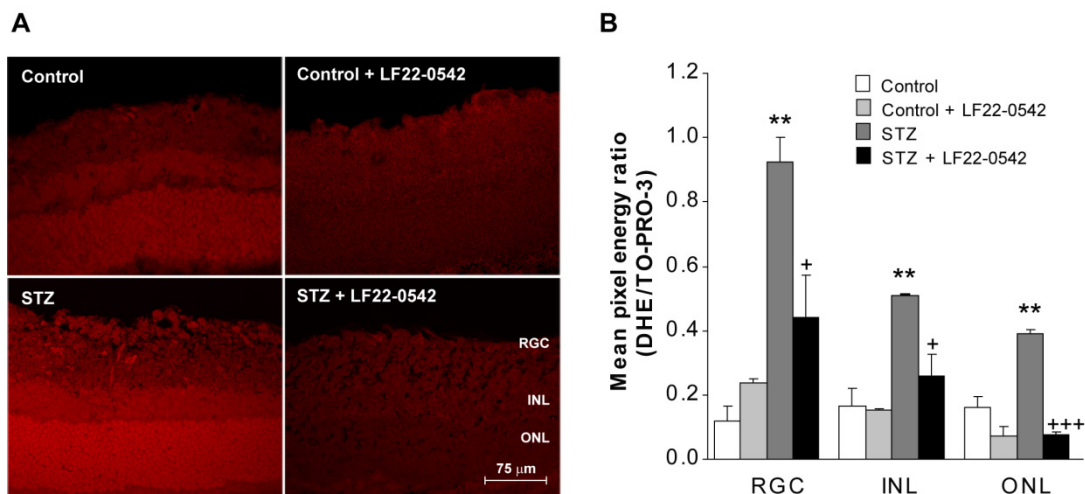


Table 4.1: Primers list

		Sequence	Position	Gen Bank
B ₁ R	Forward	5' GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT 3'	367 - 390	NM_030851
	Reverse	5' CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT 3'	454 - 431	
B ₂ R	Forward	5' AGG TGC TGA GGA ACA ACG AGA TGA 3'	882 - 905	NM_173100
	Reverse	5' TCC AGG AAG GTG CTG ATC TGG AAA 3'	990 - 967	
iNOS	Forward	5' TGA TCT TGT GCT GGA GGT GAC CAT 3'	1150 - 1173	NM_012611
	Reverse	5' TGT AGC GCT GTG TGT CAC AGA AGT 3'	1349 - 1326	
eNOS	Forward	5' TAT TTG ATG CTC GGG ACT GCA GGA 3'	587 - 610	NM_021838
	Reverse	5' ACG AAG ATT GCC TCG GTT TGT TGC 3'	678 - 655	
COX-2	Forward	5' GCA TTC TTT GCC CAG CAC TTC ACT 3'	677 - 700	U03389
	Reverse	5' TTT AAG TCC ACT CCA TGG CCC AGT 3'	744 - 751	
ICAM-1	Forward	5' TGC AGG TGA ACT GCT CTT CCT CTT 3'	161 - 184	NM_012967
	Reverse	5' AGC TTC CAG TTG TGT CCA CTC GAT 3'	263 - 240	
VEGF-A	Forward	5' TCA CCA AAG CCA GCA CAT AGG AGA 3'	1219 - 1242	BC168708
	Reverse	5' TTA CAC GTC TGC GGA TCT TGG ACA 3'	1371 - 1348	
VEGF-R ₂	Forward	5' AGT GGC TAA GGG CAT GGA GTT CTT 3'	3269 - 3292	U93306
	Reverse	5' GGG CCA AGC CAA AGT CAC AGA TTT 3'	3387 - 3364	
IL-1 β	Forward	5' TGT CAC TCA TTG TGG CTG TGG AGA 3'	247 - 270	NM_031512
	Reverse	5' TGG GAA CAT CAC ACA CTA GCA GGT 3'	411 - 388	
HIF-1 α	Forward	5' TAG ACT TGG AAA TGC TGG CTC CCT 3'	1693 - 1716	NM_024359
	Reverse	5' TGG CAGTGA CAG TGA TGG TAG GTT 3'	1863 - 1840	
18S	Forward	5' TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT 3'	363 - 385	X01117
	Reverse	5' TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT 3'	470 - 447	

Table 4.2: Effect of diabetes and LF22-0542 on glycemia and body weight

	Glycemia (mmol/L)	Body weight (g)
Control + Vehicle (n = 7)	5.5 \pm 0.2	356 \pm 6
Control + LF22-0542 (n = 6)	5.1 \pm 0.2	355 \pm 5
STZ + Vehicle (n = 5)	26.8 \pm 2.9***	295 \pm 9***
STZ + LF22-0542 (n = 7)	27.7 \pm 2.9***	274 \pm 5***

Values are mean \pm s.e.m.***P < 0.001, significantly different from control group.

Chapitre 5 : Étude complémentaire

Expression du récepteur B₁ des kinines dans la rétine humaine diabétique

5.1 Introduction

Le récepteur B₁ des kinines est surexprimé dans la rétine de rat STZ-diabétique où il contribue à l'inflammation et au développement des altérations vasculaires caractéristiques de la rétinopathie diabétique. Ainsi, le récepteur B₁ pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de cette maladie. Toutefois, l'expression du récepteur B₁ dans la rétine diabétique humaine n'a encore jamais été étudiée. L'objectif de cette étude était de déterminer si le récepteur B₁ ainsi que deux cytokines pro-inflammatoires associées à son induction (TNF α et d'IL-1 β) sont surexprimés dans la rétine de patients diabétiques de type I et de type II.

5.2 Méthodes

5.2.1 Collection des tissus

L'utilisation de tissus humains dans cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'Université de Montréal, en accord avec la Déclaration d'Helsinki pour la recherche impliquant des sujets humains. Les yeux de 4 donneurs contrôles et 9 donneurs diabétiques (4 donneurs avec le diabète de type I et 5 donneurs avec le diabète de type II) ont été obtenus de la banque de tissus *Eye Bank for Sight Restoration* (New York, NY, États-Unis). Suite au prélèvement des yeux, la cornée et le cristallin ont été enlevées puis les yeux ont été entreposés à 4°C dans une solution pour préserver l'ARN (RNAlater stabilization reagent, QIAGEN, Valencia, CA, États-Unis). Les yeux ont ensuite été livrés à l'Université de Montréal dans un colis avec de la glace pour maintenir une température d'environ 4°C. Dès leur réception, les rétines ont été disséquées et placées dans la solution de préservation de l'ARN jusqu'à la mesure des médiateurs de l'inflammation par RT-PCR

quantitatif. Tous les échantillons utilisés dans cette étude étaient négatifs pour le VIH, la syphilis et l'hépatite B et C.

5.2.2 Mesure des médiateurs de l'inflammation par RT-PCR quantitatif

L'ARN total des rétines a été extrait avec l'utilisation d'un kit commercial (QIAGEN, Valencia, CA, États-Unis). L'ADNc simple brin synthétisé à partir de 400 ng d'ARN total a été utilisé dans chacune des réactions effectuées avec le kit de transcription *QuantiTect Rev* (QIAGEN). Le PCR quantitatif en temps réel utilisant la sonde fluorescente SYBR a été réalisé tel que décrit précédemment (Abdouh *et al.*, 2008). Le *SYBR Green Master mix* (QIAGEN) a été utilisé avec 300 nM de chaque amorce. Les amorces ont été conçues par le logiciel Vector NTI et sont présentées au Tableau 5.2. Pour la standardisation et la quantification, la β -actine humaine a été amplifiée simultanément. Les conditions du PCR étaient les suivantes : 95°C pendant 15 minutes, 46 cycles à 94°C pendant 15 secondes, 60°C pendant 30 secondes et 72°C pendant 30 secondes. La quantification relative de l'expression génique a été analysée par la méthode $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak *et al.*, 2001). Ct représente le numéro du cycle auquel le signal fluorescent dépasse significativement le niveau de base.

5.2.3 Analyse statistique

Les données sont présentées avec la moyenne et l'écart-type. Les comparaisons entre les échantillons des donneurs contrôles et diabétiques ont été effectuées avec le test non paramétrique Mann-Whitney. Seulement les valeurs de probabilités (P) plus petites que 0.05 ont été considérées statistiquement significatives.

5.3 Résultats

5.3.1 Caractéristiques des donneurs

Les informations médicales des donneurs sont présentées au Tableau 5.1. L'âge des donneurs était situé entre 64 et 70 ans pour les contrôles, entre 52 et 71 ans pour les patients

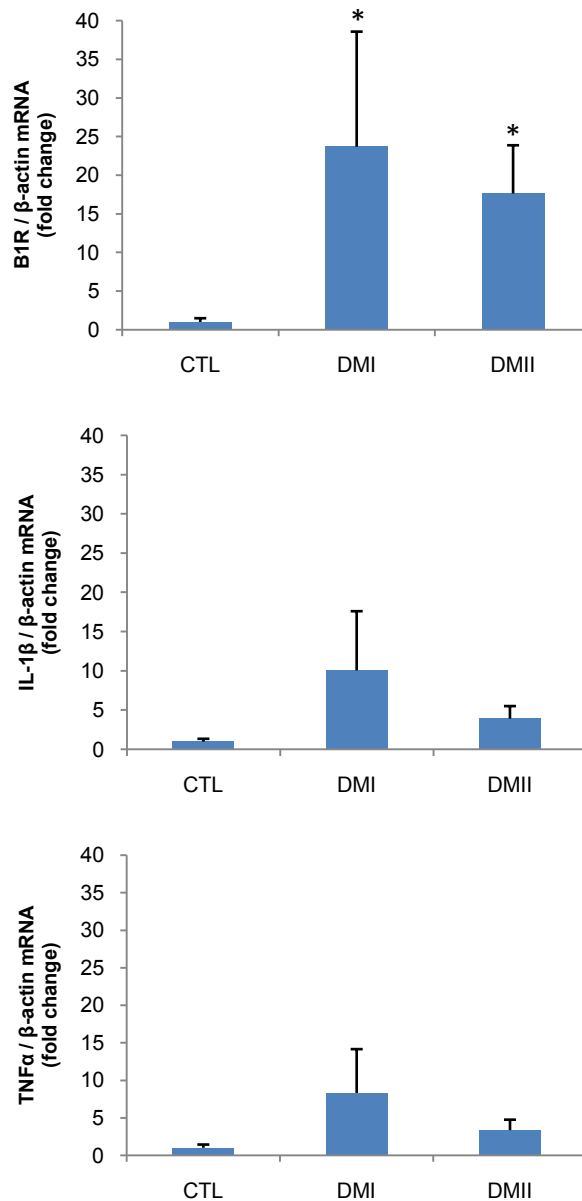
avec le diabète de type I et entre 56 et 70 ans pour les patients avec le diabète de type II. Aucun échantillon ne présentait de maladie oculaire, à l'exception d'un donneur avec une rétinopathie diabétique (0036-11). Le délai entre le décès du patient et le prélèvement des yeux était moins de 12 heures.

5.3.2 Expression du récepteur B₁, de TNF- α et d'IL-1 β

Les niveaux d'ARNm du récepteur B₁ étaient significativement augmentés dans les rétines de patients diabétiques de type I et de type II en comparaison aux contrôles ($P < 0.05$). De plus, les niveaux d'ARNm de TNF- α et d'IL-1 β étaient aussi légèrement augmentés, bien que ce changement n'était pas statistiquement significatif. Aucune différence dans l'expression des médiateurs de l'inflammation n'a été constaté entre les rétines des donneurs diabétiques de type I et de type II.

5.4 Figures

Figure 5.1 : Expression du récepteur B₁, de TNF- α et d'IL-1 β dans les rétines de patients contrôles (CTL) et de patients diabétiques de type I (DMI) et de type II (DMII). Les données présentent la moyenne et l'écart-type des valeurs obtenues pour 4 patients contrôles, 4 patients diabétiques de type I et 5 patients diabétiques de type II. *P < 0.05, en comparaison au groupe contrôle.



5.5 Tableaux

Tableau 5.1 : Informations médicales des donneurs

Sample	Gender	Age	Cause of death	Medical history	Diabetes duration (years)	Postmortem enucleation time (h)
<u>Control donors</u>						
1271-10	M	70	Lung cancer	Prostate cancer, COPD, HTN, HLD	N/A	6.1
1261-10	M	65	Pancreatic cancer	Pleural effusion	N/A	6.3
0020-11	F	64	Lung cancer	COPD, osteoporosis, ETOH abuse	N/A	8.3
0097-11	M	64	Encephalopathy	Esophageal cancer and metastases to brain	N/A	10.7
<u>Diabetic donors</u>						
0080-11	F	71	Liver failure	DMI, HTN, hypokaliemia, ETOH abuse	10	9.8
0346-11	M	58	Cardiovascular disease	DMI, HTN, HL, A-FIB, smoker	Unknown	9.8
1087-11	M	70	CVA	DMI, HTN, epilepsy	Unknown	6.2
1175-11	M	52	Coronary artery disease	DMI	Unknown	7.2
1241-10	M	69	Pneumonia	DMII, HTN, HL, A-FIB, COPD	Unknown	11.5
0036-11	F	70	Ventricular tachycardia	DMII, HTN, coronary artery disease, DR	32	9.2
0348-11	M	66	Gastrointestinal bleed	DMII, HTN, HL, CVA, prostate disease, bipolar	20	11.6
0800-11	M	57	Lung cancer	DMII, COPD	Unknown	7.3
0841-11	M	56	Intracranial hemorrhage	DMII, HTN, HL, ESRD, CKD, anemia, acidosis	6	5.8

A-FIB, atrial fibrillation; CKD, chronic kidney disease; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CVA, cerebrovascular accident; DMI, type I diabetes mellitus; DMII, type II diabetes mellitus; DR, diabetic retinopathy; ESRD, end-stage renal disease; HL, hyperlipidemia; HLD, hypersensitivity lung disease; HTN, hypertension; PNA, pneumonia.

Tableau 5.2 : Liste des amorces

			Sequence	Position	Gen Bank	
B ₁ R	Forward	5'	AAA TGC TAC GGC CTG TGA CAA TGC	3'	189-212	BC034705
	Reverse	5'	AGA TTT CTG CCA CGT TCA GTT GCC	3'		
IL-1 β	Forward	5'	TCT GTA CCT GTC CTG GGT GTT GAA	3'	633-656	NM_0005756
	Reverse	5'	TGC TTG AGA GGT GCT GAT GTA CCA	3'		
TNF- α	Forward	5'	TCA ACC TCC TCT CTG CCA TCA AGA	3'	669-692	NM_000594
	Reverse	5'	ATG ATC CCA AAG TAG ACC TGC CCA	3'		
β -actin	Forward	5'	ACC AAC TGG GAC GAC ATG GAG AAA	3'	363-385	NM_001101
	Reverse	5'	TAG CAC AGC CTG GAT AGC AAC GTA	3'		

Chapitre 6 : Discussion

6.1 Sommaire des résultats

Le récepteur B₁ des kinines est surexprimé par l'hyperglycémie et le stress oxydatif dans une grande variété de tissus où il contribue à plusieurs complications du diabète. L'objectif principal de cette thèse était de déterminer si le récepteur B₁ est également impliqué dans le développement de la rétinopathie diabétique, une maladie caractérisée par des changements pathologiques du lit vasculaire rétinien. Les résultats obtenus ont montré que le récepteur B₁ est induit dans la rétine diabétique. L'administration d'antagonistes du récepteur B₁ chez le rat STZ-diabétique ne permet pas de rétablir la perfusion rétinienne mais elle diminue l'hyperperméabilité vasculaire, l'inflammation et le stress oxydatif dans la rétine. Les antagonistes du récepteur B₁ des kinines pourraient ainsi représenter une nouvelle approche pour le traitement de cette maladie.

6.1.1 Expression du récepteur B₁ dans la rétine

Par RT-PCR et immunobuvardage de type Western, nous avons montré que le récepteur B₁ est induit dans la rétine 4 jours après l'initiation du diabète chez le rat STZ-diabétique et qu'il demeure surexprimé pendant au moins 6 semaines d'hyperglycémie. Son expression est associée à l'augmentation de cytokines pro-inflammatoires et du stress oxydatif dans la rétine. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes qui ont montré une augmentation des sites de liaison du récepteur B₁ dans la rétine jusqu'à 21 jours suivant l'induction du diabète (Abdough *et al.*, 2003). Les résultats de cette thèse montrent aussi que l'application topique d'un antagoniste du récepteur B₁ sur l'œil du rat diabétique permet de renverser l'expression des récepteurs B₁ et B₂ des kinines ainsi que la réponse inflammatoire dans la rétine. Il est connu que l'activation du récepteur B₁ dans différents tissus entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires qui peuvent à leur tour induire la surexpression du récepteur B₁ via le facteur de transcription NF- κ B (Schanstra *et al.*, 1998). De plus, l'hyperglycémie engendre la production d'espèces réactives oxygénées qui activent le facteur de transcription NF- κ B menant à la surexpression du récepteur B₁ (Yerneni *et al.*, 1999, Couture et Girolami, 2004). Ainsi, les résultats obtenus confirment

que le récepteur B₁ est induit dans la rétine au cours du diabète par des mécanismes impliquant une augmentation du stress oxydatif et possiblement un processus inflammatoire.

L'expression du récepteur B₁ a aussi été montrée dans la rétine humaine appuyant ainsi les résultats obtenus chez le rat diabétique. En effet, nous avons montré que le récepteur B₁ est surexprimé dans la rétine de patients diabétiques, avec des niveaux similaires dans le diabète de type I et de type II. Contrairement au rat diabétique, cette surexpression n'est pas accompagnée d'une augmentation des niveaux d'IL-1 β et de TNF α . Ceci pourrait suggérer que le stress oxydatif joue un rôle plus important que le processus inflammatoire dans l'induction du récepteur B₁ dans la rétine humaine. Un groupe de chercheurs avait précédemment montré une augmentation des niveaux de pré-kallicréine, de kininogène de haut poids moléculaire et de kallicréine plasmatique dans l'humeur vitrée de patients atteints de rétinopathie diabétique (Gao *et al.*, 2008). Toutefois, aucune étude n'avait, jusqu'à ce jour, examiné l'expression du récepteur B₁ dans la rétine de patients diabétiques. Les résultats présentés ici démontrent que le récepteur B₁ est surexprimé dans la rétine humaine diabétique suggérant ainsi, pour la première fois, que les traitements pharmacologiques qui ciblent le récepteur B₁ dans la rétine peuvent être applicables chez l'homme pour le traitement de la rétinopathie diabétique.

6.1.2 Le récepteur B₁, l'inflammation et le stress oxydatif dans la rétine

Le récepteur B₁ joue un rôle central dans l'inflammation rétinienne via l'interaction avec une multitude de facteurs pro-inflammatoires impliqués dans les altérations vasculaires. Dans la rétine de rats STZ-diabétiques, les niveaux d'ARNm de COX-2, IL-1 β , VEGF-R₂, iNOS et HIF-1 α sont significativement augmentés en comparaison à ceux des rats contrôles. Les résultats montrent que l'administration topique de LF22-0542 pendant 7 jours consécutifs permet de diminuer l'expression de ces médiateurs de l'inflammation dans la rétine. De plus, la perméabilité vasculaire rétinienne et l'adhésion des leucocytes à la paroi des vaisseaux sanguins rétiniens sont également significativement diminués suite à l'administration de LF22-0542. Ces résultats sont appuyés par une diminution

concomitante de l'expression d'ICAM-1 dans la rétine, une molécule impliquée dans l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales et favorisant l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne (McLeod *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1999). Le récepteur B₁ est présent sur les vaisseaux sanguins rétiniens (Abdouh *et al.*, 2003; Héту, 2011) et pourrait donc directement augmenter la perméabilité vasculaire et favoriser l'adhésion des leucocytes à la paroi des vaisseaux sanguins via la relâche de NO et de prostaglandines. De plus, le récepteur B₁ pourrait contribuer à ces altérations vasculaires rétiniennes par l'entremise de VEGF, iNOS et COX-2 qui sont également augmentés dans la rétine et qui sont connus pour leur rôle dans l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne et l'inflammation.

Dans la rétine, l'expression du récepteur B₁ est inhibée par l'administration d'un anti-oxydant confirmant ainsi que le stress oxydatif est responsable de l'induction du récepteur B₁ (Abdouh *et al.*, 2008). Nos résultats montrent que l'augmentation de la production d'anion superoxyde dans la rétine de rat diabétique est inhibée par l'administration d'un antagoniste du récepteur B₁, suggérant que la stimulation du récepteur B₁ peut perpétuer la production d'espèces réactives oxygénées et ainsi l'induction de son propre récepteur. L'administration d'antagoniste du récepteur B₁ permet d'interrompre ce cercle vicieux en diminuant à la fois la production d'anion superoxyde et de médiateurs de l'inflammation dans la rétine. Il est connu que le stress oxydatif qui résulte de la production d'espèces réactives oxygénées active NF- κ B, un facteur impliqué dans la transcription d'une grande variété de molécules inflammatoires tels IL-1 β , ICAM-1, iNOS, COX-2 et B₁R. Tous ces facteurs, incluant le récepteur B₁, augmentent la leucostasie et la perméabilité vasculaire dans la rétine diabétique. Ainsi, le récepteur B₁ ferait partie intégrante d'une cascade inflammatoire et oxydative menant aux altérations vasculaires de la rétine dans les premiers stades de la rétinopathie diabétique.

6.1.3 Le récepteur B₁ et la modulation du débit sanguin rétinien

Le récepteur B₁ est surexprimé dans la rétine de rat STZ-diabétique après 4 jours de diabète et son activation par un agoniste induit une dilatation des microvaisseaux rétinien *in vitro* ainsi qu'une augmentation du débit sanguin rétinien *in vivo* (Abdouh *et al.*, 2003; Héту, 2011). Bien que le récepteur B₁ soit présent sur le lit vasculaire rétinien très tôt dans le diabète, les altérations du débit sanguin rétinien chez le rat diabétique n'apparaissent que plus tard. En effet, nous avons montré que le débit sanguin rétinien n'est pas altéré chez le rat à 4 jours de diabète bien que le récepteur B₁ soit présent dans la rétine. Nos résultats indiquent que le récepteur B₁ aurait plutôt un rôle protecteur au tout début de la maladie. L'administration de SSR240612, un antagoniste du récepteur B₁, entraîne une diminution du débit sanguin rétinien à 4 jours suggérant que le récepteur B₁ est activé par les kinines endogènes dans la rétine, contribuant ainsi à prévenir la réduction du débit sanguin rétinien. L'activation du récepteur B₁ entraînerait ainsi une vasodilatation pour maintenir un débit sanguin normal dans la rétine diabétique et assurer l'équilibre homéostatique. Cet effet protecteur n'est toutefois pas maintenu à 6 semaines de diabète. Chez le rat diabétique à 6 semaines, nous avons constaté une forte diminution du débit sanguin rétinien en comparaison au rat témoin. Toutefois, l'administration de SSR240612 n'a eu aucun effet sur cette diminution de la perfusion rétinienne. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette observation. Premièrement, il est possible que la production de kinines endogènes menant à l'activation du récepteur B₁ dans la rétine soit fortement diminuée à 6 semaines de diabète. Toutefois, l'expression du récepteur B₁ est normalement exacerbée par l'inflammation chronique qui engendre une production soutenue de kinines dans les tissus. Deuxièmement, les voies de signalisation du récepteur B₁ pourraient être affectées par une dysfonction endothéliale et une altération des mécanismes de dilatation dépendants du NO. Cet argument peut être rejeté car nous avons montré que l'injection intravitréenne d'un agoniste entraîne une augmentation similaire du débit sanguin rétinien (mesuré par débitmétrie au laser Doppler) chez le rat diabétique à 4 jours et 6 semaines de diabète (Héту, 2011). Ceci suggère que le récepteur B₁ est présent sur les vaisseaux sanguins et que

les mécanismes de vasodilatation ne sont pas altérés par l'hyperglycémie. Finalement, la présence de plusieurs molécules vasoactives dans la rétine pourrait favoriser une vasoconstriction et ainsi masquer la vasodilatation du récepteur B₁. Il est connu que des molécules vasoconstrictrices comme l'angiotensine II et l'endothéline-1 (ET-1) sont augmentées dans la rétine diabétique et entraînent une diminution du débit sanguin rétinien (Bursell *et al.*, 1995; Horio *et al.*, 2004). Ainsi, à 6 semaines de diabète, la diminution du débit sanguin pourrait être due à une présence majoritaire de molécules favorisant une vasoconstriction.

Simultanément à la mesure du débit sanguin rétinien, nous avons évalué le rôle du récepteur B₁ dans la modulation du débit sanguin cérébral. Nous avons montré que les changements du débit sanguin rétinien sont accompagnés d'une modification similaire du débit sanguin cérébral chez le rat STZ-diabétique. Tel qu'observé dans la rétine, le débit sanguin cérébral n'est pas altéré à 4 jours de diabète mais il est fortement diminué à 6 semaines. Bien que l'administration d'un antagoniste du récepteur B₁ provoque une réduction du débit sanguin rétinien, aucun changement n'a été noté dans le cortex frontal et plusieurs autres régions du cerveau. Une étude a précédemment montré que le récepteur B₁ est surexprimé dans le cortex cérébral chez le rat STZ-diabétique (Campos *et al.*, 2005). Nos résultats suggèrent que la contribution du récepteur B₁ dans la modulation de la perfusion tissulaire serait différente dans la rétine et le cerveau.

6.1.4 La dualité du récepteur B₁

Dans la rétine diabétique, le récepteur B₁ exerce à la fois une action protectrice et délétère. D'un côté, il prévient la diminution du débit sanguin rétinien. De l'autre, il contribue à l'inflammation et au stress oxydatif dans la rétine. De façon intéressante, ces effets semblent être dépendants de la progression du diabète. Lorsqu'administrés au tout début de la maladie, les antagonistes du récepteur B₁ entraînent une forte diminution de la perfusion rétinienne, mais n'induisent plus aucun changement de débit sanguin après plusieurs semaines de diabète. Pour le traitement de la rétinopathie diabétique, cette caractéristique indique que les antagonistes du récepteur B₁ pourraient être administrés

pour cibler l'œdème et l'inflammation rétinienne, puisqu'à cette étape du développement de la maladie, le blocage du récepteur B₁ n'a pas d'effet négatif sur la perfusion rétinienne. Toutefois, les antagonistes du récepteurs B₁ ne pourraient pas être utilisés dans le but de prévenir l'apparition de la maladie puisqu'ils pourraient provoquer des changements indésirables de la perfusion rétinienne.

6.2 Avantages et limitations des techniques utilisées

6.2.1 Technique autoradiographique de mesure du débit sanguin rétinien

L'un des objectifs de cette thèse était de mettre au point un nouvel outil pour mesurer le débit sanguin rétinien de manière quantitative et régionale chez un modèle animal. L'injection intraveineuse du traceur radioactif N-isopropyl-p-[¹⁴C]-iodoamphétamine ([¹⁴C]-IMP), une technique habituellement utilisée pour mesurer le débit sanguin cérébral (Sakurada *et al.*, 1978, Vaucher *et al.*, 1997, Greenberg *et al.*, 1999), a été adaptée pour quantifier simultanément le débit sanguin dans la rétine. Cette méthode a permis de caractériser, chez le rat, les changements du débit sanguin rétinien induits par l'hypercapnie et le diabète.

Le [¹⁴C]-IMP est un traceur diffusible qui est capté totalement par les tissus au premier passage dans la circulation sanguine. Il est séquestré dans les tissus en se liant de manière irréversible aux récepteurs des amphétamines. Ainsi, le débit sanguin mesuré est directement proportionnel à la concentration de [¹⁴C]-IMP dans le tissu et ce, même pour des valeurs élevées de débit sanguin (Lear *et al.*, 1982). Le [¹⁴C]-IMP présente plusieurs avantages pour la mesure de la perfusion rétinienne. Premièrement, ce traceur possède une faible diffusion post-mortem (Greenberg *et al.*, 1999), permettant de quantifier le débit sanguin sur des rétines isolées. L'obtention de valeurs quantitatives de débit sanguin est essentielle pour comparer les changements de perfusion dans différents groupes d'animaux et pour évaluer l'effet de traitements pharmacologiques. Deuxièmement, le [¹⁴C]-IMP permet de mesurer la perfusion tissulaire au niveau microvasculaire puisqu'il diffuse librement dans les tissus au lieu de s'immobiliser dans le milieu pré-capillaire comme les

microsphères radioactives (Chemtob *et al.*, 1991; Alm *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2007). Ainsi, l'utilisation du [^{14}C]-IMP améliore considérablement la résolution spatiale ce qui permet une analyse régionale du débit sanguin par autoradiographie. Ce paramètre est particulièrement important pour l'évaluation du débit sanguin dans les maladies oculaires car ce type de pathologie est généralement associé à des altérations de la microcirculation. Finalement, le [^{14}C]-IMP permet la mesure du débit sanguin chez l'animal éveillé, contrairement à d'autres techniques comme la débitmétrie au laser Doppler, l'angiographie et l'imagerie par résonance magnétique, où l'anesthésie de l'animal est nécessaire et modifie les paramètres cardiovasculaires (Clermont *et al.*, 1994; Kunisaki *et al.*, 1998; Chauhan *et al.*, 2006; Duong *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Mori *et al.*, 2007).

Nous avons démontré que la technique autoradiographique utilisant le [^{14}C]-IMP permet d'obtenir une cartographie quantitative du débit sanguin rétinien chez le rat. Il est ainsi possible de mesurer la perfusion dans diverses régions de la rétine, allant du centre à la périphérie. De plus, la technique présente une bonne sensibilité et mesure simultanément le débit sanguin dans différents tissus. En utilisant l'hypercapnie comme modulateur du débit sanguin, nous avons montré que le débit sanguin dans la rétine est davantage augmenté dans la région périphérique. De plus, l'augmentation de la perfusion en réponse aux changements de la pCO_2 est plus prononcée dans le cerveau que dans la rétine, suggérant un mécanisme de régulation différent entre les deux tissus. Cette technique apparaît donc comme un outil très puissant pour caractériser la modulation du débit sanguin régional dans la rétine et le cerveau chez un modèle animal. Toutefois, certaines limitations sont à considérer dans le choix de la méthode pour évaluer les variations du débit sanguin. Contrairement à la débitmétrie au laser Doppler, l'injection de [^{14}C]-IMP ne permet pas une mesure continue du débit sanguin en temps réel puisqu'une seule valeur est obtenue au moment du sacrifice de l'animal. De plus, étant donné que le traceur se lie aux récepteurs des amphétamines retrouvés dans les tissus, une modification dans l'expression de ces récepteurs pourrait altérer la mesure du débit sanguin.

6.2.2 Le rat STZ-diabétique comme modèle de rétinopathie

Le modèle de diabète induit par la STZ est le plus communément utilisé pour étudier les diverses complications du diabète de type I. Chez le rat, une seule injection intra-péritonéale de STZ (50-65 mg/kg) détruit de façon sélective les cellules β du pancréas menant à une hyperglycémie soutenue (20-30 mM), 24 à 48 heures suivant l'administration. La STZ est un composé nitrosuré et un agent alkylant qui inhibe la synthèse de l'ADN. Il a été identifié pour la première fois dans un extrait de *Streptomyces acromogenes*. La STZ est une molécule similaire au glucose qui est transportée dans les cellules par la protéine de transport du glucose GLUT2, mais qui n'est pas reconnue par les autres transporteurs de glucose. Les cellules β possèdent une forte concentration en transporteurs GLUT2, expliquant ainsi la toxicité sélective de la STZ pour ces cellules du pancréas. En clinique, la STZ est utilisée comme anticancéreux pour le traitement de l'adénome matastatique des îlots de Langerhans. Pour la réalisation des travaux de cette thèse, le diabète a été induit chez le rat via une seule injection intra-péritonéale de STZ à une dose de 65 mg/kg. Certaines études ont démontré qu'une administration de STZ à une dose élevée peut engendrer une acidocétose diabétique due à son action très rapide (Hicks *et al.*, 1997; Glaser *et al.*, 2010). Bien que ce mode d'administration soit largement utilisé pour l'induction du diabète chez le rat, une dose plus faible de STZ avec plusieurs injections consécutives serait une alternative à envisager pour les études subséquentes afin d'éviter une induction rapide et soutenue de l'hyperglycémie et l'augmentation des corps cétoniques (Sotnikova *et al.*, 2006; Anjaneyulu et Ramarao, 2003; Wang *et al.*, 1993).

La procédure utilisant la STZ pour l'induction du diabète, introduite pour la première fois dans les années soixante, a fait l'objet de plusieurs milliers de publications faisant de ce modèle animal de maladie humaine, l'un des plus utilisés après le rat spontanément hypertendu (SHR). Chez le rat STZ-diabétique, l'hyperglycémie sévère se maintient pendant environ 36 à 40 semaines suivant l'induction du diabète et elle est accompagnée d'une importante perte de poids. Même en l'absence de traitement d'insuline pendant plusieurs semaines, ce modèle de diabète de type I est associé à un faible taux de

mortalité, qui augmente toutefois considérablement autour de 30 semaines (Su *et al.*, 2000). Cette phase est ensuite suivie d'un retour progressif à des valeurs normales de glucose sanguin et à une diminution de la mortalité (Su *et al.*, 2000). Le rat STZ-diabétique simule plusieurs des complications chroniques du diabète de type I puisqu'il développe des anomalies rénales, cardiovasculaires et neuropathiques. Toutefois, des études ont montré que le rat STZ ne présente pas d'hypertension ni d'athérosclérose, des complications qui sont observées chez plusieurs patients diabétiques mais qui sont davantage associées au diabète de type II (Wei *et al.*, 2003).

Plusieurs changements pathologiques sont aussi observés dans la rétine justifiant l'utilisation de ce modèle d'étude de la rétinopathie diabétique. Dès les premières semaines de diabète, le rat STZ-diabétique développe des altérations vasculaires de la rétine telles une ouverture de la barrière hémato-rétinienne, une dégénérescence des capillaires, une perte de péricytes, un épaissement de la membrane basale et des altérations du débit sanguin rétinien (Cringle *et al.*, 1993; Clermont *et al.*, 1994; Bursell *et al.*, 1992; Zhang *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2004; Robison *et al.*, 1991; Kern *et al.*, 2007). Toutefois, ce modèle ne présente pas les caractéristiques des stades avancés de la maladie. Les hémorragies intrarétiniennes et la néovascularisation qui affectent considérablement la vision des patients avec une rétinopathie diabétique proliférative, n'ont jamais été identifiées dans ce modèle animal de diabète de type I. L'absence des stades prolifératifs de la rétinopathie diabétique chez le rat est probablement due à la courte durée de vie de cet animal (près de 2 ans) qui ne permet donc pas le développement des symptômes qui se produisent généralement chez l'humain après plus de 30 ans de diabète. Une étude a toutefois rapporté la présence de microanévrismes dans la rétine chez le rat STZ-diabétique après plus de 100 semaines de diabète (Su *et al.*, 2000).

6.2.3 Les antagonistes du récepteur B₁ des kinines

Deux antagonistes du récepteur B₁ des kinines ont été utilisés pour la réalisation de ces travaux : le SSR240612 et le LF22-0542. Ces deux antagonistes non peptidiques possèdent une excellente biodisponibilité, une efficacité de longue durée et sont moins

susceptibles à la dégradation que les composés peptidiques. Le SSR240612, développé par Sanofi-Aventis, est actif par voie d'administration orale. Son efficacité a été démontrée dans plusieurs modèles de douleur et d'inflammation. Il réduit de façon dose-dépendante l'œdème de la patte chez des souris traitées avec l'IL-1 β ou la des-Arg⁹-BK et inhibe l'allodynie tactile et au froid dans des modèles de neuropathie chez le rat (Gougat *et al.*, 2004; Dias *et al.*, 2007). Pour l'objet de cette thèse, le SSR240612 a été utilisé pour évaluer l'action du récepteur B₁ sur la modulation du débit sanguin rétinien et cérébral chez le rat diabétique. Puisqu'il est efficace via une administration orale et qu'il traverse les barrières hémato-rétinienne et cérébro-vasculaire, le SSR240612 s'avère donc un antagoniste de choix pour étudier simultanément l'action du récepteur B₁ dans la circulation rétinienne et cérébrale. Lorsqu'il est administré de façon chronique, le SSR240612 entraîne une normalisation de la glycémie chez le rat diabétique (Tidjane, 2008). Cet effet n'a pas été observé suite à une seule administration de SSR240612. Ainsi, les changements de la perfusion rétinienne observés suite à l'administration de SSR240612 sont bien un effet de l'action du récepteur B₁ et non une conséquence de la normalisation de la glycémie.

Le LF22-0542 est un antagoniste compétitif pour le récepteur B₁ (Porreca *et al.*, 2006). Cette molécule, non peptidique et soluble dans l'eau, possède une forte affinité pour le récepteur B₁ et presque aucune affinité pour le récepteur B₂. Chez le rat et la souris, l'administration sous-cutanée de LF22-0542 bloque la douleur neuropathique et inflammatoire (Lungu *et al.*, 2007; Porreca *et al.*, 2006; Petcu *et al.*, 2008). Dans cette thèse, le LF22-0542 a été administré sous forme de gouttes oculaires. C'est la première fois qu'un antagoniste du récepteur B₁ des kinines est utilisé via cette voie d'administration. Pour le traitement des maladies oculaires, l'application topique procure un avantage considérable par rapport aux autres voies d'administration puisqu'elle permet une action ciblée au niveau oculaire et limite l'exposition systémique. De plus, l'application topique est la route d'administration la moins invasive pour un traitement clinique. La photocoagulation au laser et les injections intravitréennes répétées d'anti-VEGF sont les thérapies les plus fréquemment utilisées pour la rétinopathie diabétique, mais elles sont associées à un risque élevé d'infections et de lésions rétinienne (Wilkinson-Berka et

Miller, 2008). Ainsi, la disponibilité d'un traitement topique pour la rétinopathie diabétique serait une grande avancée thérapeutique pour le traitement de cette maladie puisque cette voie d'administration diminuerait l'inconfort et les complications associés aux thérapies usuelles. Parmi les molécules pharmacologiques développées à ce jour pour cibler le récepteur B₁, le LF22-0542 est le seul antagoniste à être hydrosoluble et permettant une administration sous forme de gouttes oculaires.

6.3 Perspectives

Les résultats obtenus dans cette thèse ont permis d'identifier le récepteur B₁ comme une des composantes importantes du développement de la rétinopathie diabétique. Le récepteur B₁ et les kinines exercent une multitude d'effets dans diverses complications du diabète mais leurs rôles dans les maladies oculaires ont été peu étudiés jusqu'à présent. La rétinopathie diabétique étant une maladie progressive et multifactorielle dont les mécanismes ne sont pas encore complètement élucidés, plusieurs avenues en recherche fondamentale et clinique sont à explorer afin de comprendre entièrement l'action du récepteur B₁ dans cette pathologie.

Nous avons démontré qu'il existe un lien entre le récepteur B₁, le stress oxydatif et l'inflammation dans la rétine, menant ainsi au développement des altérations vasculaires de la rétine. En plus des changements du lit vasculaire, la rétinopathie diabétique est associée à une atteinte des neurones et des cellules gliales de la rétine. Dans cette optique, il serait intéressant d'évaluer le rôle du récepteur B₁ dans la mort des cellules ganglionnaires et des photorécepteurs au cours du diabète et de comprendre les effets des kinines dans la fonction neuronale par l'enregistrement de l'électrorétinogramme chez des rats diabétiques traités avec un antagoniste du récepteur B₁. Lors de l'inflammation rétinienne, l'activation des cellules gliales de la rétine, particulièrement les cellules de Müller, entraîne la relâche de plusieurs molécules inflammatoires qui contribuent aux altérations rétinienne. En plus d'être présent sur les vaisseaux sanguins rétiens, le récepteur B₁ pourrait également être exprimé sur d'autres cellules de la rétine, dont les cellules neuronales et gliales, où il

contribuerait à la réponse inflammatoire chronique. Des études immunohistochimiques et moléculaires seraient nécessaires pour caractériser l'expression du récepteur B₁ et préciser sa localisation dans la rétine diabétique. De plus, il serait intéressant d'évaluer le rôle du récepteur B₁ dans les stades plus avancés de la maladie. Par exemple, l'évaluation des effets des kinines sur la prolifération des vaisseaux sanguins de la rétine permettrait de déterminer si les antagonistes du récepteur B₁ peuvent freiner la néovascularisation rétinienne lors des stades prolifératifs de la rétinopathie diabétique. Un autre modèle expérimental devrait cependant être utilisé pour répondre à cette question puisque le rat STZ-diabétique ne développe pas de néovascularisation rétinienne. Le modèle de rétinopathie proliférative induite par l'hypoxie est couramment utilisé pour étudier la prolifération des vaisseaux sanguins rétiens (Madan et Penn, 2003) et pourrait représenter un modèle animal intéressant pour déterminer le rôle du récepteur B₁ dans cette composante de la rétinopathie.

Nos résultats ont démontré que l'administration d'un antagoniste du récepteur B₁ des kinines diminue non seulement l'expression du récepteur B₁ dans la rétine, mais également l'expression du récepteur B₂. D'autres études seraient nécessaires pour clarifier la contribution du récepteur B₂ dans les effets engendrés par le blocage du récepteur B₁. Il est connu que le récepteur B₂ participe à l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne (Abdouh *et al.*, 2008; Phipps *et al.*, 2009). Mise à part l'augmentation de la perméabilité vasculaire, le récepteur B₂ pourrait aussi avoir un rôle à jouer dans d'autres composantes de l'inflammation rétinienne.

Dans la population mondiale, la prévalence du diabète de type II est plus importante que le diabète de type I et par conséquent, la majorité des patients avec une rétinopathie sont atteints d'un diabète non insulino-dépendant (Gorus *et al.*, 2004). Afin d'appuyer les résultats obtenus chez le rat STZ, les effets des antagonistes du récepteur B₁ sur les altérations vasculaires rétiennes pourraient aussi être évalués dans un modèle animal de diabète de type II, tel le rat traité au glucose dans l'eau à boire (Lungu *et al.*, 2007) ou le rat Goto-Kakizaki (Carmo *et al.*, 2000; Miyamoto *et al.*, 1996). Bien que ces modèles soient

souvent choisis pour diverses complications du diabète, incluant l'hypertension et la neuropathie (Dias *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2001; Ueta *et al.*, 2005), ils ont été peu utilisés pour étudier la rétinopathie diabétique. Les changements rétinien chez le rat STZ étant déjà bien caractérisés, ce modèle demeure le plus largement utilisé pour évaluer l'efficacité de traitements pharmacologiques pour la rétinopathie diabétique. Il apparaît toutefois important d'étudier les changements pathologiques de la rétine dans un modèle de diabète de type II, qui serait davantage représentatif de la population diabétique cible. Dans cette perspective, les altérations du lit vasculaire rétinien ont été examinées chez le rat diabétique Goto-Kakizaki (résultats présentés en annexe). La prochaine étape sera de déterminer l'action du récepteur B₁ des kinines dans ce modèle en comparaison aux résultats obtenus chez le rat STZ-diabétique. Parallèlement aux résultats obtenus dans un modèle animal, nous avons aussi montré que le récepteur B₁ est surexprimé dans la rétine de patients diabétiques. Ceci n'est que la première étape dans l'application clinique des résultats obtenus chez le rat diabétique. Plusieurs autres études devraient être réalisées pour déterminer l'efficacité des antagonistes du récepteur B₁ des kinines chez l'homme dans le traitement de la rétinopathie diabétique et de l'œdème maculaire. Les travaux de cette thèse se sont concentrés principalement sur l'action des antagonistes du récepteur B₁, mais d'autres stratégies visant à cibler le système kallibréine-kinine ont aussi montré des résultats prometteurs pour le traitement de la rétinopathie diabétique tel l'administration d'inhibiteurs de la kallibréine plasmatique ou d'antagonistes du récepteur B₂ (Phipps *et al.*, 2009; Gao *et al.*, 2007; Abdouh *et al.*, 2008).

6.4 Conclusion

Les recherches qui ont mené à la réalisation de cette thèse ont permis de mieux comprendre le rôle du récepteur B₁ dans le développement de la rétinopathie diabétique et d'identifier une nouvelle cible pour le traitement de cette maladie. Pour la première fois, il a été montré que l'administration oculaire topique d'un antagoniste du récepteur B₁ permet de diminuer l'inflammation, le stress oxydatif, la leucostase et l'hyperperméabilité vasculaire dans la rétine de rat diabétique. Le récepteur B₁ contribue à la cascade

inflammatoire impliquée dans les altérations vasculaires, en soutenant la production de médiateurs de l'inflammation et d'anion superoxyde dans la rétine en réponse à l'hyperglycémie. De plus, les travaux de cette thèse ont permis de mettre en évidence la dualité fonctionnelle du récepteur B₁ dans la rétine, avec des effets à la fois délétères et protecteurs au tout début de la maladie. Par son action compensatoire pour le maintien du débit sanguin rétinien au début du diabète, le récepteur B₁ contribue de façon positive à la régulation de la perfusion rétinienne chez le rat diabétique. Cet effet protecteur n'étant toutefois pas maintenu pendant la progression du diabète, les antagonistes du récepteur B₁, administrés pour cibler la composante inflammatoire de la maladie, pourraient ainsi représenter un traitement novateur pour la rétinopathie diabétique et l'œdème maculaire.

Bibliographie

- Abbas F, Clayton JK, Marshall KM, Senior J. (1998) Characterisation of kinin receptors on the human isolated umbilical artery. *J Endocrinol* 156: 389-394.
- Abdouh M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali, B, et al. (2003) Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br J Pharmacol* 140: 33-40.
- Abdouh M, Talbot S, Couture R, Hassessian HM. (2008) Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol* 154: 136-143.
- Abu El-Asrar AM, Desmet S, Meersschaert A, Dralands L, et al. (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.
- Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, et al. (1994) Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 118: 445-450.
- Ahluwalia A, Perretti M. (1999) B1 receptors as a new inflammatory target. Could this B be the 1? *Trends Pharmacol Sci* 20: 100-104.
- Aiello LP, Northup JM, Keyt BA, Takagi H et al. (1995) Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 113: 1538-1544.
- Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, et al. (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 331: 1480-1487.
- Aizu Y, Oyanagi K, Hu J, Nakagawa H. (2002) Degeneration of retinal neuronal processes and pigment epithelium in the early stage of streptozotocin-diabetic rats. *Neropathology* 22: 161-170.
- Alm A, Bill A. (1970) Blood flow and oxygen extraction in the cat uvea at normal and high intraocular pressures. *Acta Physiol Scand* 80: 19-28.

- Alm A, Bill A. (1973) Ocular and optic nerve blood flow and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): A study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Exp Eye Res* 15: 15-29.
- Alm A, Lambrou GN, Maepea O, Nilsson SF, Percicot C. (1997) Ocular blood flow in experimental glaucoma: a study in cynomolgus monkeys. *Ophthalmologica* 211: 178-182.
- Al-Shabrawey M, Bartoli M, El-Remessy AB, Platt DH, et al. (2005) Inhibition of NAD(P)H oxidase activity blocks vascular endothelial growth factor overexpression and neovascularization during ischemic retinopathy. *Am J Pathol* 167: 599-607.
- Al-Shabrawey M, Rojas M, Sanders T, Behzadian A, et al. (2008) Role of NADPH oxidase in retinal vascular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 3239-44.
- Anjaneyulu M, Ramarao P. (2003) Protective effect of pioglitazone against multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 25: 205-208.
- Antonelli-Orlidge A, Smith SR, D'Amore PA. (1989) Influence of pericytes on capillary endothelial cell growth. *Am Rev Respir Dis* 140: 1129-31.
- Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. (2012) Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 366: 1227-1239.
- Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, Lieth E, et al. (1998) Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: Vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes* 47: 1953-1959.
- Antonetti DA, VanGuilder HD, Mao-Lin C. (2008) Vascular permeability in Diabetic Retinopathy. Dans: Elia Duh. *Diabetic Retinopathy*. 1^{ère} édition. Totowa NJ : Humana Press, 494p.
- Araujo RC, Kettritz R, Fichtner I, Paiva ACM, et al. (2001) Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. *Biol Chem* 382: 91-95.

- Asano M, Inamura N, Hatori C, Sawai H, et al. (1997) The identification of an orally active, nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR173657. *Br J Pharmacol* 120: 617-24.
- Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, Rabena MD, et al. (2006) Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 133: 1695.e1-15.
- Ayalasomayajula SP, Kompella UB. (2003) Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits retinal vascular endothelial growth factor expression and vascular leakage in a streptozotocin-induced diabetic rat model. *Eur J Pharmacol* 458: 283-289.
- Ayalasomayajula SP, Amrite AC, Kompella UB. (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2, but not cyclooxygenase-1, reduces prostaglandin E2 secretion from diabetic rat retinas. *Eur J Pharmacol* 1: 275-278.
- Baath J, Ells AL, Crichton A, Kherani A, Williams RG. (2007) Safety profile of intravitreal triamcinolone acetonide. *J Ocul Pharmacol Ther* 23: 304-310.
- Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW. (2000) Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 3561-3568.
- Bearse MA, Han Y, Schneck ME, Barez S et al. (2004) Local multifocal oscillatory potential abnormalities in diabetes and early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 3259-3265.
- Bélichard P, Loillier B, Paquet JL, Luccarini JM, et al. (1996) Haemodynamic and cardiac effects of kinin B1 and B2 receptor stimulation in conscious instrumented dogs. *Br J Pharmacol*. 117: 1565-71.
- Ben-Nun J, Alder VA, Constable IJ. (2000) The Effects of induced acute hyperglycemia in the cat on the retinal capillary blood flow. *Ophthalmic Res* 32: 143-150.
- Bertram B, Wolf S, Fiehofer S, Schulte K, et al. (1991) Retinal circulation times in diabetes mellitus type 1. *Br J Ophthalmol* 75: 462-465.

- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. (1992) Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44: 1-80.
- Bhoola K, Ramsaroop R, Plendl J, Cassim B, et al. (2001) Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biol Chem* 381: 77-89.
- Blair NP, Feke GT, Morales-Stoppello J, Riva CE, et al. (1982) Prolongation of the retinal mean circulation time in diabetes. *Arch Ophthalmol* 100: 764-768.
- Böckmann S, Paegelow I. (2000) Kinins and kinin receptors: Importance for the activation of leukocytes. *J Leukocyte Biol* 68: 587-592.
- Brooks HL Jr, Caballero S Jr, Newell CK, Steinmetz RL, et al. (2004) Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1 in patients with diabetic retinopathy and cystoid macular edema before and after intraocular injection of triamcinolone. *Arch Ophthalmol* 122: 1801-1807.
- Bursell SE, Clermont AC, Kinsley BT, Simonson DC, et al. (1996) Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy: a video fluorescein angiographic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 886-897.
- Bursell SE, Clermont AC, Shiba T, King GL. (1992) Evaluating retinal circulation using video fluorescein angiography in control and diabetic rats. *Curr Eye Res* 11: 287-295.
- Cai H, Griendling KK, Harrison DG. (2003) The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24: 471-478.
- Campos MM, Mata LV, Calixto JB. (1995) Expression of B1 receptors mediating paw oedema and formalin induced-nociception: Modulation by glucocorticoids. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 812-819.
- Campos MM, Souza GEP, Calixto JB. (1999) In vivo B1 kinin-receptor upregulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor κ B pathways. *Br J Pharmacol* 127: 1851-1859.

- Campos MM, Cabrini DA, Cardozo AH, Rae GA, et al. (2001) Changes in paw oedema triggered via bradykinin B(1) and B(2) receptors in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 416: 169-177.
- Campos MM, Ongali B, De Souza BH, Schanstra JP, et al. (2005) Expression and distribution of kinin B1 receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin. *Synapse* 57: 29-37.
- Canadian National Institute for the Blind. 1996. Eye Conditions : AMD Basics. En ligne <<http://www.cnib.ca>>, Consulté le 26 Août 2012.
- Carmo A, Cunha-Vaz JG, Carvalho AP, Lopes MC. (2000) Nitric oxide synthase activity in retinas from non-insulin-dependent diabetic Goto-Kakizaki rats: correlation with blood-retinal barrier permeability. *Nitric Oxide* 4: 590-6.
- Catanzaro O, Labal E, Andornino A, Capponi JA, et al. (2012) Blockade of early and late retinal biochemical alterations associated with diabetes development by the selective bradykinin B1 receptor antagonist R-954. *Peptides* 34: 349-52.
- Catanzaro OL, Dziubecki D, Obregon P, Rodriguez RR, et al. (2010) Antidiabetic efficacy of bradykinin antagonist R-954 on glucose tolerance test in diabetic type 1 mice. *Neuropeptides* 44: 187-189.
- Ceravolo GS, Fernandes L, Munhoz CD, Fernandes DC, et al. (2007) Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. *Hypertension* 50: 756-761.
- Chahine R, Adam A, Yamaguchi N, Gaspo R, et al. (1993) Protective effects of bradykinin on the ischaemic heart: implication of the B1 receptor. *Br J Pharmacol* 108 : 318-322.
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, et al. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13926-31.

- Chauhan BC, Yu PK, Cringle SJ, Yu DY. (2006) Confocal scanning laser Doppler flowmetry in the rat retina: origin of flow signals and dependence on scan depth. *Arch Ophthalmol* 124: 397-402.
- Chemtob S, Beharry K, Rex J, Chatterjee T, Varma DR, Aranda JV. (1991) Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 32: 1799-1807.
- Chen L, Yang P, Kijlstra A. (2002) Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm* 10: 27-39.
- Cheng ZJ, Vaskonen T, Tikkanen I, Nurminen K, et al. (2001) Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *Hypertension* 37: 433-9.
- Chihara E, Matsuoka T, Ogura Y, Matsumura M. (1993) Retinal nerve fiber layer defect as an early manifestation of diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 100: 1147-1151.
- Chun DW, Heier JS, Topping TM, Duker JS, et al. (2006) A pilot study of multiple intravitreal injections of ranibizumab in patients with center-involving clinically significant diabetic macular edema. *Ophthalmology* 133: 1706-1712.
- Churchill L, Ward PE. (1986) Relaxation of isolated mesenteric arteries by des-Arg⁹-bradykinin stimulation of B1 receptors. *Eur J Pharmacol* 130: 11-18.
- Clermont AC, Aiello LP, Mori F, Aiello LM, et al. (1997) Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for vascular endothelial growth factor in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 124: 433-446.
- Clermont AC, Brittis M, Shiba T, McGovern T, et al. (1994) Normalization of retinal blood flow in diabetic rats with primary intervention using insulin pumps. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 981-990.
- Côté J, Bovenzi V, Savard M, Dubuc C, et al. (2012) Induction of selective blood-tumor barrier permeability and macromolecular transport by a biostable kinin B1 receptor agonist in a glioma rat model. *PLoS One* 7: e37485.

- Côté J, Savard M, Bovenzi V, Dubuc C, et al. (2010) Selective tumor blood-brain barrier opening with the kinin B2 receptor agonist [Phe(8)psi(CH(2)NH)Arg(9)]-BK in a F98 glioma rat model: an MRI study. *Neuropeptides* 44: 177-85.
- Cours Pharmacie. 2009. Cours Pharmacie : L'immunologie innée. En ligne <<http://www.cours-pharmacie.com>>, Consulté le 27 juin 2012.
- Couture R, Girolami JP. (2004) Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 500: 467-485.
- Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*. 429: 161-176.
- Crane IJ, Liversidge J. (2008) Mechanisms of leukocyte migration across the blood-retina barrier. *Semin Immunopathol* 30: 165-77.
- Cunha Vaz JG, Fonscera JR, Abreu JF. (1978) Vitreous fluorophotometry and retinal blood flow studies in proliferative retinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 207: 71-76.
- Cunha Vaz JG, Fonscera JR, de Abreu JRF, Lima JJP. (1978) Studies on retinal blood flow. *Arch Ophthalmol* 96: 809-811.
- Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. (1990) Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol* 292: 497-523.
- Cuthbertson RA, Mandel TE. (1986) Anatomy of the mouse retina: endothelial cell-pericyte ratio and capillary distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1659-1664.
- Dalaey C, Van de Voorde J. (2000) Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic Res* 23: 249-256.
- Das A, Frank RN, Zhang NL, Samadani E. (1990) Increases in collagen type IV and laminin in galactose-induced retinal capillary basement membrane thickening--prevention by an aldose reductase inhibitor. *Exp Eye Res* 50: 269-80.
- Davidson MK, Russ PK, Glick GG, Hoffman LH, et al. (2000) Reduced expression of the adherens junction protein cadherin-5 in a diabetic retina. *Am J Ophthalmol* 129: 267-269.

- De Brito Gariépy H, Carayon P, Ferrari B, Couture R. (2010) Contribution of the central dopaminergic system in the anti-hypertensive effect of kinin B1 receptor antagonists in two rat models of hypertension. *Neuropeptides* 44: 191-198.
- Décarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, et al. (1996) Serum interspecies difference in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 271: H1340-H1347.
- Del Mashio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, et al. (1996) Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 135: 749-510.
- De Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, et al. (1992) The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255: 989-991.
- Diabetes Control and Complications Trial Research Group. (1995) Progression of retinopathy with intensive versus conventional treatment in the Diabetes Control and Complications trial. *Ophthalmology* 102: 647-661.
- Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, et al. (2007) The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* 152: 280-287.
- Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, et al. (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.
- Drapeau G, deBlois D, Marceau F. (1991) Hypotensive effects of Lys-des-Arg⁹-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins. *J Pharmacol Exp Ther* 259: 997-1003.
- Du Y, Smith MA, Miller CM, Kern TS. (2002) Diabetes induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine *J Neurochem* 80: 771-779.
- Du Y, Sarthy VP, Kern TS. (2004) Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am J Physiol* 287: R735–R741.

- Duchene J, Lecomte F, Ahmed S, Cayla C, et al. (2007) A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5. *J Immunol* 179: 4849-4856.
- Duguay D, Sarkissian SD, Kouz R, Ongali B, et al. (2004) Kinin B2 receptor is not involved in enalapril-induced apoptosis and regression of hypertrophy in spontaneously hypertensive rat aorta: possible role of B1 receptor. *Br J Pharmacol* 141: 728-736.
- Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, et al. (2001) Vasoactive potential of the B1 bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Cir Res* 88: 275-281.
- Dumskyj MJ, Eriksen JE, Dore CJ, Kohner EM. (1996) Autoregulation in the human retinal circulation: Assessment using isometric exercise, laser Doppler velocimetry, and computer-assisted image analysis. *Microvasc Res* 51: 378-392.
- Duong TQ, Pardue MT, Thule PM, Olson DE, et al. (2008) Layer-specific anatomical, physiological and functional MRI of the retina. *NMR Biomed.* 21: 978-996.
- El-Midaoui A, de Champlain J. (2005) Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes. *J Hypertens* 23: 581-588.
- El-Midaoui A, Ongali B, Petcu M, Rodi D, et al. (2005) Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance. *Peptides* 26: 1323-1330.
- Emanuelli C, Madeddu P. (2001) Targeting kinin receptors for the treatment of tissue ischaemia *Trends Pharmacol Sci* 22: 478-84.
- Emerich DF, Dean RL, Osborn C, Bartus RT. (2001) The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation. *Clin Pharmacokinet* 40: 105-123.
- Erdös EG, Tan F, Skidgel RA. (2010) Angiotensin I-converting enzyme inhibitors are allosteric enhancers of kinin B1 and B2 receptor function. *Hypertension* 55: 214-20.
- Erickson KK, Sundstrom JM, Antonetti DA (2007) Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions. *Angiogenesis* 10: 103-117.

- Famiglietti EV, Stopa EG, McGookin ED, Song P, et al. (2003) Immunocytochemical localization of vascular endothelial growth factor in neurons and glial cells of human retina. *Brain Res* 969: 195-204.
- Feke GT, Buzney SM, Ogasawara H, Fujio N, et al. (1994) Retinal circulatory abnormalities in type 1 diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35: 2968-2975.
- Feke GT, Tagawa H, Yoshida A, Goger DG et al. (1985) Retinal circulatory changes related to retinopathy progression in insulin-dependent diabetes mellitus. *Ophthalmology* 92: 1517-1522.
- Feletou M, Martin CA, Molimard M, Naline E, et al. (1995) In vitro effects of HOE 140 in human bronchial and vascular tissue. *Eur J Pharmacol* 274: 57-64.
- Feng D, Bursell SE, Clermont AC, Lipinska I, et al. (2000) Von Willebrand factor and retinal circulation in early stage retinopathy of type 1 diabetes. *Diabetes Care* 23: 1694-1698.
- Frank RN. (2004) Diabetic Retinopathy *N Engl J Med* 350: 48-58.
- Gabra BH, Couture R, Sirois P. (2003) Dualité fonctionnelle des récepteurs des kinines en physiopathologie. *Med Sci* 19: 1101-1010.
- Gao BB, Clermont A, Rook S, Fonda SJ, et al. (2007) Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med* 13: 181-188.
- Gao BB, Chen X, Timothy N, Aiello LP, Feener EP (2008) Characterization of the vitreous proteome in diabetes without diabetic retinopathy and diabetes with proliferative diabetic retinopathy. *J Proteome Res* 7: 2516-2525.
- Gardner TW, Lieth E, Khin SA, Barber AJ, et al. (1997) Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2423-7.
- Gastinger MJ, Singh RS, Barber AJ. (2006) Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 3143-3150.

- Ghirlanda G, Di Leo MA, Caputo S, Falsini B. (1991) Detection of inner retina dysfunction by steady-state focal electroretinogram pattern and flicker in early IDDM. *Diabetes* 40: 1122-1127.
- Gillies MC, Sutter FK, Simpson JM, Larsson J, Ali H, Zhu M. (2006) Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema: two-year results of a double-masked, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Ophthalmology* 113: 1533-1538.
- Glaser N, Yuen N, Anderson SE, Tancredi DJ, O'Donnell ME. (2010) Cerebral metabolic alterations in rats with diabetic ketoacidosis: effects of treatment with insulin and intravenous fluids and effects of bumetanide. *Diabetes* 59: 702-709.
- Glazer LC. (1988) Methods for determination of optic nerve blood flow. *Yale J Biol Med* 61: 51-60.
- Gobeil F Jr., Charland S, Filteau C, Perron SI, et al. (1999) Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities. *Hypertension* 33: 823-829.
- Gobeil F, Neugebauer W, Filteau C, Jukic D, et al. (1996) Structure-activity studies of B1 receptor-related peptides. Antagonists. *Hypertension* 28: 833-839.
- Gorus FK, Weets I, Couck P, Pipeleers DG; Belgian Diabetes Registry. (2004) Epidemiology of type 1 and type 2 diabetes. The added value of diabetes registries for conducting clinical studies: the Belgian paradigm. *Acta Clin Belg* 59: 1-13.
- Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, et al. (2004). SSR240612[(2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-Nmethylpropanamidehydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 661-669.

- Greenberg JH, Sohn NW, Hand PJ. (1999) Nitric oxide and the cerebral-blood-flow response to somatosensory activation following deafferentation. *Exp Brain Res* 129: 541-550.
- Grunwald JE, Bursell SE. (1996) Hemodynamic changes as early markers of diabetic retinopathy. *Cur Opin Endocrinol Diabetes* 3: 298-306.
- Grunwald JE, Riva CE, Sinclair SH, Brucker AJ, et al. (1986) Laser Doppler velocimetry study of retinal circulation in diabetes mellitus. *Arch Ophthalmol* 104: 991-996.
- Grunwald JE, Riva CE, Baine J, Brucker AJ. (1992) Total retinal volumetric blood flow rate in diabetic patients with poor glycemic control. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33: 356-363.
- Hancock HA, Kraft TW. (2004) Oscillatory potential analysis and ERGs of normal and diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 1002-1008.
- Harris RC, Breyer MD. (2001) Physiological regulation of cyclooxygenase-2 in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F1-11.
- Hatcher HC, Ma JX, Chao J, Chao L, Ottlecz A. (1997) Kallikrein-binding protein levels are reduced in the retinas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 658-64.
- Héту S. (2011) Pharmacologie des variations de débit sanguin oculaires chez le rat au moyen de la débimétrie au laser par effet Doppler. Mémoire. Université de Montréal. 124 pages.
- Hicks KK, Seifen E, Stimers JR, Kennedy RH. (1997) Diabetes with and without ketoacidosis on right atrial pacemaker rate and autonomic responsiveness. *Am J Physiol* 273: H1888-1893.
- Higashi S, Clermont AC, Dhir V, Bursell SE. (1998) Reversibility of retinal flow abnormalities is disease-duration dependent in diabetic rats. *Diabetes* 47, 653-659.
- Hock FJ, Wirth K, Albus U, Linz W, et al. (1991) Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol* 102: 769-773.

- Horio N, Clermont AC, Abiko A, Abiko T, et al. (2004) Angiotensin AT(1) receptor antagonism normalizes retinal blood flow and acetylcholine-induced vasodilatation in normotensive diabetic rats. *Diabetologia* 47: 113-123.
- Huber G, Heynen S, Imsand C, vom Hagen F, et al. (2010) Novel rodent models for macular research. *PLoS One* 15: e13403.
- Ignjatovic T, Tan F, Brovkovich V, Skidgel RA, Erdös EG. (2002) Novel mode of action of angiotensin I converting enzyme inhibitors. Direct activation of bradykinin B₁ receptor. *J Biol Chem* 277: 16847-16852.
- Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M, Nakano T, et al. (2006) The regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF-A, -C and -D) expression in retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 83: 1031-1040.
- Inamura N, Asano M, Kayakiri H, Hatori C, et al. (1997) Characterization of FR173657, a novel nonpeptide B₂ antagonist: in vitro and in vivo studies. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 622-8.
- Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, et al. (2003) VEGF₁₆₄ is proinflammatory in the diabetic retina. *Invest ophthalmol Vis Sci* 44: 2155-2162.
- Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, Couture R. (2008) Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol* 589: 66-72.
- Janes RG, Bounds GW. (1955) The blood vessels of the rat's eye. *Am J Anat* 96: 357-373.
- Johnson EIM, Dunlop ME, Larkins RG. (1999) Increased vasodilatory prostaglandin production in the diabetic rat retinal vasculature. *Curr Eye Res* 18: 79-82.
- Joussen AM, Poulaki V, Qin W, Kirchhof B, et al. (2002) Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leucocyte adhesion in vivo. *Am J Pathol* 160: 501-509.
- Joussen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Kirchhof B, et al. (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. *FASEB J* 14: 438-440.

- Joussen AM, Poulaki V, Le ML, Koisumi K, et al. (2004) A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J* 18: 1450-1452.
- Joussen AM, Murata T, Tsujikawa A, Kirchhof B, et al. (2001) Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol* 158: 147-152.
- Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, Reddigari S, et al. (1997) The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. *Adv Immunol* 66: 225-272.
- Kaufman PL, Alm A. (2003) Adler's physiology of the eye. 10e édition. St-Louis, Missouri: Mosby, 876p.
- Kern TS. (2007) Contribution of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007: 95103.
- Kern TS, Miller CM, Du Y, Zheng L, et al. (2007) Topical administration of nepafenac inhibits diabetes-induced retinal microvascular disease and underlying abnormalities of retinal metabolism and physiology. *Diabetes* 56: 373-9.
- Kim YH, Choi MY, Kim YS, Park CH, et al. (2007) Triamcinolone acetonide protects the rat retina from STZ-induced acute inflammation and early vascular leakage. *Life Sci* 81: 1167-1173.
- Kim YH, Chung IY, Choi MY, Kim YS, et al. (2007) Triamcinolone suppresses retinal vascular pathology via a potent interruption of proinflammatory signal-regulated activation of VEGF during a relative hypoxia. *Neurobiol Dis* 26: 569-576.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD et al. (1984) The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch ophthalmol* 102: 520-526.
- Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. (1998) The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology* 105: 1801-1815.

- Klein R, Klein BE, Moss SE, Wong TY, et al. (2004) The relation of retinal vessel caliber to the incidence and progression of diabetic retinopathy: XIX: The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy. *Arch Ophthalmol* 122: 76-83.
- Kohner EM, Hamilton AMP, Saunders SJ, Sutcliffe BA, et al. (1975) The retinal blood flow in diabetes. *Diabetologia* 11: 27-33.
- Kolb H. (1997) Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles. *Eye (Lond)* 11: 904-923.
- Kolb H, Nelson R, Ahnelt P, Cuenca N. (2001) Cellular organization of the vertebrate retina. *Prog Brain Res* 131: 3-26.
- Kondo M, Wang L, Bill A. (1997) The role of nitric oxide in hyperaemic response to flicker in the retina and optic nerve in cats. *Acta Ophthalmol Scand* 75: 232-235.
- Kowluru RA, Odenbach S. (2004) Role of interleukin-1 in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 88: 1343-1347.
- Kowluru RA, Chan PS. (2007) Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007: 43603.
- Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, et al. (2005) Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 54: 1559-1565.
- Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, Nawata H, King GL. (1998) Prevention of diabetes-induced abnormal retinal blood flow by treatment with d-alpha-tocopherol. *Biofactors* 7: 55-67.
- Kuoppala A, Lindstedt KA, Saarinen J, Kovanen PT, et al. (2000) Inactivation of bradykinin by angiotensin-converting enzyme and by carboxypeptidase N in human plasma. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 278: H1069-H1074.
- Kuroki M, Voest EE, Amano S, Beerepoot LV, et al. (1996) Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 89: 1667-1675.

- Kuznetsova TP, Chesnokova NB, Paskhina TS. (1991) Activity of tissue and plasma kallikrein and level of their precursors in eye tissue structures and media of healthy rabbits. *Vopr Med Khim* 37: 79-82.
- Lamontagne D, Nakhostine N, Couture R, Nadeau R. (1996) Mechanisms of kinin B1-receptor-induced hypotension in the anesthetized dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 28: 645-50.
- Larrivée JF, Bachvarov DR, Houle F, Landry J, et al. (1998) Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J. Immunol* 160: 1419-1426.
- Lawson SR, Gabra BH, Nantel F, Battistini B, et al. (2005) Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: distinct vasculopathic profile of major key organs. *Eur J Pharmacol* 514: 69-78.
- Lawson SR, Gabra BH, Guerin B, Neugebauer W, et al. (2005) Enhanced dermal and retinal vascular permeability in streptozotocin-induced type 1 diabetes in Wistar rats: blockade with a selective bradykinin B1 receptor antagonist. *Regul Pept* 124: 221-224.
- Leal EC, Manivannan A, Hosoya K, Terasaki T, et al. (2007) Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 5257-5265.
- Lear LJ, Ackermann FR, Kameyama M, Kuhl DE. (1982) Evaluation of [¹²³I]Isopropylidoamphetamine as a tracer for local cerebral blood flow using direct autoradiographic comparison. *J Cereb Blood Flow Metab* 2: 179-185.
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone et al. (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57: 27-77.
- Li Q, Zemel E, Miller B, Perlman I. (2002) Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. *Exp Eye Res* 74: 615-625.

- Li Y, Cheng H, Duong TQ. (2008) Blood-flow magnetic resonance imaging of the retina. *Neuroimage* 39: 1744-1751.
- Lieth E, LaNoue KF, Antonetti DA, Ratz M. (2000) Diabetes reduces glutamate oxidation and glutamine synthesis in the retina. The Penn State Retina Research Group. *Exp Eye Res* 70: 723-730.
- Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Schölkens BA. (1995) Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 47: 25-49.
- Liu W, Deng Y. (2001) The analysis of electroretinography of diabetes mellitus. *Yan Ke Xue Bao* 17: 173-179.
- Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, et al. (2007) Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* 41: 375-387.
- Ma JX, Song Q, Hatcher HC., Crouch RK, et al. (1996) Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Exp Eye Res* 63: 19-26.
- Madan A, Penn JS. (2003) Animal models of oxygen-induced retinopathy. *Front Biosci* 1: d1030-43.
- Madsen-Bouterse SA, Kowluru RA. (2008) Oxidative stress and diabetic retinopathy: Pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Rev Endocr Metab Disord* 9: 315-327.
- Mage M, Pécher C, Neau E, Cellier E, et al. (2002) Induction of B1 receptors in streptozotocin diabetic rats: possible involvement in the control of hyperglycemia-induced glomerular Erk 1 and 2 phosphorylation. *Can J Physiol Pharm* 80: 328-333.
- Majima M, Hayashi I, Inamura N, Fujita T, et al. (2000) A nonpeptide mimic of bradykinin blunts the development of hypertension in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 35: 437-442.
- Marceau F, Bachvarov DR. (1998) Kinins receptors. *Clin Rev Allergy Immunol*. 16: 385-410.

- Marceau F, Hess J F, Bachvarov DR. (1998). The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50: 357-386.
- Mariani AP. (1984) The neuronal organization of the outer plexiform layer of the primate retina. *Int Rev Cytol* 86: 285-320.
- Marin-Castano ME, Schanstra JP, Neau E, et al. (2002) Induction of functional bradykinin B1 receptors in normotensive rats and mice under chronic angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation* 105: 627-632.
- McFarlane SI, Kumar A, Sowers JR. (2003) Mechanisms by which angiotensin-converting enzyme inhibitors prevent diabetes and cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 91: 30H- 37H.
- McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A. (2000) Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res* 48: 194-210.
- McLean PG, Ahluwalia A, Perretti M (2000) Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J Exp Med* 192: 367-380.
- McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A. (1999) Inducible expression of the kinin B1 receptor in the endotoxemic heart: mechanisms of des-Arg⁹bradykinin-induced coronary vasodilation. *Br J Pharmacol* 128: 275-282.
- McLeod DS, Lefer DJ, Merges C, Litty GA. (1995) Enhanced expression of intercellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *Am J Pathol* 147: 642-653.
- Mendes-Jorge L, Ramos D, Luppó M, Llombart C, et al. (2009) Scavenger function of resident autofluorescent perivascular macrophages and their contribution to the maintenance of the blood-retinal barrier. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 50: 5997-6005.
- Meyerle CB, Chew EY, Ferris FL. (2008) Nonproliferative diabetic retinopathy. Dans: Elia Duh. *Diabetic Retinopathy*. 1^{ère} édition. Totowa NJ : Humana Press, 494p.
- Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Moromizato Y, et al. (2000) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol* 156: 1733-1739.

- Miyamoto K, Ogura Y, Nishiwaki H, Matsuda N, et al. (1996) Evaluation of retinal microcirculatory alterations in the Goto- Kakizaki rat. A spontaneous model of non-insulin-dependent diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 898-905.
- Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, et al. (1999) Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 10836-10841.
- Miyamoto K, Hiroshiba N, Tsujikawa A, Ongura Y. (1998) In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2190-2194.
- Morand-Contant M, Anand-Srivastava MB, Couture R. (2010) Kinin B1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: receptors and mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H1625-H1632.
- Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, et al. (2005) The kallikrein kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 99: 6-38.
- Mori A, Saito M, Sakamoto K, Nakahara T, Ishii K. (2007) Intravenously administered vasodilatory prostaglandins increase retinal and choroidal blood flow in rats. *J Pharmacol Sci* 103: 103-112.
- Moss SE, Klein R, Klein BE. (1998) The 14-year incidence of visual loss in a diabetic population. *Ophthalmology* 105: 1998-1003.
- Naveh-Floman N, Weissman C, Belkin M. (1984) Arachidonic acid metabolism by retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Curr Eye Res* 3: 1135-1139.
- Neugebauer W, Blais PA, Halle S, Filteau C, et al. (2001) Kinin B1 receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 287-292.
- Newman EA. (2004) Glial modulation of synaptic transmission in the retina. *Glia* 47: 268-274.
- Newman E, Reichenbach A. (1996) The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci* 19: 307-312.

- Nguyen QD, Tatlipinar S, Shah SM, Haller JA, et al. (2006) Vascular endothelial growth factor is a critical stimulus for diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 142: 961-969.
- Ni A, Chao L, Chao J. (1998) Transcription factor nuclear factor NF-kB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem* 273: 2784-2791.
- O'Brien C, Kelly PA, Ritchie IM. (1997) Effect of chronic inhibition of nitric oxide synthase on ocular blood flow and glucose metabolism in the rat. *Br J Ophthalmol* 81: 68-71.
- Ongali B, Campos MM, Petcu M, Rodi D, et al. (2004) Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport* 15: 2463-2466.
- Ongali B, Cloutier F, Legault F, et al. (2003) Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1949-H1958.
- Pan ZK, Zuraw BL, Lung CC, Prossnitz ER, et al. (1996) Bradykinin stimulates NF-kB activation and interleukin-1 β gene expression in cultured human fibroblasts. *J Clin Invest* 98: 2042-2049.
- Paques M, Tadayoni R, Sercombe R, Laurent P, et al. (2003) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44: 4960-4967.
- Parenti A, Morbidelli L, Ledda F, Granger HJ, Ziche M. (2001) The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J* 5: 1487-9.
- Park SH, Park JW, Park SJ, Kim KY, et al. (2003) Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia* 46: 1260-1268.
- Patel V, Rassam S, Newsom R, Wiek J, et al. (1992) Retinal blood flow in diabetic retinopathy. *BMJ* 305: 678-683.
- Petcu M, Dias JP, Ongali B, Thibault G, Neugebauer W, et al. (2008) Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain. *Int Immunopharmacol* 8: 188-196.

- Pemp B, Polska E, Garhofer G, Bayerle-Eder M, et al. (2010) Retinal blood flow in type 1 diabetic patients with no or mild diabetic retinopathy during euglycemic clamp. *Diabetes Care* 33: 2038-2042.
- Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, et al. (2008) Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 27: 331-71.
- Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LMF. (1999) Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1 β shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* 56: 325-333.
- Phipps JA, Clermont AC, Sinha S, Chilcote TJ, et al. (2009) Plasma kallikrein mediates angiotensin II type I receptor-stimulated retinal vascular permeability. *Hypertension* 53: 175-181.
- Porreca F, Vanderah TW, Guo W, Barth M, et al. (2006) Antinociceptive pharmacology of N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[4-methoxy-2,6-dimethylphenyl)sulfonyl]methylamino]ethoxy]-Nmethylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel nonpeptidic bradykinin B1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 195-205.
- Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, et al. (2002) Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J Cell Physiol* 193: 275-286.
- Provis JM. (2001) Development of the primate retinal vasculature. *Prog Retin Eye Res* 20: 799-821.
- Provis JM, Penfold PL, Cornish EE, Sandercoe TM, Madigan MC. (2005) Anatomy and development of the macula: specialisation and the vulnerability to macular degeneration. *Clin Exp Optom* 88: 269-81.
- Pruneau D, Bélichard P (1993) Induction of bradykinin B1 receptor-mediated relaxation in the isolated rabbit carotid artery. *Eur J Pharmacol* 239: 63-67.
- Pugliese G, Tilton RG, Speedy A, Santarelli E, et al. (1990) Modulation of hemodynamic and vascular filtration changes in diabetic rats by dietary myo-inositol. *Diabetes* 39: 312-322.

- Qaum t, Xu Q, Jousseaume AM, Clemens MW, et al. (2001) VEGF-initiated blood retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42: 2408-2413.
- Quinn TP, Peters KG, De Vries C, Ferrara N, et al. (1993) Fetal liver kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7533-7537.
- Rabinovitch A. (1998) An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab. Rev* 14: 129-151.
- Rabinovitch A., Suarez-Pinzon WL. (1998) Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem. Pharmacol* 55: 1139- 1149.
- Regoli D, Barabé J. (1980) Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev* 21: 1-46.
- Regoli D, Rizzi A, Perron SI, Gobeil F Jr. (2001) Classification of kinin receptors. *Biol Chem* 382: 31-35.
- Regoli D, Plante GE, Gobeil F Jr. (2012) Impact of kinins in the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacol Ther* 135: 94-111.
- Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, et al. (2004) Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization* 82: 844-851.
- Rhaleb NE, Dion S, Barabe J, Rouissi N, et al. (1989) Receptors for kinins in isolated arterial vessels of dogs. *Eur J Pharmacol* 162: 419-427.
- Rizzi A, Gobeil F, Bogoni G, Calo G, et al. (1997) Antagonistic effects of FR 173657 on human, pig, rabbit, and guinea pig kinin receptors: an in vitro study. *Can J Physiol Pharmacol* 75: 601-608.
- Robinson R, Riva CE, Grunwald JE, Petrig BL, et al. (1986) Retinal blood flow autoregulation in response to an acute increase in blood pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 722-726.

- Robison WG Jr, McCaleb ML, Feld LG, Michaelis OE 4th, et al. (1991) Degenerated intramural pericytes ('ghost cells') in the retinal capillaries of diabetic rats. *Curr Eye Res* 10: 339-50.
- Rösen P, Nawroth PP, King G, Möller W, et al. (2001) The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 17: 189-212.
- Sakai H, Tani Y, Shirasawa E, Shirao Y, et al. (1995) Development of electroretinographic alterations in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Ophthalmic Res* 25: 57-63.
- Sakurada O, Kennedy C, Jehle J, Brown JD, et al. (1978) Measurement of local cerebral blood flow with iodo [14C] antipyrine. *Am J Physiol* 234: H59-66.
- Sardi SP, Perez H, Antunez P, Rothlin RP. (1997) Bradykinin B1 receptors in human umbilical vein. *Eur J Pharmacol* 321: 33-38.
- Schmetterer L, Wolzt M. (1999) Ocular blood flow and associated functional deviations in diabetic retinopathy. *Diabetologia* 42: 387-405.
- Schrier RW, Estacio RO, Esler A, Mehler P. (2002) Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetic patients on albuminuria, retinopathy and strokes *Kidney Int* 61: 1086-1097.
- Seigel GM, Lupien SB, Campbell LM, Ishii DN. (2006) Systemic IGF-1 treatment inhibits cell death in diabetic rat retina. *J Diabetes Complicat* 20: 196-204.
- Simard B, Gabra BH, Sirois P (2002) Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 1203-1207.
- Small KW, Stefansson E, Hatchell DL. (1987) Retinal blood flow in normal and diabetic dogs. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28: 672-675.
- Schnitzer J. (1987) Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neurosci Lett* 78: 29-34.

- Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Sekine Y, et al. (1997) Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetologia* 40: 726-730.
- Sotnikova R, Skalska S, Okruhlicova L, Navarova J, et al. (2006) Changes in the function and ultrastructure of vessels in the rat model of multiple low dose streptozotocin-induced diabetes. *Gen Physiol Biophys* 25: 289-302.
- Su EN, Alder VA, Yu DY, Yu PK, et al. (2000) Continued progression of retinopathy despite spontaneous recovery to normoglycemia in a long-term study of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 163-73.
- Sutera SP, Chang K, Marvel J, Williamson JR. (1992) Concurrent increases in regional hematocrit and blood flow in diabetic rats: prevention by sorbinil. *Am J Physiol* 263: H945-H950.
- Takagi C, King GL, Clermont AC, Cummins DR, et al. (1995) Reversal of abnormal retinal hemodynamics in diabetic rats by acarbose, an α -glucosidase inhibitor. *Curr Eye Res* 14: 741-749.
- Takagi C, Bursell SE, Lin YW, Takagi H, et al. (1996) Regulation of retinal hemodynamics in diabetic rats by increased expression and action of endothelin-1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 2504-2518.
- Takeda H, Kimura Y, Higashida H, Yokoyama S. (1999) Localization of B2 bradykinin receptor mRNA in the rat retina and sclerocornea. *Immunopharmacology* 45: 51-55.
- Talbot S, Chahmi E, Dias JP, Couture R. (2010) Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflammation* 7: 36.
- Tamura H, Miyamoto K, Kiryu J, Miyahara S, et al. (2005) Intravitreal injection of corticosteroid attenuates leukostasis and vascular leakage in experimental diabetic retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 1440-1444.
- Taylor PC, Williams RO, Feldmann C. (2004) Tumor necrosis factor alpha as a therapeutic target for immune-mediated inflammatory diseases. *Curr Opin Biotechnol* 15: 557-563.

- Tidjane N. (2008) Le récepteur B1 des kinines: cible thérapeutique pour le choc septique dans le diabète. Mémoire. Université de Montréal. 108 pages.
- Tilton RG, Chang K, Pugliese G, Eades DM, et al. (1989) Prevention of hemodynamic and vascular albumin filtration changes in diabetic rats by aldose reductase inhibitors. *Diabetes* 38: 1258-1270.
- Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Jakobiec FA, et al. (1996) Intravitreal injection of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in an adult primate. *Ophthalmology* 103: 1820-1828.
- Tornquist P, Alm A. (1979) Retinal and choroidal contribution to retinal metabolism in vivo: A study in pigs. *Acta Physiol Scand* 106: 351-357.
- Tschöpe C, Heringer-Walther S, Koch M, Spillmann F, et al. (2000) Upregulation of bradykinin B1-receptor expression after myocardial infarction *Br J Pharmacol* 129: 1537-8.
- Tsujikawa A, Kiryu J, Nonaka A, Yamashiro K, et al. (2000) Reproducibility of scanning laser Doppler flowmetry in the rat retina and optic nervehead. *Jpn J Ophthalmol* 44: 257-262.
- Tzekov R, Arden GB. (1999) The electroretinogram in diabetic retinopathy. *Survey of Ophthalmology* 44: 53-60.
- Ueta K, Ishihara T, Matsumoto Y, Oku A, et al. (2005) Long-term treatment with the Na⁺-glucose cotransporter inhibitor T-1095 causes sustained improvement in hyperglycemia and prevents diabetic neuropathy in Goto-Kakizaki Rats. *Life Sci* 76: 2655-68.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. (1998) Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 352: 854-865.
- Vaucher E, Borredon J, Bonvento G, Seylaz J, Lacombe P. (1997) Autoradiographic evidence for flow-metabolism uncoupling during stimulation of the nucleus basalis of Meynert in the conscious rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 686-694.

- Vianna RM, Calixto JB. (1998) Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg⁹-BK in mouse pleurisy. *Br J Pharmacol* 123: 281-291.
- Vianna RM, Ongali B, Regoli D, Calixto JB, et al. (2003) Up-regulation of kinin B1 receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence. *Br J Pharmacol* 138: 13-22.
- Vincent JA, Mohr S. (2007) Inhibition of caspase-1/interleukin-1 signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes* 56: 224-230.
- Wang K, Wang Y, Gao L, Li X, et al. (2008) Dexamethasone inhibits leukocyte accumulation and vascular permeability in retina of streptozotocin-induced diabetic rats via reducing vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule-1 expression. *Biol Pharm Bull* 31: 1541-1546.
- Wang L, Fortune B, Cull G, McElwain KM, Cioffi GA. (2007) Microspheres method for ocular blood flow measurement in rats: size and dose optimization. *Exp Eye Res* 84: 108-117.
- Wang Z, Dohle C, Friemann J, Green BS, Gleichmann H (1993) Prevention of high- and low-dose STZ-induced diabetes with D-glucose and 5-thio-D-glucose. *Diabetes* 42: 420-428.
- Wässle H, Boycott BB, Röhrenbeck J. (1989) Horizontal Cells in the Monkey Retina: Cone connections and dendritic network. *Eur J Neurosci* 1: 421-435.
- Webb JG. (2011) The kallikrein/kinin system in ocular function. *J Ocul Pharmacol Ther* 27: 539-43.
- Webb JG, Yang X, Crosson CE. (2009) Expression of the kallikrein/kinin system in human anterior segment. *Exp Eye Res* 89: 126-132.
- Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, et al. (2003) The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung Circ* 12: 44-50.
- Wilkinson-Berka JL. (2006) Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 752-765.

- Wilkinson-Berka JL, Miller AG. (2008) Update on the treatment of diabetic retinopathy. *Scientific World Journal* 8: 98-120.
- Witherow FN, Helmy A, Webb DJ, Fox KAA, Newby DE. (2001) Bradykinin contributes to the vasodilator effects of chronic angiotensin-converting enzyme inhibition in patients with heart failure. *Circulation* 104: 2177-2181.
- Xu X, Zhu Q, Xia X, Zhang S, et al. (2004) Blood-retinal barrier breakdown induced by activation of protein kinase C via vascular endothelial growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Curr Eye Res* 28: 251-6.
- Yamada E. (1969) Some structural features of the fovea centralis in the human retina. *Arch Ophthalmol* 82: 151-159.
- Yermakova A, O'Banion MK. (2000) Cyclooxygenases in the central nervous system: implications for treatment of neurological disorders. *Curr Pharm Des* 6: 1755-76.
- Yerneni K K, Bai W, Khan B V, Medford R M, et al. (1999) Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappa B in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 48 : 855-864.
- Yoshida A, Feke GT, Morales-Stoppello J, Collas GD, et al. (1983) Retinal blood flow alterations during progression of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 101: 225-227.
- Yu DY, Townsend R, Cringle SJ, Chauhan BC, et al. (2005) Improved interpretation of flow maps obtained by scanning laser Doppler flowmetry using a rat model of retinal artery occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 166-174.
- Zhang J, Wu Y, Jin Y, Ji F, et al. (2008) Intravitreal injection of erythropoietin protects both retinal vascular and neuronal cells in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49: 732-42.
- Zheng L, Du Y, Miller C, Gubitosi-Klug RA, 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.

- Zhou X, Polgar P, Taylor L. (1998) Role for interleukin-1 β , phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B1 receptor gene expression. *Biochem J* 330: 361-366.
- Zuccollo A, Navarro M, Prendes GM, Dominguez, A, et al. (1996) Effects of HOE 140 on some renal functions in type I diabetic mice. *Arch Physiol Biochem* 104: 252-254.

Annexe 1

Altérations vasculaires et accumulation de lipides dans la rétine chez le rat diabétique Goto-Kakizaki, un modèle animal pour l'étude de la rétinopathie diabétique

Introduction

Le rat Goto-Kakizaki (GK) est un modèle héréditaire de diabète de type II (non-insulino-dépendant) qui développe une intolérance au glucose due à un dysfonctionnement de l'action de l'insuline. (Kimura *et al.*, 1982; Abdel-Halim *et al.*, 1994; Östenson *et al.*, 1993). Il a été développé par l'hybridation répétée de rats Wistar normaux avec une intolérance au glucose (Goto *et al.*, 1975). Comme les autres modèles de diabète de type II, le rat Goto-Kakizaki a un état diabétique modéré mais ne présente toutefois pas d'obésité. L'intolérance au glucose apparaît après 2 semaines et l'hyperglycémie se manifeste autour de 4 semaines (Goto et Kakizaki, 1981; Portha *et al.*, 1991). Peu d'études ont examiné les changements pathologiques de la rétine chez le rat Goto-Kakizaki qui présente pourtant plusieurs avantages puisqu'aucun agent pharmacologique ne doit être injecté pour induire le diabète et que ce modèle permet un suivi prolongé de la maladie au cours duquel la réponse à l'insuline est altérée. L'objectif de cette étude était de déterminer si les rats diabétiques Goto-Kakizaki développent des altérations vasculaires de la rétine en réponse à l'hyperglycémie. Pour ce faire, les altérations morphologiques du lit vasculaire rétinien ont été examinées, le dépôt de lipides dans la rétine et la choroïde a été évalué et la perméabilité vasculaire rétinienne a été mesurée comme indicatif de l'intégrité de la fonction endothéliale.

Méthodes

Modèle animal

Toutes les méthodes expérimentales effectuées dans cette étude ont été approuvées par le comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de

Montréal en accord avec le conseil canadien de protection des animaux. Les rats mâles Goto-Kakizaki (GK) ont été achetés de Taconic (Hudson, NY, États-Unis) et ont été hébergés 2 par cages dans une pièce où la température (23°C), l'humidité (50%) et l'éclairage (cycle de 12 heures de lumière et d'obscurité) étaient contrôlés. La nourriture et l'eau étaient disponibles *ad libitum*. Des rats mâles Wistar ont été utilisés comme témoins dans toutes les expérimentations. Les concentrations de glucose sanguin ont été mesurées dans des échantillons de sang prélevés de l'extrémité de la queue à l'aide d'un glucomètre (Accusoft; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). La mesure de la perméabilité vasculaire rétinienne a été effectuée chez des rats de 36 semaines et les analyses histologiques ont été effectuées chez des rats de 30 semaines.

Mesure de la perméabilité vasculaire rétinienne

La perméabilité vasculaire rétinienne a été mesurée en utilisant la technique d'extravasation du bleu d'Evans tel que décrite précédemment (Abdouh *et al.*, 2008). Les rats ont été anesthésiés au pentobarbital (60 mg/kg, i.p.) et un cathéter (Micro-Renathane, diamètre interne : 0.040 po, diamètre externe : 0.020 po, Braintree Scientific, Braintree, MA, États-Unis) a été inséré dans la veine fémorale droite. Le bleu d'Evans (45 mg/ml dans la saline) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) a été injecté i.v. pendant 10 secondes. Deux heures après l'injection, de la saline a été infusée dans le ventricule gauche. Les yeux ont été prélevés, puis les rétines ont été disséquées et immédiatement pesées. Le bleu d'Evans a ensuite été extrait en incubant chaque rétine dans 1 ml de formamide (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) pendant 18 h à 70-75 °C. La fluorescence du bleu d'Evans a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Spex 1681 0.22 m, Horiba Jobin Yvon Inc, Edison, NJ, USA) à une longueur d'onde de 620 nm (excitation) et 680 nm (émission).

Examination du lit vasculaire rétinien par histochimie à l'ADPase

Le lit vasculaire rétinien a été visualisé en utilisant le marquage à l'ADPase (Penn *et al.*, 1993). Les rats ont été euthanasiés au pentobarbital et les yeux ont été prélevés puis

immergés dans la paraformaldéhyde 4% (PFA). Les rétines ont été disséquées et entreposées pendant 12 heures à 4°C dans de la formaline (pH 7.4). Les rétines ont ensuite été rincées 3 fois dans du tampon Tris-Malate 50 mM (pH 7.2) et incubées dans la solution d'ADPase. La solution d'incubation était constituée de 3 mM de nitrate de plomb et 6 mM de chlorure de magnésium dans du tampon Tris-Malate 0.2 M (pH 7.2). La solution a été filtrée et chauffée à 37°C. Juste avant d'y placer les rétines, 10 mg d'ADP (adenosine 5'-diphosphate, grade VI crystalline di[monocydo-hexylammonium] salt; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, États-Unis) a été ajouté à la solution d'incubation. Les rétines ont été incubées pendant 15 minutes avec une faible agitation. Elles ont ensuite été rincées 3 fois dans du tampon Tris-Malate puis placées dans une solution de sulfure d'ammonium pendant 1 minute (dilution 1:10, Fisher Scientific, ON, Canada). Finalement, les rétines ont été rincées dans du tampon Tris-Malate puis placées à plat sur des lames. Pour chaque rétine, 3 images consécutives ont été photographiées (20X) dans chaque quadrant avec un microscope (Leica microsystems Co., Allemagne) équipé d'une caméra Leica DC500. Le lit vasculaire rétinien a été examiné pour détecter la présence de microanévrismes et de tortuosité et la densité des vaisseaux sanguins rétiniens a été mesurée avec l'utilisation du logiciel Scion Image (NIH).

Marquage des triglycérides

Les rats ont été anesthésiés au pentobarbital et perfusés avec du PFA 2%. Les yeux ont été disséqués, la cornée et le cristallin ont été enlevés et les yeux ont été placés pendant 12 h dans du sucrose 30%. Les yeux ont ensuite été congelés dans l'isopentane (-55°C) puis coupés en sections de 20 µm avec un cryostat. Les coupes ont été brièvement submergées dans l'isopropanol 60% puis placées dans une solution d'Oil Red O 60% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) pendant 10 minutes. Les coupes ont été immergées une deuxième fois dans l'isopropanol 60% puis rincées dans l'eau distillée et placées dans une solution d'hématoxyline (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) pendant 5 minutes pour colorer le noyau des cellules.

Marquage du collagène

Les coupes ont été immergées dans une solution de Picrosirius 0.1% pendant 1 heure. La solution a été préparée en dissolvant du rouge de Sirius (Direct Red 80, Sigma Aldrich, St-Louis, MO, États-Unis) dans une solution aqueuse d'acide picrique (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, États-Unis). Les coupes ont ensuite été rincées avec de l'acide acétique 1% et déshydratées dans l'alcool.

Analyse statistique

Les données sont présentées selon la moyenne \pm l'écart-type et n représente le nombre d'animaux utilisé pour chaque expérimentation. Les comparaisons entre les rats témoins et GK ont été effectuées en utilisant le test de t -Student. Seulement les résultats ayant une valeur de probabilité (P) plus petite que 0.05 ont été considérés statistiquement significatifs.

Résultats

Tableau 1 : Poids corporel et glycémie des rats témoins et GK. Les niveaux de glucose sanguin étaient significativement augmentés et le poids corporel était significativement diminué chez les rats GK à 30 et 36 semaines en comparaison aux témoins. *** $P < 0.001$, comparé au groupe témoin 30 semaines; +++ $P < 0.001$, comparé au groupe témoin 36 semaines.

	Poids (g)	Glycémie (mmol/L)
Témoin 30 semaines, $n=10$	586 ± 14	4.9 ± 0.3
Témoin 36 semaines, $n=6$	665 ± 28	5.2 ± 0.1
GK 30 semaines, $n=10$	$424 \pm 6^{***}$	$16.4 \pm 1.1^{***}$
GK 36 semaines, $n=6$	$408 \pm 9^{+++}$	$24.2 \pm 1.7^{+++}$

Figure 1 : Perméabilité vasculaire rétinienne des rats témoins et GK. L'extravasation du bleu d'Evans ($\mu\text{g/g}$ de tissu) n'était pas différente chez les rats GK et les rats témoins (CTL, $P > 0.05$).

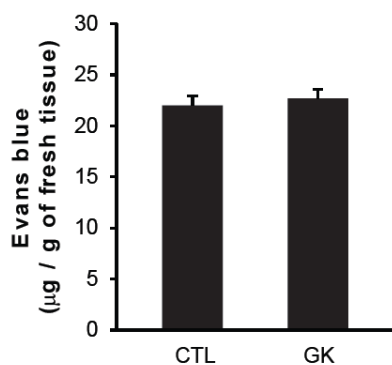


Figure 2 : Analyse de la densité et évaluation morphologique du lit vasculaire rétinien chez les rats témoins et GK. (A) La densité des vaisseaux sanguins dans la rétine n'était pas changée chez les rats GK de 30 semaines en comparaison aux témoins ($P > 0.05$). (B) Les microvaisseaux rétinien apparaissaient plus tortueux chez les rats GK. Barre d'échelle = $100 \mu\text{m}$.

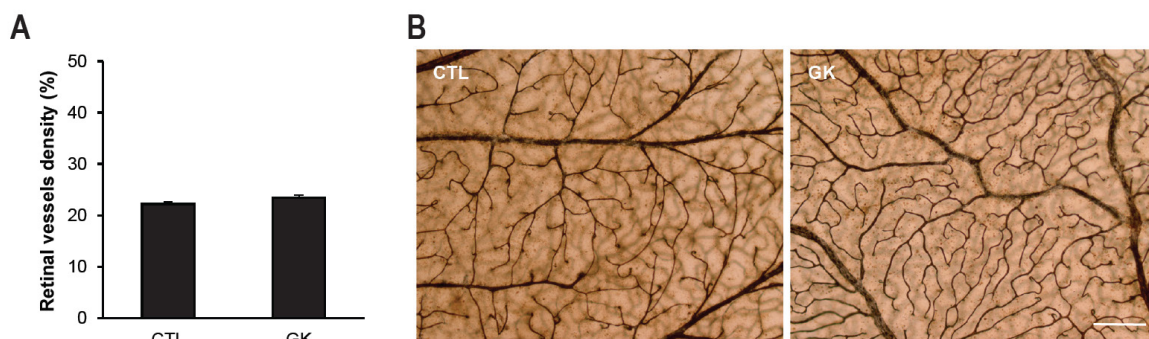


Figure 3 : Images représentatives du marquage des triglycérides dans la rétine avec l'Oil Red O chez un rat témoin et un rat GK. Le marquage des coupes de rétine avec l'Oil Red O a révélé la présence de dépôts lipidiques chez les rats GK. Ces dépôts lipidiques n'étaient pas visibles chez les rats témoins (CTL). Barre d'échelle = 100 μ m

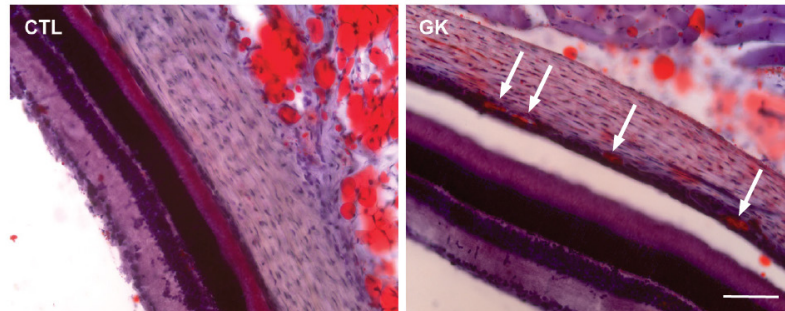
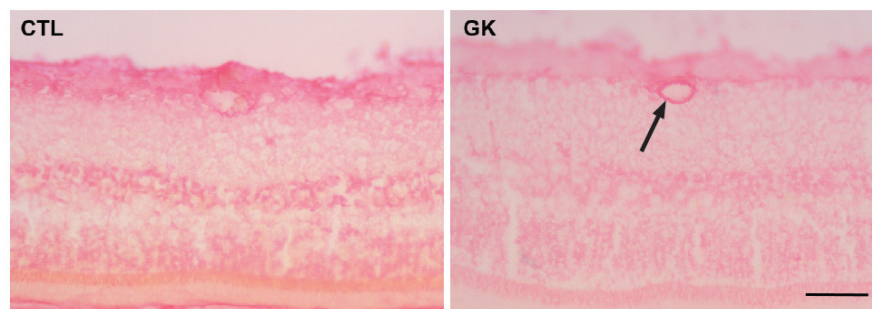


Figure 4 : Images représentatives du marquage du collagène dans la rétine avec le rouge de Sirius chez un rat témoin et un rat GK. Le marquage de la rétine avec le rouge de Sirius a montré une accumulation de collagène dans les vaisseaux sanguins des rats GK, ce qui pourrait être associé à un épaississement de la membrane basale des vaisseaux sanguins. Barre d'échelle = 50 μ m



Discussion

Le rat Goto-Kakizaki est un modèle génétique non-obèse de diabète non insulino-dépendant. Sa principale caractéristique est qu'il présente une hyperglycémie soutenue et une intolérance au glucose. Des études précédentes ont rapporté que le rat Goto-Kakizaki développe des altérations de la microcirculation rétinienne, incluant une diminution de la perfusion rétinienne, une hyperperméabilité vasculaire ainsi qu'une augmentation de la production de NO dans la rétine à 4 mois (Carmo *et al.*, 2000; Miyamoto *et al.*, 1996). Une augmentation des niveaux de VEGF dans la rétine a aussi été observée dans ce modèle jusqu'à 28 semaines de diabète (Sone *et al.*, 1997). Dans la présente étude, les changements du lit vasculaire de la rétine ont été évalués chez le rat Goto-Kakizaki à 30 et 36 semaines. Les résultats obtenus montrent une tortuosité anormale du lit vasculaire de la rétine chez le rat Goto-Kakizaki, suggérant ainsi une dysfonction vasculaire causée par l'hyperglycémie et qui pourrait affecter la régulation du tonus vasculaire et la perfusion rétinienne. Chez les patients diabétiques, la tortuosité des vaisseaux sanguins de la rétine est l'un des premiers signes visibles à l'examen ophtalmique indiquant la présence d'une rétinopathie. Cette altération morphologique a précédemment été observée dans le modèle de diabète induit par la Streptozotocine où elle était associée à une perte de péricytes et à la mort des cellules endothéliales (Su *et al.*, 2000). Notre évaluation du lit vasculaire rétinien a également révélé une accumulation de collagène dans les vaisseaux sanguins des rats Goto-Kakizaki, suggérant la présence de fibrose et d'un épaissement de la membrane basale. Ces résultats sont consistants avec des données précédentes obtenues dans différents modèles animaux montrant que l'épaississement de la membrane basale affecte la fonction rétinienne dans le diabète (Roy *et al.*, 2010). Bien que nos résultats montrent une dysfonction vasculaire chez le rat diabétique à 30 et 36 semaines, aucun changement dans la perméabilité vasculaire rétinienne n'a été observé en comparaison aux rats témoins. Une étude précédente avait montré une ouverture de la barrière hémato-rétinienne à 16 semaines. Ainsi, l'augmentation de la perméabilité vasculaire semble transitoire chez le rat Goto-Kakizaki. En plus des altérations vasculaires, nous avons constaté la présence de

dépôts lipidiques chez les rats Goto-Kakizaki. Ces dépôts lipiques étaient majoritairement localisés entre la rétine et la choroïde, ce qui pourrait suggérer un dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire rétinien. L'ensemble des résultats de cette étude montrent que le rat Goto-Kakizaki présente plusieurs des anomalies rétiniennes associées à la rétinopathie diabétique et qu'il s'avère donc un modèle animal intéressant pour l'étude de cette maladie.

Conclusion

Le lit vasculaire rétinien des rats Goto-Kakizaki, un modèle de diabète non insulino-dépendant, présente plusieurs altérations morphologiques et structurales. La tortuosité des vaisseaux sanguins, un index d'une dysfonction vasculaire en réponse à l'hyperglycémie, est associée à un épaissement de la membrane basale des capillaires et à des dépôts lipidiques dans la rétine. Toutefois, ces facteurs ne semblent avoir aucune influence sur l'intégrité de la barrière hémato-rétinienne, laquelle est préservée à 36 semaines de diabète dans ce modèle animal.

Références

- Abdel-Halim SM, Guenifi A, Luthman H, Grill V, et al. (1994) Impact of diabetic inheritance on glucose tolerance and insulin secretion in spontaneously diabetic GK-Wistar rats. *Diabetes* 43: 281-288.
- Abdouh M, Talbot S, Couture R, Hassessian HM. (2008) Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol* 154: 136-143.
- Carmo A, Cunha-Vaz JG, Carvalho AP, Lopes MC. (2000) Nitric oxide synthase activity in retinas from non-insulin-dependent diabetic Goto-Kakizaki rats: correlation with blood-retinal barrier permeability. *Nitric Oxide* 4: 590-6.
- Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. (1975) Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc Jpn Acad* 51: 80-85.
- Goto Y, Kakizaki M. (1981) The spontaneous-diabetes rat: A model of noninsulin dependent diabetes mellitus. *Proc Jpn Acad* 57: 381-384.
- Kimura K, Toyota T, Kakizaki M, Kudo M, et al. (1982) Impaired insulin secretion in the spontaneous diabetes rat. *Tohoku J Exp Med* 137: 453-459.
- Miyamoto K, Ogura Y, Nishiwaki H, Matsuda N, et al. (1996) Evaluation of retinal microcirculatory alterations in the Goto-Kakizaki rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37: 898-905.
- Östenson CG, Khan A, Abdel-Halim SM, Guenifi A, et al. (1993) Abnormal insulin secretion and glucose metabolism in pancreatic islets from the spontaneously diabetic GK rat. *Diabetologia* 36: 3-8.
- Penn JS, Tolman BL, Lowery LA. (1993) Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34: 576-85.
- Portha B, Serradas P, Bailbe D, Suzuki K, et al. (1991) Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes. *Diabetes* 40: 486-491.
- Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E. (2010) Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr Eye Res* 35: 1045-56.

- Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Sekine Y, et al. (1997) Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetologia* 40: 726-730.
- Su EN, Alder VA, Yu DY, Yu PK, et al. (2000) Continued progression of retinopathy despite spontaneous recovery to normoglycemia in a long-term study of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 238: 163-73.

Annexe 2

Liste des publications

- Pouliot M, Deschênes MC, Héту S, Chemtob S, Lesk MR, Couture R, Vaucher E. (2009) Quantitative and regional measurement of retinal blood flow in rats using N-isopropyl-p-[¹⁴C]-iodoamphetamine ([¹⁴C]-IMP). *Exp Eye Res* 89: 960-966.
- Pouliot M, Héту S, Lahjouji K, Couture R, Vaucher E. (2011) Modulation of retinal blood flow by kinin B1 receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res* 92: 482-489.
- Pouliot M, Talbot S, Sénécal J, Dotigny F, Vaucher E, Couture R. (2012) Ocular application of the kinin B₁ receptor antagonist LF22-0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS One* 7: e33864.
- Héту S, Pouliot M, Cordahi G, Couture R, Vaucher E. (2013) Assessment of Retinal and Choroidal Blood Flow Changes Using Laser Doppler Flowmetry in Rats. *Curr Eye Res* 38: 158-167.
- Almasieh M, Dong A, Pouliot M, Casanova C, Vaucher E, Kelly M, Di Polo A. Retinal microvasculature protection correlates with retinal ganglion cell survival and blood flow restoration in experimental glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [En révision]