

Université de Montréal

Évaluation du rôle du récepteur activin receptor like kinase type 1 dans un modèle de
néphropathie diabétique

Par

Cindy Paola Lora Gil

Programme de sciences biomédicales, Faculté de médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M.Sc.)
en Sciences Biomédicales, option Sciences Cardiovasculaires

Août 2019

© Cindy Lora Gil, 2019

Université de Montréal

Programme de sciences biomédicales, Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé

***Évaluation du rôle du récepteur activin receptor like kinase type 1 dans un modèle de
néphropathie diabétique***

Présenté par

Cindy Paola Lora Gil

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Casimiro Gerarduzzi

Président-rapporteur

Dr. Bruno Larrivée

Directeur de recherche

Dr. Vincent Pichette

Codirecteur

Dr. John Chan (CRCHUM)

Examineur externe

Résumé

La néphropathie diabétique est l'une des complications les plus fréquentes chez les patients diabétiques à long terme, et est la première cause du besoin de dialyse. Les lésions glomérulaires semblent jouer un rôle clé dans le développement de la néphropathie diabétique. L'épaississement de la membrane basale glomérulaire, l'hypertrophie des cellules glomérulaires et la perte de podocytes font partie des principaux changements pathologiques survenant au cours de la néphropathie diabétique et peuvent conduire à une protéinurie.

Il a été suggéré que le dysfonctionnement endothélial joue un rôle important dans la pathogenèse des lésions glomérulaires au cours de la maladie rénale diabétique. En effet, l'altération de la fonction et de l'intégrité des cellules endothéliales glomérulaires est l'une des principales causes de la microalbuminurie observée dans l'insuffisance rénale diabétique précoce. Les lésions des cellules endothéliales glomérulaires peuvent endommager les podocytes et même induire une perte podocytaire ce qui aggrave d'avantage les liaisons des cellules endothéliales glomérulaires et ainsi de suite. Actuellement, les traitements de la néphropathie diabétique visent le contrôle de la glycémie et de la pression artérielle dans le but de maintenir un bon débit de filtration glomérulaire. Cependant, l'étude de traitements pouvant cibler les lésions endothéliales ou les interactions podocyte-cellule endothéliales, qui jouent un rôle essentiel dans la progression de la maladie rénale diabétique, est nécessaire.

Les traitements ciblant l'endothélium glomérulaire pourraient offrir des avantages thérapeutiques pour la néphropathie diabétique. En effet, des facteurs anti-angiogéniques tels que les inhibiteurs du VEGF pourraient prévenir les lésions rénales et les altérations glomérulaires sur des modèles de souris diabétiques. Cependant, d'autres données ont montré que des injections d'inhibiteurs du VEGF pouvaient être néfastes pour les cellules endothéliales et podocytaires. Ainsi, de nouvelles molécules ciblant l'endothélium vasculaire pourraient améliorer le pronostic et la qualité de vie chez les patients présentant une insuffisance rénale diabétique à un stade précoce. Nous avons précédemment montré que Alk1, avec son ligand BMP9, joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité vasculaire chez les animaux diabétiques. En effet,

la perte de signalisation d'Alk1 chez les animaux diabétiques conduit à la dissociation des jonctions vasculaires et à une augmentation des fuites vasculaires dans la rétine. Compte tenu de son rôle dans le maintien de la quiescence et de l'intégrité de l'endothélium, nous avons évalué les effets de la suppression d'Alk1 sur l'intégrité de l'endothélium glomérulaire et la fonction rénale chez la souris diabétique.

Nous avons utilisé des souris avec délétion conditionnelle de Alk1 dans l'endothélium (Alk1 Δ EC) pour évaluer le rôle de Alk1 dans la filtration glomérulaire chez des souris diabétiques induits par le STZ. Les souris ont été euthanasiées quatre mois après le début du diabète et des analyses sérologiques et urinaires ont été effectuées, ainsi que des études immunohistochimiques. Nous avons démontré que l'haplo-insuffisance d'Alk1 aggrave la microalbuminurie et induit une perte de podocytes chez des souris diabétiques. De plus, une augmentation significative de l'apoptose glomérulaire a été observée chez les souris Alk1 Δ EC hétérozygotes diabétiques. L'analyse de souris Alk1 Δ EC homozygotes non diabétiques a également révélé une perte importante de cellules endothéliales glomérulaires. Ensemble, ces données suggèrent que la signalisation du récepteur Alk1 joue un rôle essentiel dans le maintien des cellules endothéliales glomérulaires et participe au maintien de l'intégrité glomérulaire à travers un mécanisme de podocyte-endothelial cross-talk.

Mots-clés : Néphropathie, diabète, podocyte, cellules endothéliales, micro-vaisseaux.

Abstract

Diabetic kidney disease one of the most frequent microvascular long-term complications in diabetic patients and is the first cause for the need for dialysis. The glomerular damage seems to play a key role in the development of diabetic nephropathy. Thickening of the glomerular basement membrane, glomerular cell hypertrophy, and podocyte loss is among the main pathological changes occurring during diabetic nephropathy and can lead to proteinuria.

Endothelial dysfunction has been suggested to play an important role in the pathogenesis of glomerular damage during diabetic kidney disease. Indeed, alteration of the glomerular endothelial cell function and integrity is a leading cause of microalbuminuria observed in early diabetic kidney disease. Injury to glomerular endothelial cells may lead to podocyte damage, while podocyte loss further exacerbates glomerular endothelial cell injury, forming a vicious cycle. Currently, therapies in diabetic nephropathy are focusing on glycemia control and adequate arterial pressure levels in order to maintain an adequate glomerular filtration rate. However, the study of some treatments that may target endothelial lesions or podocyte-endothelial cell interactions, which play a vital role in the progression of diabetic kidney disease is necessary.

It has been suggested that antiangiogenic treatments for diabetic kidney disease could provide therapeutic benefits. Indeed, anti-angiogenic factors such as VEGF inhibitors have been demonstrated to suppress renal damage and glomerular alterations in a diabetic mouse model. However, some other data have shown that anti-VEGF injections could be detrimental for podocytes and endothelial cells. Thus, new molecules targeting the vascular endothelium could possibly improve prognosis and quality of life in patients with early stages of diabetic kidney disease.

We have previously shown that Alk1, along with its ligand BMP9, plays an important function to maintain vascular integrity in diabetic animals. Loss of Alk1 signaling in diabetic animals led to dissociation of vascular junctions and increased vascular leakage. Given its role in the maintenance of endothelial quiescence and integrity, we evaluated the effects of Alk1 suppression on kidney integrity and renal function in diabetic mice.

We used mice with conditional deletion of Alk1 in the endothelium (Alk1 Δ EC) to evaluate the role of Alk1 in glomerular filtration in STZ-induced diabetic mice. Mice were euthanized four months after the onset of diabetes and urine, and serological analyzes were performed, along with immunohistochemical studies. We demonstrated that Alk1 haploinsufficiency worsens microalbuminuria and induces podocyte loss. Furthermore, a significant increase in glomerular apoptosis was observed in Alk1 Δ EC mice. Analysis of homozygous Alk1 Δ EC mice also revealed a significant loss of glomerular endothelial cells. Together, these data suggest that Alk1/BMP9 signaling plays a critical role in the maintenance of glomerular endothelial cells and has important functions to maintain glomerular integrity through a crosstalk podocyte-endothelial mechanism.

Keywords : Nephropathy, diabetes, podocyte, endothelial cells, microvessel.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract	5
Table des matières	7
Liste des tableaux.....	13
Liste des figures.....	14
Liste des sigles et abréviations.....	16
Remerciements	19
Avant-propos.....	20
Chapitre 1 – Introduction à l’anatomie et physiologie rénale	22
1.1 Anatomie rénale	22
1.2 Anatomie rénale	23
1.2.1 Le Néphron	24
1.2.2 Corpuscule rénal glomérulaire	24
1.2.3 Endothélium rénal.....	25
1.2.4 Épithélium rénal spécialisé : Les podocytes.....	27
1.2.5 Interactions Podocyte-Cellule endothéliale.....	28
1.2.6 Diaphragme glomérulaire et podocyte-endothelial cross-talk.....	28
1.2.7 Tubule contourné proximal (TCP)	29
1.2.8 L’anse d’Henle	30
1.3 Équilibre hydro électrolytique	30
1.4 Système Rénine- Angiotensine- Aldostérone (SRAA).....	31
Chapitre 2 – Diabète, approche thérapeutique et complications à long terme.....	33

2.1	Diabète Mellitus	33
2.2	Classification du diabète.....	33
2.3	Critères diagnostiques du diabète.....	33
2.4	Approche thérapeutique du diabète.....	34
2.4.1	Approche thérapeutique pour le diabète de type 1	34
2.4.2	Approche thérapeutique pour le diabète de type 2	35
2.4.3	Objectifs thérapeutiques du diabète	37
2.4.4	Rôle des objectifs thérapeutiques non accomplis dont les complications micro et macrovasculaires.....	39
2.5	Le dommage endothélial : principal médiateur des complications vasculaires liées au diabète.....	39
2.6	Complications macro-vasculaires du diabète.....	41
2.6.1	Artériosclérose et risque accru d'infarctus	41
2.7	Complications macro-vasculaires du diabète.....	41
2.7.1	Rétinopathie diabétique	41
2.7.2	Rétinopathie diabétique	42
Chapitre 3 – Physiopathologie de la néphropathie diabétique et le rôle du dommage endothélial comme élément déclenchant de cette complication		44
3.1	Néphropathie diabétique	44
3.2	Physiopathologie de la néphropathie diabétique	45
3.3	Rôle des podocytes dans la pathogenèse de la néphropathie diabétique	46
3.3.1	Altération du diaphragme glomérulaire : Mécanisme d'effacement du Néphrine	47
3.4	La diaphonie pathologique entre CE et podocytaires : Est-il le lien manquant pour expliquer l'albuminurie dans la ND?.....	48
3.4.1	Classification pathologique de la néphropathie diabétique (selon l'ASN)	50

3.4.2	Modèles de souris dans la néphropathie diabétique	51
3.5	Critères de validation des modèles de néphropathie diabétique.....	52
3.6	Marqueurs de la fonction rénale.....	53
3.6.1	Créatinine	53
3.6.2	Albumine urinaire.....	53
3.6.3	Ratio Albumine-Créatinine sérique	53
3.6.4	Urée sanguine	54
3.6.5	Débit de Filtration glomérulaire (DFG/Glomerular Filtration Rate/ GFR).....	54
3.6.6	Calcul de la clairance de la créatinine pour mesurer le DFG dans la néphropathie diabétique	55
3.7	Approche thérapeutique dans la néphropathie diabétique	56
3.7.1	Contrôle intensif de la glycémie.....	56
3.7.2	Contrôles intensifs de la pression artérielle.....	56
3.7.3	Cible thérapeutique pour le contrôle de la Pression artérielle : blocage de système rénine- angiotensine- aldostérone.....	57
3.7.4	Abaissements des lipides	57
3.7.5	Modifications du mode de vie.....	57
3.8	Cibler le dommage endothélial dans la ND: est-ce qu'on déjà rendu là?	58
3.9	Les Anti-VEGF semblent ne pas être la meilleure option thérapeutique pour cibler les dommages endothéliaux dans la ND	59
3.9.1	Le facteur de croissance transformant - $\beta 1$ dans la ND.....	61
3.9.2	Activation et dérégulation de la signalisation TGF- $\beta 1$ / Smad dans le ND	61
3.9.3	SMADs dans le diabète et l'obésité.....	62
3.9.4	Dompage de la membrane basale glomérulaire dans la ND	62
Chapitre 4 – Signalisation Alk1/BMP9 : Superfamille, fonction et rôle dans l'endothélium		64

4.1	L'endothélium : un organe multifonctionnel	64
4.2	Le dysfonctionnement endothélial.....	64
4.2.1	Dysfonction endothéliale, début de l'angiogenèse anormale dans la néphropathie diabétique :	65
4.3	La super famille des TGF- β	65
4.3.1	Caractéristiques des récepteurs de la famille TGF- β	66
4.3.2	Activin receptor like kinase 1 (ALK1).....	66
4.3.3	Rôle d'ALK1 dans l'angiogenèse.....	67
4.3.4	Gènes régulés par ALK1.....	68
4.3.5	TGF- β et ces voies de signalisation intracellulaires canoniques et non canoniques ...	69
4.3.6	Les co-récepteurs de TGF- β : Les activines et GDF activant SMAD2 /3	70
4.4	La sous-famille des BMPs	70
4.4.1	Gènes cibles pour les BMPs	71
4.4.2	BMP9	71
4.4.3	Voie de signalisation Alk1/BMP9 dans les cellules endothéliales	72
4.4.4	Signalisation Alk1/ BMP9 canonique	72
4.4.5	BMP9 / BMP10/Endogline dans la signalisation d'Alk1	73
4.4.6	Signalisation Alk1/BMP9 non canonique	73
4.4.7	SMADS	73
4.4.8	Perte de fonction de la signalisation Alk1 dans l'endothélium.....	74
4.4.9	La délétion d'Alk1 favorise l'apoptose des cellules endothéliales.....	75
4.4.10	Perte d'Alk1 augmente la synthèse de matrix extracellulaire	75
4.5	Inhibition de la voie Alk1/BMP9 comme cible thérapeutique	76
4.5.1	L'anticorps anti-hALK1 comme une cible thérapeutique.....	76

4.5.2 L'inhibition de la signalisation ALK1 en utilisant le dalantercept	76
4.5.3 L'anticorps anti-BMP9 comme une cible thérapeutique	77
Chapitre 5 – Contexte du projet, hypothèse et objectif de recherche.....	79
5.1 Problématique	79
5.2 Contexte du projet du projet.....	80
5.3 Hypothèse de recherche	81
5.4 Objectifs de recherche.....	81
Chapitre 6 – Premier article scientifique (premier auteur)	82
6.1 Abstract.....	83
6.2 Introduction	84
6.3 Material and Methods:.....	86
6.4 Results.....	89
6.5 Discussion	101
Acknowledgements	104
Duality of Interest.....	104
Author contributions.....	104
Chapitre 7 – Discussion des résultats du projet.....	105
7.1 Mécanismes physiopathologiques : microalbuminurie dans les souris Alk1 Δ EC hétérozygotes.....	106
7.1.1 L'hyperglycémie chronique diminue la signalisation d'Alk1	107
7.1.2 Perte partielle d'alk1 et l'apoptose glomérulaire	108
7.2 On est déjà prêt pour l'utilisation préclinique ou clinique de molécules ciblant le dysfonctionnement endothélial dans la ND ?.....	108
7.3 La mesure de marqueurs de la DE dans la néphropathie est-elle valable ?	109

7.4 La dysfonction endothéliale seule provoque-t-elle la microalbuminurie ?	110
7.5 Microalbuminurie et DFG normal sont-ils possibles ?	111
7.6 Début du dysfonctionnement endothélial dans la ND.....	112
7.7 Potentiel thérapeutique de la voie ALK1/BMP9	112
7.7.1 Alk1 pour traiter le cancer. Quoi dire de son utilisation dans la ND ?.....	113
7.7.2 Thérapie avec Anti-bmp9 dans le cancer	113
7.7.3 Perspectives : Alk1/BMP9 : potentiel cible thérapeutique dans la ND	114
7.8 Conclusion du projet	114
Chapitre 8 – 2eme Article scientifique (3e auteur).....	116
8.1 Abstract	117
8.2 Introduction.....	118
8.3 Materials and methods	121
8.4 Results	125
8.5 Discussion	139
8.6 Conclusion	141
Highlights.....	141
Acknowledgements.....	142
Sources of Funding	142
Références bibliographiques.....	143
Annexes	174
Donnes supplémentaires 1er article	174
Donnes supplémentaires 2eme article	179

Liste des tableaux

Table 2.1. Critère diagnostique du diabète.....	34
Table 2.2. Objectifs thérapeutiques dans le diabète	38
Table 3.1. .Classifications de la maladie rénale chronique	55
Table 3.2. Inhibiteurs du VEGF	59

Liste des figures

Figure 1.1. Anatomie du rein.....	23
Figure 1.2. Anatomie du néphron.	24
Figure 1.3. Anatomophysiologie du glomérule.....	26
Figure 1.4. Podocytes par microscopie électronique à balayage.	27
Figure 1.5. Aperçu du cross-talk entre cellules endothéliales et podocytes..	29
Figure 1.6. Filtration-réabsorption et excrétion tubulaire.....	30
Figure 1.7. Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA).	32
Figure 2.1. Approche thérapeutique du DM type 1.....	35
Figure 2.2. Approche thérapeutique du DM type 2.....	37
Figure 3.1. Aperçue générale du dommage endothélial dans la néphropathie diabétique.....	46
Figure 3.2. Physiopathologie de la néphropathie diabétique.....	48
Figure 3.3 Podocyte/endothélial cross-talk dans la pathogenèse de la néphropathie diabétique	49
Figure 4.1 Signalisation du récepteur Alk1	74
Figure 4.2 Anti-ALK1 sur des essais cliniques pour le traitement des tumeurs solides dans le cancer	78
Figure 5.1. La perte partielle d'alk1 augmente la perméabilité vasculaire	80
Figure 6.1. Expression of Alk1 in mouse kidney tissue..	90
Figure 6.2. Evaluation of albuminuria in Alk1 Δ EC \pm diabetic mice.	92
Figure 6.3. Alk1 haploinsufficiency exacerbates collagen IV matrix accumulation and podocyte injury indicator desmin in diabetic mice.	94
Figure 6.4. Effects of Alk1 haploinsufficiency on podocytes and endothelial cells in non-diabetic or diabetic wild-type and diabetic Alk1 Δ EC \pm mice Immunofluorescence analysis of WT-1.....	96
Figure 6.5. Increased glomerular apoptosis in diabetic Alk1 Δ EC \pm mice.	97
Figure 6.6. Effects of Alk1 Δ EC homozygote deletion on renal function.	99
Figure 6.7. Effects of Alk1 homozygous deletion on podocytes and endothelial cells in wild-type and Alk1 Δ EC \pm mice.....	100

Figure 7.1 Resumée graphique du projet : Évaluation du rôle du récepteur Activin receptor like kinase type 1 dans un modèle de néphropathie diabétique.	115
Figure 8.1. Hyperglycemia inhibits BMP9/Alk1/Smad1,5,9 signaling In vivo and In vitro in endothelial cells.	127
Figure 8.2. Endothelial-specific loss of Alk1 exacerbates retinal permeability.	130
Figure 8.3. BMP9 prevents vascular permeability in the hyperglycemic endothelium.....	132
Figure 8.4. BMP9/ALK1 inhibits VEGF-induced permeability via inhibition of VEGF signalling in endothelial cells.	137
Figure 8.5. BMP9/ALK1 activation stabilizes levels and membrane colocalization of VE-cadherin and Occludin in hyperglycemic cultured Ecs.....	138
Supplementary Figure 6.1. Glomerular expression of Alk1 in control and diabetic nephropathy patients.....	174
Supplementary Figure 6. 2. Characterization of Alk1 Δ EC+/- diabetic mice.....	175
Supplementary Figure 6. 3. Analysis of electrolytes in non-diabetic and diabetic wild type and Alk1 Δ EC+/- mice eight weeks following STZ injections.....	176
Supplementary Figure 6.4. Analysis of electrolytes in wild type and Alk1 Δ EC-/- seven days after tamoxifen delivery.....	177
Supplementary Figure 6. 5. Effect of Alk1 suppression on the expression of basement membrane genes	178
Supplementary Figure 8.1. BMP9 signaling in hyperglycemic conditions.	179
Supplementary Figure 8.2. Deletion of Alk1 in Alk1 Δ EC mice.	181
Supplementary Figure 8.3 Effects of BMP9 on vascular permeability.....	182
Supplementary Figure 8.4 BMP9 inhibits VEGF signaling in HRMECs	184
Supplementary Figure 8.5 Effect of BMP9 on endothelial junctions.....	185
Supplementary Figure 8.6 Graphic description of the main findings of the study.....	186

Liste des sigles et abréviations

ACE: American college of endocrinology

ACEI: Angiotensin Converting enzyme inhibitors

ADA : American diabetes association

ADH : Antidiuretic hormone

AGE: Advanced Glycation End Products

Alk1: Activin Receptor like kinase type 1

Alk1-7: Activin receptor like kinase 1 to 7

AMH : Anti-Mullerian Hormone

anti-VEGF: anti-vascular endothelial growth factor

AR: Aldose reductase

ARA: Angiotensin-Receptor antagonist

ARB : Angiotensin II receptor blocker

ASN: American society of nephrology/ Société américaine de néphrologie

BMP : Bone morphogenetic protein

BMP9: Bone morphogenetic Protein nine

DFG: Débit de filtration glomérulaire

DKD : Diabetic kidney disease

DM: Diabetes mellitus

DE : Dysfonction endothéliale

EBI : European Bioinformatics Institute

GDF : Growth differentiation factor

GFR : Glomerular filtration rate

HbA1c : Hemoglobine glyquée

HHT : Hereditary hemorrhagic telangiectasia

MBG : Membrane basale glomérulaire

MIS : Mullerian inhibiting substance/ substance inhibitrice de Müller

ND: Néphropathie diabétique

PAH : Pulmonary arterial hypertension/ hypertension artérielle pulmonaire

PKC : Protein kinase C

ROS : Reactive oxygen species

Scr : créatinine sérique

SRAA : Système Rénine- Angiotensine- Aldostérone

TA : Tension artérielle

TCD : Tubule contourné distal

TCP : Tubule contourné proximal

TGF- β : Transforming growth factor beta

UKDPS: United Kingdom diabetes prospective study

US: United States

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Gracias a Dios por sus infinitas bendiciones. A mi familia, a mis hermanos, a Tania Gil y Pablo Lora. A Daniel y Valerie. Ustedes hicieron que todo esto valiera la pena. A mi esposo a quien amo. Y bien especialmente a mis pacientes quienes son el motor de mi continuo aprendizaje

Remerciements

Je tiens à remercier à mon superviseur Bruno Larrivée de m'avoir accueillie et entraînée pendant ces deux années de maîtrise. Pour m'avoir donné temps et connaissance. Pour avoir été un excellent mentor, conseiller et mon père en recherche pendant toute ma formation professionnelle. À mon co-superviseur Dr. Vicent Pichette pour son orientation et soutien, pour les réunions pleines de bonne énergie et motivation. À Nathalie Henley pour sa collaboration et son professionnalisme. À tous les membres du laboratoire, Nat, Erika, Naoufal et Claire pour m'avoir montré ce nouveau monde de la science de base remplie des nouvelles techniques. Merci de m'avoir transmis toutes leurs connaissances et surtout pour être toujours là pour moi. Un gros merci à tout le gang !

Du tout fond de mon cœur à mon Chéri, Jose, l'amour de ma vie, pour ton soutien, ton appui, ton écoute et tes conseils, pour les week-ends de travail ensemble, pour les bons moments et pour toute ton aide à la réalisation de ce projet. Toute ma reconnaissance pour toi mon amour.

À ma famille... Ma mère Tania Gil qui est l'inspiration de ma vie, une femme travailleuse et disciplinée, à mon père qui m'a appuyé à travers la distance ' Mija, stp il faut que tu sois toujours humble, il ne faut jamais perdre l'humilité' « rappelle-toi stp) ...

À mon frère Richard, qui m'a conseillé depuis le Chili et celui qui, en fin de compte, m'a convaincu de rester au Canada. À mes frères Junior et Yeison pour m'avoir fait sourire dans mes moments difficiles. À mes amis et collègues Yiyi, Brian et Ange, Jessi, Jose et Adri pour avoir cru en moi et pour leurs mots de motivation ... Pour toutes ces années d'amitié depuis qu'on s'est rencontré à la faculté de médecine il y a 10 ans.

Bien spécialement, à l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont pour m'avoir accueillie comme stagiaire de Maîtrise. Et bien sûr à l'Université de Montréal pour avoir fait de mes rêves une réalité en me donnant la bourse d'exemption des droits de scolarité.

À vous tous ! Merci de tout au fond de mon cœur.

Avant-propos

Qu'en sera-t-il d'un médecin sans sa curiosité scientifique ?

En tant que médecin, on acquiert un engagement inhérent à ce métier : s'entraîner constamment pour offrir le meilleur à nos patients. La vaste connaissance faisant partie de la médecine nous oblige à rigoureusement interpréter les signes et symptômes des patients pour avoir un diagnostic. Un jour, je me suis posé la question suivante : Et si tout ce que l'on voyait chez nos patients n'était rien de plus que la somme de ce qui se passait à l'intérieur d'une petite cellule et de la synthèse de protéines ? et si tout cela se reproduisait simplement dans l'intégralité du corps jusqu'à ce que le résultat devienne évident à nos yeux ? J'ai travaillé en Colombie, mon pays d'origine, dans une zone où l'accès aux services de santé était restreint, raison pour laquelle les taux de complications micro et macrovasculaires causés par le diabète étaient très élevés. Je voulais offrir un traitement alternatif à mes patients, autre/meilleur ? que celui que nous avions déjà, qui me permettrait de leur dire que l'espoir était toujours là malgré leur maladie chronique.

Pour ce faire, il me fallait avant tout mieux comprendre l'origine du problème : le dommage vasculaire. Je voulais saisir les mécanismes existant au niveau cellulaire capables de causer autant de dommages afin de penser à un nouveau traitement pour mieux gérer les complications du diabète. Dans le but de répondre à ma question, je voulais découvrir plus en détails pourquoi j'avais autant de patients avec des complications micro et macrovasculaires liées au diabète ? Qu'est ce qu'il se passe à l'intérieur de leurs corps, de leurs organes ? Pourquoi autant d'amputations et de dialyses ?

Convaincue qu'il restait encore beaucoup de choses à faire, j'ai écrit au laboratoire du Dr. Bruno Larrivee où j'ai fait un stage d'été en 2016. Son projet me fascinait, me permettant de mieux comprendre le rôle d'une protéine appelée Alk1 (Activin receptor like kinase type 1) dans la néphropathie diabétique. Bien qu'Alk1 jouât un rôle partiel dans toute cette histoire des complications micro et macro vasculaires liées au diabète, j'avais l'opportunité de me lancer vers l'univers spectaculaire des protéines et des molécules tout en cherchant la compréhension du mécanisme physiopathologique du diabète et ses complications qui me tenait à cœur. J'ai donc

commencé ma maîtrise en sachant que ce chemin ne pouvait que m'apporter de bonnes choses professionnellement.

Entant que clinicienne, j'avais acquis une vaste connaissance des maladies vasculaires et diabète ce que je voulais compléter avec cette formation. Cette connaissance acquise toute au long de ma pratique clinique, elle n'était pas la mienne seulement, mais celle de tous les pères, mères et enfants que j'ai eues comme patients lors de mon exercice comme médecin, à qui j'ai toujours donné le meilleur de moi-même. Ces eux, qui m'ont donné le courage nécessaire pour continuer mon chemin de croissance professionnelle.

Je conclurai cette réflexion en disant que j'ai pris la décision de faire une maîtrise considérant que j'avais beaucoup à apprendre sur l'application de la science fondamentale en médecine. J'ai aussi contemplé le bénéfice que mes patients pourront avoir lorsqu'ils se retrouveront devant un médecin avec formation clinique-scientifique qui peut les diagnostiquer et les traiter avec une approche clinique plus complète grâce à ces compétences.

Aujourd'hui, j'encourage mes collègues et les prochaines générations de médecins à profiter de cette diversité de la médecine, et je vous encourage à découvrir, à vous diversifier et surtout à comprendre l'interdisciplinarité de notre profession. Pour moi, cette réflexion m'aide à comprendre comment la curiosité scientifique d'un médecin peut être le début d'une grande découverte.

Finalement, j'ai compris comment la science et la médecine peuvent aller dans la même direction: la production de nouvelles connaissances scientifiques afin de donner le meilleur à nos patients.

Avec la satisfaction du devoir accompli.

Cindy Lora Gil M.D. M.Sc Candidate

Sciences biomédicales, Université de Montréal.

Omnia vincit amor/ Primum non nocere

Chapitre 1 – Introduction à l'anatomie et physiologie rénale

1.1 Anatomie rénale

L'ensemble du système urinaire est composé des reins, des uretères et de la vessie. Les reins sont des organes rétropéritonéaux, protégés par des muscles et du tissu adipeux. ¹ Responsables de la filtration du plasma à un taux de 120ml par min, équivalent à 185 litres par jour², ils reçoivent entre 20 à 25% du débit cardiaque total. Les reins jouent un rôle crucial dans le maintien de l'équilibre acido-basique, le contrôle de la pression artérielle (à travers le système rénine angiotensine, aldostérone), l'excrétion des déchets comme l'urée et l'ammonium ainsi que dans la formation de l'urine.³ Ils sont divisés en deux parties principales : le cortex qui est la partie périphérique du parenchyme, et la médulla, qui correspond à la partie centrale (Figure 1.1). Dans le cortex se trouve l'unité fonctionnelle du rein (le néphron) qui est composée d'un vaste réseau de vaisseaux sanguins, appelé glomérule ou corpuscule rénal. Ce cortex est également composé de tubules rénaux qui sont responsables de la réabsorption des solutés dans le corps. De plus, l'érythropoïétine, impliquée dans la génération des érythrocytes ^{4,5} est synthétisée dans le cortex rénal.

La médulla est en grande partie responsable de la concentration de l'urine. Elle est divisée en plusieurs sections, appelées pyramides rénales ou de Malpighi. Ces pyramides sont formées principalement par des tubules collecteurs, dont l'ensemble forment le calice mineur.^{6,7} L'ensemble des trois calices mineurs forment les calices majeurs qui constituent la pelvis rénal où l'urine passera avant d'être redirigée vers la vessie où elle sera finalement excrétée.

Le sang pénètre dans le rein par l'artère rénale, qui se sépare ensuite pour former les artères interlobaires. Ces artères se ramifient en artères arquées, qui se ramifient elles-mêmes en artères interlobulaires atteignant les glomérules⁸.

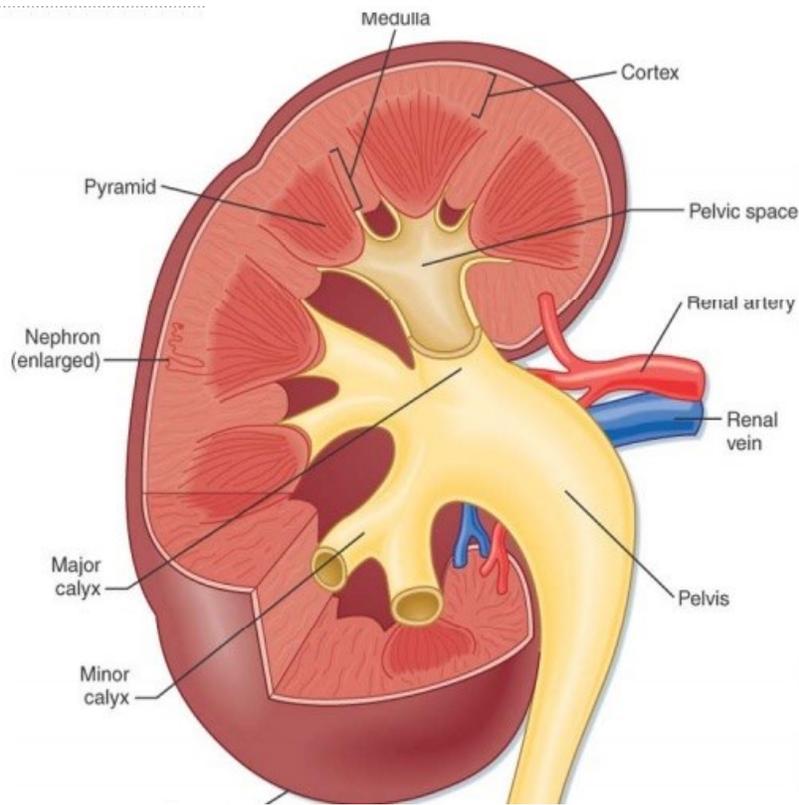


Figure 1.1. Anatomie du rein. Tiré du site web University of Chicago (Renal anatomy chapter)⁹

1.2 Anatomie rénale

Les reins exercent principalement une fonction de filtration, ils font partie des organes les plus importants du corps humain. Ils permettent aussi le maintien d'une pression artérielle optimale en régulant le système rénine-angiotensine-aldostérone. Les reins jouent un rôle fondamental dans l'élimination des produits métaboliques indésirables et assurent l'équilibre acido-basique et l'équilibre électrolytique. Ainsi, les reins contribuent à maintenir un pH sanguin adéquat et l'homéostasie des fluides de notre organisme¹⁰. Le sang filtré au travers des reins provient de l'artère rénale, qui se ramifie en de petites branches jusqu'au cortex rénal, en formant un groupe de vaisseaux sanguins étroits dans le néphron. La filtration du sang a lieu dans le glomérule, qui est un vaste réseau de vaisseaux sanguins formés par les artéioles rénales afférente et efférents, formant le néphron, (l'unité fonctionnelle du rein.) Une fois le sang filtré, il retourne par la veine rénale alors que les déchets sont acheminés vers la vessie en passant par les uretères pour être éliminés¹¹.

1.2.1 Le Néphron

Le néphron constitue l'unité de filtration et de réabsorption du rein et est situé dans le cortex rénal. Un rein adulte contient en moyenne de 1 million à 2,5 millions de néphrons ¹². Les structures principales du néphron sont le glomérule, suivi du tubule contourné proximal, de l'anse de Henle et finalement du tubule collecteur. L'ensemble des tubules collecteurs convergent pour former le calice mineur qui deviendra à son tour le calice majeur et finalement le pelvis rénal qui forment les uretères. (Figure 1.2.). Le néphron est divisé en 2 parties principales : les glomérules et les tubules. Les glomérules sont constitués d'un vaste réseau de vaisseaux sanguins, alors que les tubules sont divisés en quatre sous-parties : le tubule contourné proximal, l'anse de Henle, le tubule contourné distal et les tubules collecteurs. ¹⁰. Étant donné la complexité de chacune de ces structures, elles seront décrites en détail ci-dessous:

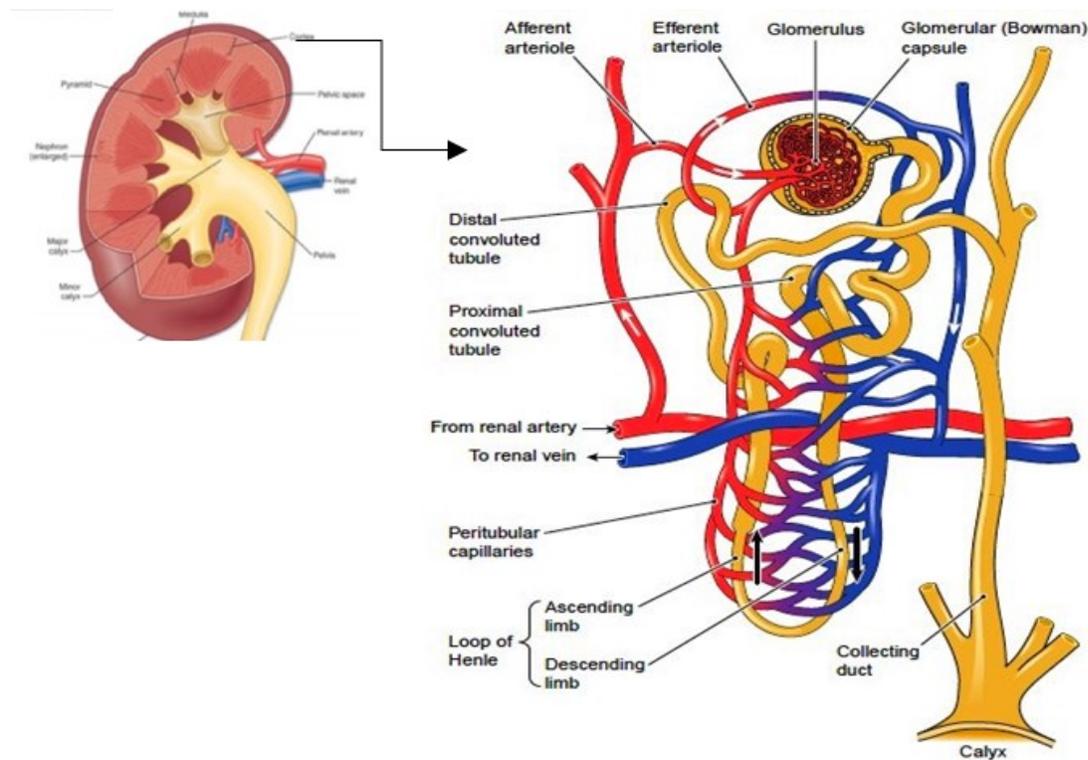


Figure 1.2. Anatomie du néphron. Tire de l'encyclopédie.lubopitko¹³

1.2.2 Corpuscule rénal glomérulaire

Le glomérule constitue la première structure du néphron. Il est composé d'un vaste réseau de petits vaisseaux sanguins, ou capillaires glomérulaires, qui proviennent de l'artériole rénale. Ce

réseau est constitué de l'artériole rénale afférente qui rentre dans le glomérule et d'une artériole rénale efférente. Ce processus prend place grâce à des forces physiques et dynamiques qui déterminent la filtration glomérulaire.¹⁰ La première structure localisée à l'entrée de chaque glomérule est l'appareil juxtaglomérulaire. Ce sont des cellules qui tapissent majoritairement l'artériole afférente. Cet appareil est composé par un mésangium extraglomérulaire et un mésangium tubulaire qui correspond à la macula dense. Les cellules de cet appareil constituent une source exclusive de rénine qui est en circulation. Normalement, la production de rénine par ces cellules suffit à maintenir l'homéostasie et une tension artérielle normale.¹⁴ Les capillaires glomérulaires sont chacun contenus dans la capsule de Bowman, appelée aussi capsule glomérulaire. Ce sont les seuls capillaires dans le corps qui ne sont pas entourés d'une matrice extracellulaire. Par conséquent, une structure de soutien unique composée de 3 couches est nécessaire pour maintenir l'échange de molécules essentielles et du plasma provenant de la circulation. La première couche est composée d'un endothélium fenêtré, caractérisé par la présence de fenêtres individuelles de l'ordre de 70 à 100 nm de diamètre. Cet endothélium recouvre la lumière du capillaire et permet le passage des molécules de poids moléculaire faible.¹⁰ La deuxième couche du filtre, la membrane basale glomérulaire (MBG), est un maillage complexe de protéines extracellulaires, comprenant du collagène de type IV, des laminés, des fibronectines et des protéoglycanes. Cette membrane est recouverte par un épithélium viscéral spécialisé, les podocytes, ce qui correspond à la troisième couche de la membrane basal glomérulaire. (Figure 1.3)

1.2.3 Endothélium rénal

L'endothélium rénal est un endothélium fenêtré qui est grandement impliqué dans la régulation de la pression artérielle et du contrôle du tonus vasculaire ¹⁵. En effet, à l'entrée du glomérule plus précisément dans l'artériole glomérulaire afférente, cet endothélium rénal est composé de cellules qui sont sensibles aux changements de pression, appelées barorécepteurs. Par conséquent, le rein est particulièrement vulnérable aux altérations des fonctions endothéliales locales et aux changements de pression systémique. L'endothélium glomérulaire est recouvert d'une matrice extracellulaire spécialisée appelée membrane basale glomérulaire, composée

principalement de collagène de type IV, d'indigène et de protéoglycanes. Juxtaposé à cette membrane basale se retrouve un *épithélium viscéral spécialisé* dénommé *podocytes*.

La barrière de filtration glomérulaire est constituée de l'ensemble de ces deux types de cellules (podocytes et les cellules endothéliales), divisées par la membrane basale glomérulaire (MBG) ¹⁶. L'endothélium rénal a des caractéristiques structurelles et fonctionnelles spécifiques qui le protègent de la thrombose et de l'inflammation. Cependant, des mécanismes pathologiques comme le stress oxydatif, l'hyperglycémie soutenue ou la diminution de l'oxyde nitrique peuvent l'endommager entraînant des lésions rénales aiguës ou chroniques¹⁷. Ainsi, les traitements ciblant la prévention du dommage endothélial dans la maladie rénale chronique sont à la fois une nécessité et une nouvelle option de thérapie. Cependant, les stratégies thérapeutiques émergentes qui ciblent la réparation du dommage endothélial comme option de traitements dans la maladie rénale sont très limitées ¹⁸.

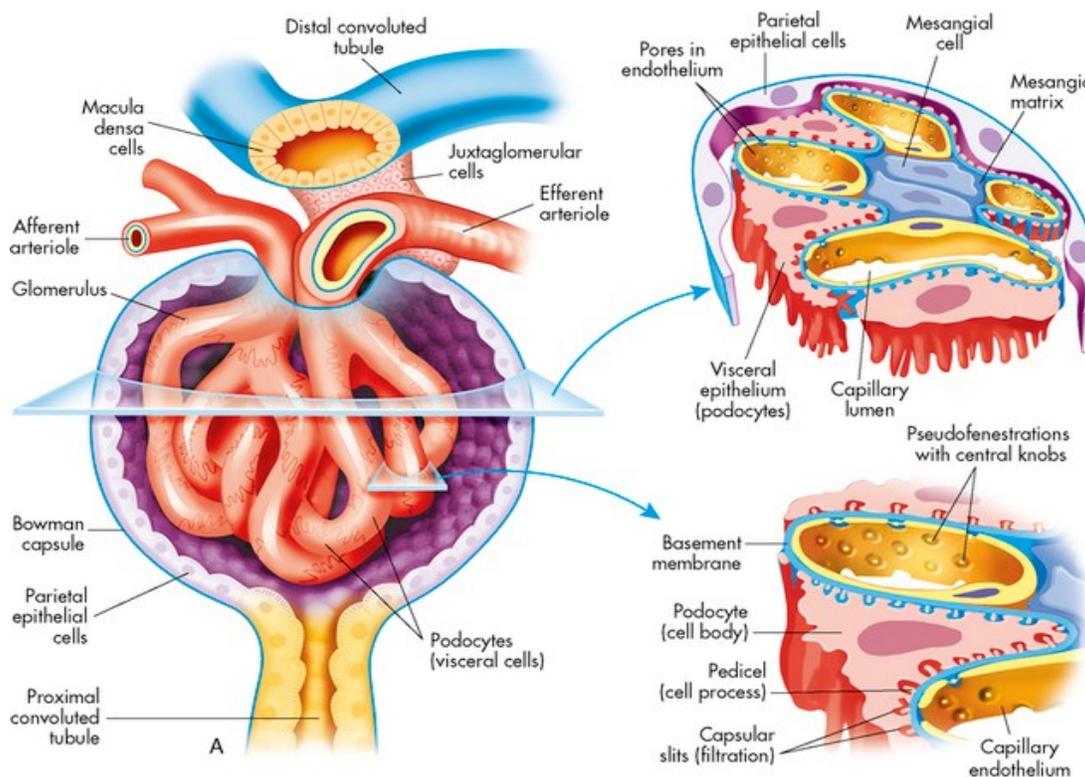


Figure 1.3. Anatomophysiologie du glomérule. Tiré de Khan Academy Renal physiology¹¹

1.2.4 Épithélium rénal spécialisé : Les podocytes

Les podocytes sont les cellules les plus remarquables du glomérule, puisqu'ils aident à créer une barrière de filtration très sélective en formant le diaphragme glomérulaire. Ils présentent des structures très complexes composées principalement d'un cytosquelette de filaments d'actine, ce qui leur confère une certaine mobilité.¹⁹ Les podocytes ont des structures qui ressemblent à des pieds, ils s'attachent entre elles pour former le diaphragme glomérulaire qui empêche le passage des protéines de haut poids moléculaire comme l'albumine, et qui permet de garder la membrane basale stable²⁰. (Figure 1.4). La troisième et dernière couche cellulaire est tapissée par des cellules mésangiales, qui contribuent à maintenir l'intégrité glomérulaire²¹. L'ensemble de ces trois couches forme la membrane basale glomérulaire une barrière physiologique efficace pour la filtration du sang empêchant notamment le passage des protéines dans l'urine²².

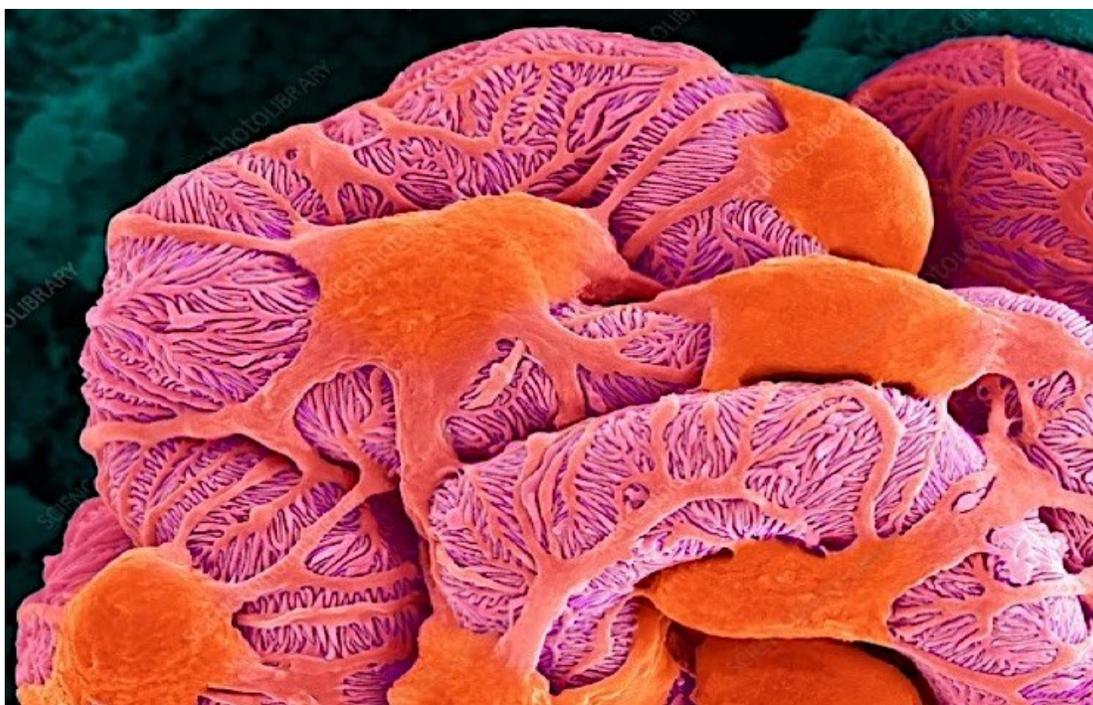


Figure 1.4. Podocytes par microscopie électronique à balayage. Tiré de sciences photo libraire web site²³. Le glomérule consiste en un réseau de capillaires très étroits et bien enroulés qui sont couverts par les podocytes. Ils sont un épithélium viscéral spécialisé qui constitue le principal composant de la barrière de filtration glomérulaire.

1.2.5 Interactions Podocyte-Cellule endothéliale

Au moment de la formation des néphrons, les cellules mésenchymateuses vont se regrouper pour former des vésicules, où vont apparaître des angioblastes, qui sont des précurseurs endothéliaux. Suite à une série de divisions, ces cellules vont devenir des mésangioblastes, qui se différencieront finalement en cellules endothéliales²⁴. Une autre partie de cette couche formera des cellules cylindriques qui se différencieront plus tard en podocytes, cellules formant un épithélium viscéral spécialisé qui reste en contact avec la membrane basale glomérulaire. L'interaction entre les cellules endothéliales et podocytes est cruciale pour le maintien de la membrane basale glomérulaire²⁰. Cette membrane est composée de nombreuses protéines matricielles, telles que le collagène de type IV, l'héparine sulfate, et des protéoglycanes (HSPGs). L'ensemble de ces trois structures (l'endothélium fenêtré, la membrane basale glomérulaire et les podocytes) constituent la barrière de filtration glomérulaire qui contrôle le passage de déchets vers la capsule ou espace de Bowman et est responsable du retour à la circulation des substances fondamentales pour la survie de l'organisme (Figure 1.4). L'interaction entre podocytes et cellules endothéliales a été étudiée dans plusieurs modèles tant *in vitro* qu'*in vivo*. Une co-culture de cellules endothéliales et de podocytes a démontré que l'interaction entre ces deux types cellulaires joue un rôle fondamental pour faciliter la différenciation podocytaire, ceci étant possible grâce à l'expression de marqueurs spécifiques à l'endothélium qui favorisent les interactions entre cellules endothéliales et podocytaires. Une fois différenciées, les podocytes ont une haute capacité pour capter plusieurs signaux provenant de leur microenvironnement, tel que le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et les intégrines, ce qui permet leur fonctionnement normal²⁵.

1.2.6 Diaphragme glomérulaire et podocyte-endothelial cross-talk

L'interaction ou **cross-talk** entre cellules endothéliales et podocytaires est possible grâce à une structure complexe nommée diaphragme glomérulaire. Il s'agit d'un système de jonctions cellulaires qui assure le bon fonctionnement de la membrane basale glomérulaire et demeure stable à l'aide de molécules d'adhésion comme la néphrine, la podocine et la P-cadhérine. Ce système permet l'adhésion des podocytes les uns aux autres grâce à des pédicelles composées principalement de filaments d'actine.^{19,26} (Figure 1.5.).

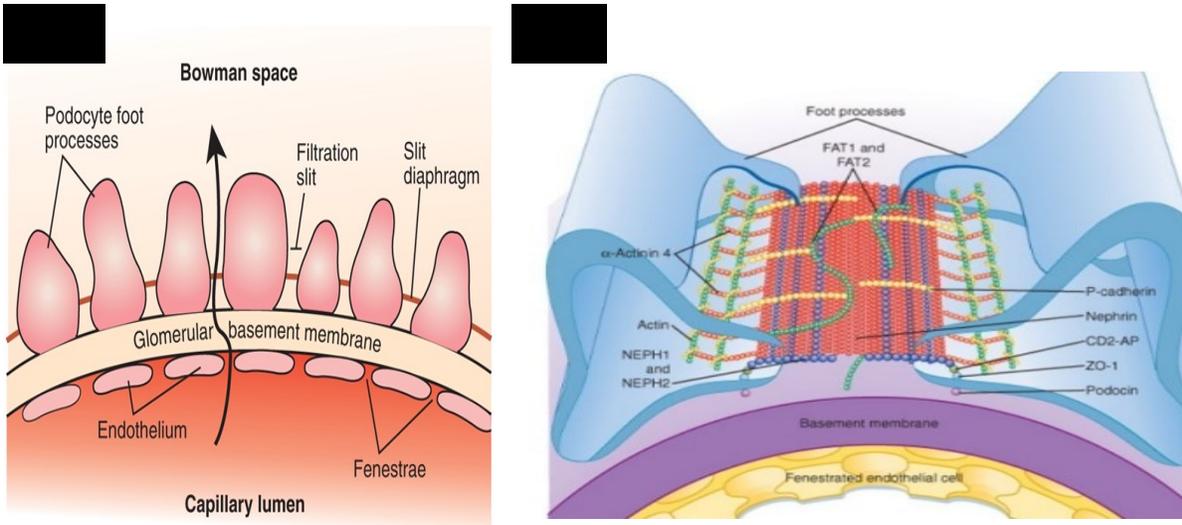


Figure 1.5. Aperçu du cross-talk entre cellules endothéliales et podocytes. A) Connexions entre cellules endothéliales et podocytes. B) Structure du diaphragme glomérulaire³⁰. Tiré de www.memorangapp.com (renal physiology chapter)³⁰(A). La membrane basale glomérulaire fonctionne comme un système de filtre qui permet le passage de molécules de faible poids moléculaire (<60kD) provenant du capillaire glomérulaire vers la capsule de Bowman. Ce passage se fait en présence des forces hydrostatiques qui permettent l'interaction entre les cellules endothéliales, la membrane basale et les podocytes (B). Le système de filtration demeure stable grâce au support des podocytes qui ont des jonctions cellulaires étroites et des molécules d'adhésion (nephrine, podocine, foot 1 et 2, Neph 1 et 2) situées dans les pédicelles podocytaires et soutenues par de petits filaments d'actine. Ces filaments donnent aux podocytes leur mobilité et plasticité, faisant de ce système (podocyte-EC) un de plus complexe et complet du glomérule.

1.2.7 Tubule contourné proximal (TCP)

La portion suivante du néphron est composée des tubules contournés proximaux. Ils sont caractérisés par leur proximité avec le glomérule et sont responsables de la réabsorption de 60-80% du NaCl et du Potassium, 70% de l'eau, ainsi que de la réabsorption d'autres électrolytes tel que le phosphate et le calcium. Les tubules proximaux réabsorbent également des molécules essentielles par exemple le glucose. Leurs cellules sont très actives métaboliquement et jouent un rôle fondamental dans le transport transmembranaire. À proximité du TCP se trouve l'anse de Henle. Il s'agit d'un tube à structure en forme de U qui contient différents segments qui ont différentes fonctions^{27,28,29}.

1.2.8 L'anse d'Henle

C'est au niveau de l'anse d'Henle que la concentration de l'urine prend place. Cette concentration doit être hyper osmotique en relation au plasma. Ceci implique un gradient d'osmolarité qui permet d'excréter les solutés avec une perte minimale d'eau. Ce gradient osmotique est formé par l'accumulation de solutés, principalement le NaCl et l'urée, dans les cellules, l'interstium, les tubules et vaisseaux de la médulla. L'anse de Henle est divisée en trois parties : un segment mince descendant qui est connecté au tubule contourné proximal et permet la réabsorption de Na^+ , Cl^- , K^+ . Ensuite il y a le segment mince ascendant ce qui est imperméable au sodium et réabsorbe l'eau par un mécanisme de transport passif^{10,11}. La dernière partie de l'anse de Henlé est nommer segment large ascendante contenant des pompes qui activement les ions sodium et chlorure et absorbent les ions potassium. (Figure 1.6.).

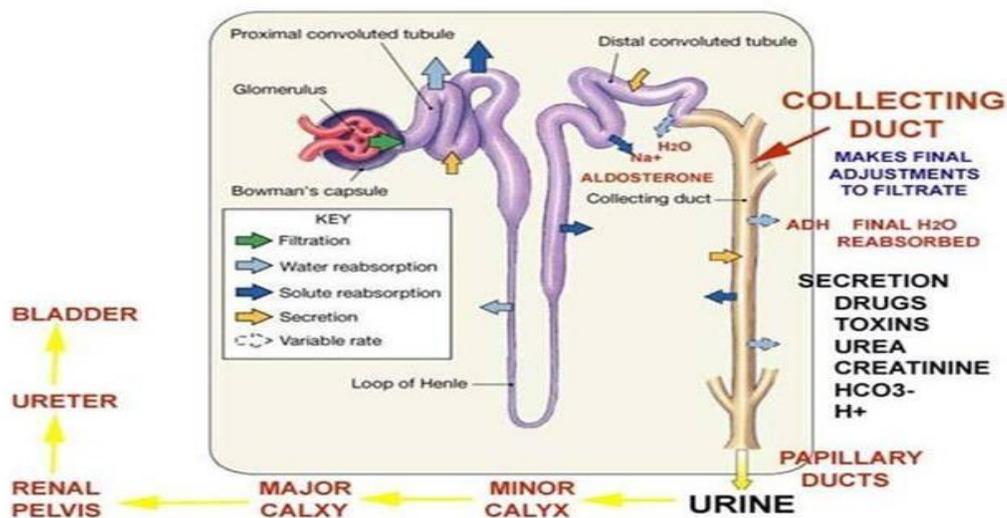


Figure 1.6. Filtration-réabsorption et excrétion tubulaire. Tiré de l'encyclopédie writeopinions (tubular reabsorption chapter)³⁴

1.3 Équilibre hydro électrolytique

L'équilibre de l'homéostasie ionique est essentiel pour assurer la survie. Le volume sanguin total est maintenu grâce à l'équilibre hydro électrolytique entre les principaux électrolytes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) et l'eau. La régulation hydro électrolytique a lieu dans les reins grâce à l'activation de canaux de Na^+ , K^+ et Cl^- et de transporteurs, ce qui permet l'équilibre des fluides corporels, le

contrôle du pH et de la pression artérielle³¹. Les changements de concentration urinaire sont principalement contrôlés par l'hormone antidiurétique (ADH), un peptide en grande partie sécrété par l'hypothalamus. L'activation de l'hormone antidiurétique permet la réabsorption de l'eau dans le tubule collecteur et produit une urine plus concentrée en relation au plasma pour garder l'équilibre hydroélectrolytique³⁶. Des modifications de l'osmolarité plasmatique ou du volume sanguin total peuvent stimuler l'activation la sécrétion de l'hormone ADH³⁷.

Dans ce cercle de gestion du volume sanguin total se trouve le système rénine-angiotensine-aldostérone. Ce système joue un rôle crucial dans le maintien de la tension artérielle, le débit cardiaque et la fonction rénale, et constitue la réponse à court terme aux variations de la pression artérielle, médiée par les barorécepteurs présents dans les artères rénales en réagissant presque instantanément aux variations de la pression artérielle.

1.4 Système Rénine- Angiotensine- Aldostérone (SRAA)

Ce système, comme son nom l'indique, est composé de trois hormones qui interagissent entre elles pour maintenir un contrôle adéquat de la tension artérielle, l'équilibre hydro électrolytique et le débit de filtration glomérulaire. La rénine est une hormone produite par le rein, qui nécessite l'angiotensinogène pour exercer sa fonction. L'angiotensinogène en revanche, est synthétisée par le foie, et lorsque liée à la rénine, est convertie en angiotensine de type I (une forme inactive). Cependant, grâce à l'enzyme de conversion de l'angiotensinogène qui est synthétisée par les cellules endothéliales du rein et des poumons, l'angiotensine de type I est convertie à sa forme active, l'angiotensine de type II. Après son activation, l'angiotensine II a une demi-vie de 1-2 minute. Physiologiquement ce système SRAA régule la rétention de sodium, de l'eau et d'hydrogène, ce qui favorise à la fois l'augmentation de l'osmolarité plasmatique et l'augmentation du volume extra- cellulaire. L'ensemble de ces phénomènes mènent à une vasoconstriction artériolaire qui augmente la tension artérielle et la résistance vasculaire périphérique³⁸. Le mécanisme par lequel le système rénine-angiotensine-aldostérone est activé est principalement dû aux changements de pression détectés dans les artères rénales efférentes grâce aux barorécepteurs. Les changements de concentration en sodium ou en eau vont aussi déclencher son activation. (Figure 1.7.).

D'un autre côté, l'activation de l'angiotensine II en association à l'aldostérone peut également mener à l'activation de ce système en augmentant considérablement la réabsorption de Na^+ et Cl^- ce qui favorise l'excrétion de K^+ et mène à la rétention d'eau, augmentant le volume sanguin total. L'angiotensine II agit également au niveau de l'hypothalamus en stimulant la soif et en augmentant ainsi la quantité d'eau absorbée chaque jour. Elle est également capable de stimuler l'activation de l'hormone antidiurétique³⁷

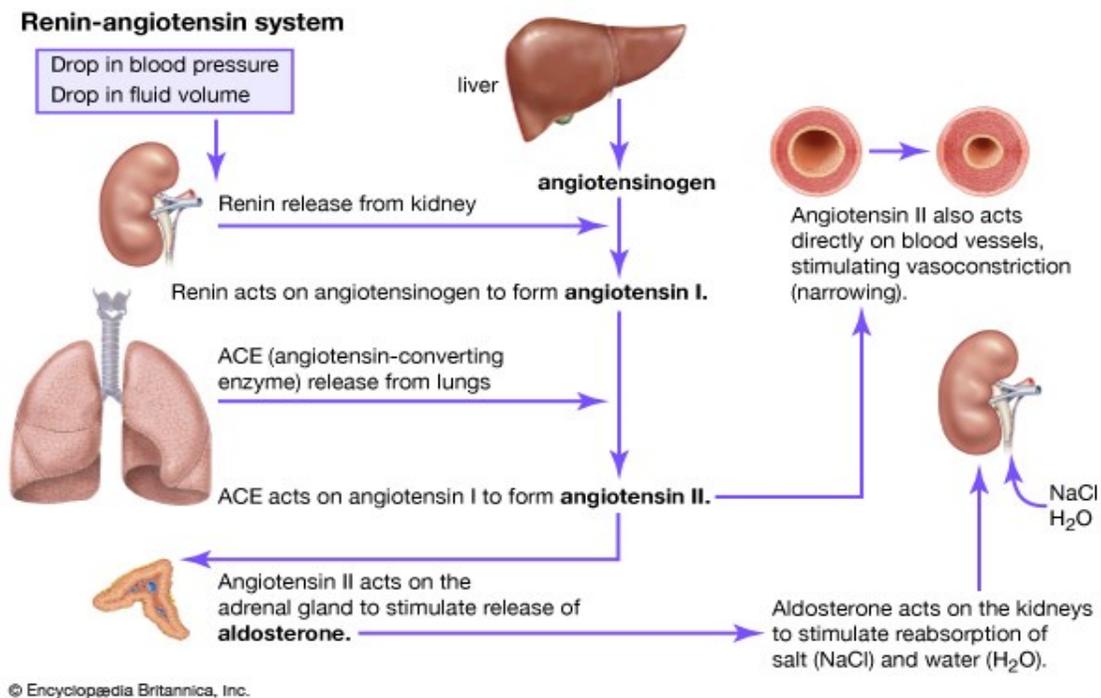


Figure 1.7. Système Rénine-Angiotensine-Aldostérone (SRAA). Tiré de l'encyclopédie Britannica (Physiology, renin angiotensin system chapter)^{39,40}

Chapitre 2 – Diabète, approche thérapeutique et complications à long terme

2.1 Diabète Mellitus

Le diabète est considéré comme un désordre du métabolisme du glucose associé à une hyperglycémie chronique, causé par un défaut dans la sécrétion d'insuline par les cellules bêta du pancréas ou par une diminution de la réponse des tissus à l'action de l'insuline⁴¹.

Selon la 7e édition de l'atlas du diabète, on estime que la prévalence mondiale de cette maladie est rendue à 415 millions de personnes qui sont atteintes du diabète (dont 8,8% de la population mondiale)⁴². D'après le rapport des maladies non transmissibles de l'Union européenne, le diabète représente la quatrième cause de mortalité dans le monde⁴³ et est associé à des complications micro- et macro-vasculaires à long terme⁴⁴.

2.2 Classification du diabète

Selon la physiopathologie de la maladie, le diabète peut être classifié en :

- Diabète de type 1, qui est caractérisé par un processus auto-immun menant à une destruction des cellules bêta du pancréas, ce qui entraîne une carence en insuline.
- Diabète de type 2, qui est caractérisé principalement par une résistance à l'insuline ou par un défaut dans sa sécrétion ou les deux.

Les critères de diagnostic du diabète sont basés sur l'hyperglycémie soutenue associée ou non à des maladies micro-vasculaires telles que la rétinopathie, la néphropathie ou l'athérosclérose.

2.3 Critères diagnostiques du diabète

Dans un contexte clinique, le Clinical Practice Guidelines considère que le diagnostic du diabète est établi selon les critères décrits dans le table 2.1 au suivant⁴¹ :

Test	Description	Critère diagnostique
Glycémie sérique	Glycémie à jeun	≥7.0 mmol/L
Hémoglobine glyquée	Utilisation d'un test standardisé et validé en l'absence de facteurs affectant la précision de l'A1C	≥6.5%
2 tests de glycémie sérique	Peu importe à quelle heure de la journée, le critère est positif si le résultat des deux tests est supérieur à ≥11.1 mmol/	≥11.1 mmol/L
Courbe de tolérance aux carbohydrates	Test de tolérance au glucose avec une charge de glucose de 75g	≥ 11.1 mmol/L

Table 2.1. Critère diagnostique du diabète (Association canadienne du diabète)⁴⁵

2.4 Approche thérapeutique du diabète

La prise en charge médicale selon l'association américaine du Diabète (ADA) est composée surtout par des recommandations et des protocoles cliniques qui visent à éviter la progression de la maladie et le développement de complications micro- et macro-vasculaires. Ces cibles thérapeutiques sont définies en fonction du type de diabète.

2.4.1 Approche thérapeutique pour le diabète de type 1

Les personnes atteintes de diabète de type 1 ont besoin d'insulinothérapie, la dose initiale d'insuline étant définie en fonction du poids et les doses allant de 0,4 à 1,0 unité / kg / jour d'insuline totale. La surveillance fréquente des taux de glucose sérique est également

fondamentale pour le contrôle métabolique et se fait au minimum chaque jour. Le traitement du diabète de type 1 implique également des changements du mode de vie, y compris une alimentation saine et une activité physique. (Figure 2.1)

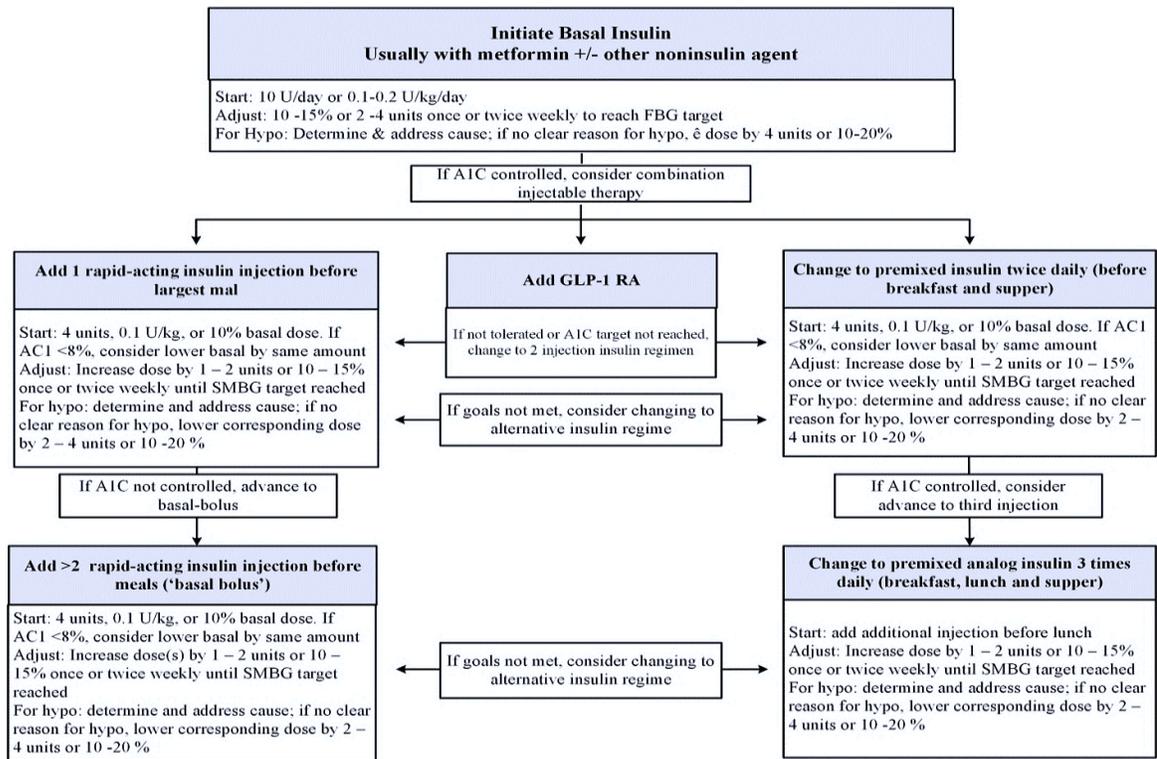


Figure 2.1. Approche thérapeutique du DM type 1. Tiré de la société américaine du diabète (Standard of medical care in diabetes)⁴⁶

2.4.2 Approche thérapeutique pour le diabète de type 2

Le traitement général du diabète de type 2 nécessite également, comme pour le diabète de type 1, des changements du mode de vie, y compris une perte de poids, une alimentation saine et de l'activité physique. Quelques personnes atteintes de diabète de type 2 parviennent à contrôler leur glycémie uniquement avec des hypoglycémifiants oraux, de l'alimentation et de l'activité physique. (Figure 2.2.). Cependant, un haut pourcentage de patients ayant un mauvais contrôle métabolique peuvent avoir besoin d'une insulinothérapie à long terme. Les hypoglycémifiants oraux font baisser de façon adéquate la glycémie chez les diabétiques de type 2, mais ces agents ne sont pas efficaces pour le diabète de type 1. Il en existe plusieurs types:

- **Sécrétagogues de l'insuline** : Qui stimule la production d'insuline par le pancréas (incluent les sulfonylurées tels que le glyburide).
- **Sensibilisants à l'insuline** : Ne modifient pas la sécrétion d'insuline, mais augmentent la réponse de l'organisme à celle-ci (comme la metformine).
- **Inhibiteurs de l'alpha-glucosidase** : Empêchent l'absorption du glucose par l'intestin (acarbose et miglitol).
- **Inhibiteurs du co-transporteur sodium-glucose de type 2 (SGLT2)** augmentent la sécrétion du glucose dans l'urine (canagliflozine, dapagliflozine et l'empagliflozine).
- **Inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4)** : La sitagliptine, saxagliptine, linagliptine et l'alogliptine stimulent le pancréas pour qu'il produise davantage d'insuline et retardent l'absorption du glucose par l'intestin. Ces médicaments agissent en augmentant le glucagon-like peptide 1 (GLP)⁴⁷.

Étant donné que les personnes atteintes de diabète de type 1 ou 2 présentent aussi des risques de complications macro-vasculaires à long terme telles que des crises cardiaques comme l'infarctus ou des accidents vasculaires cérébraux, il est important que les patients puissent être traités pour prévenir ces complications. Sauf indications contraires (par exemple, une allergie au médicament), les patients devront recevoir les traitements suivants⁴⁸ :

- **Inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE)** ou antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II (ARA) : pour les personnes atteintes de diabète de type 1 ou 2 avec une hypertension artérielle ou qui sont en risque d'une néphropathie parce qu'ils ont un effet positif sur l'endothélium.
- **Aspirine** : Pour les personnes atteintes de diabète et présentant des facteurs de risque liés aux maladies cardiovasculaires.
- **Statines : (Lovastatine, par exemple)** qui agit pour baisser le niveau de cholestérol chez les diabétiques et prévient l'apparition de l'artériosclérose, les maladies coronariennes et l'infarctus.

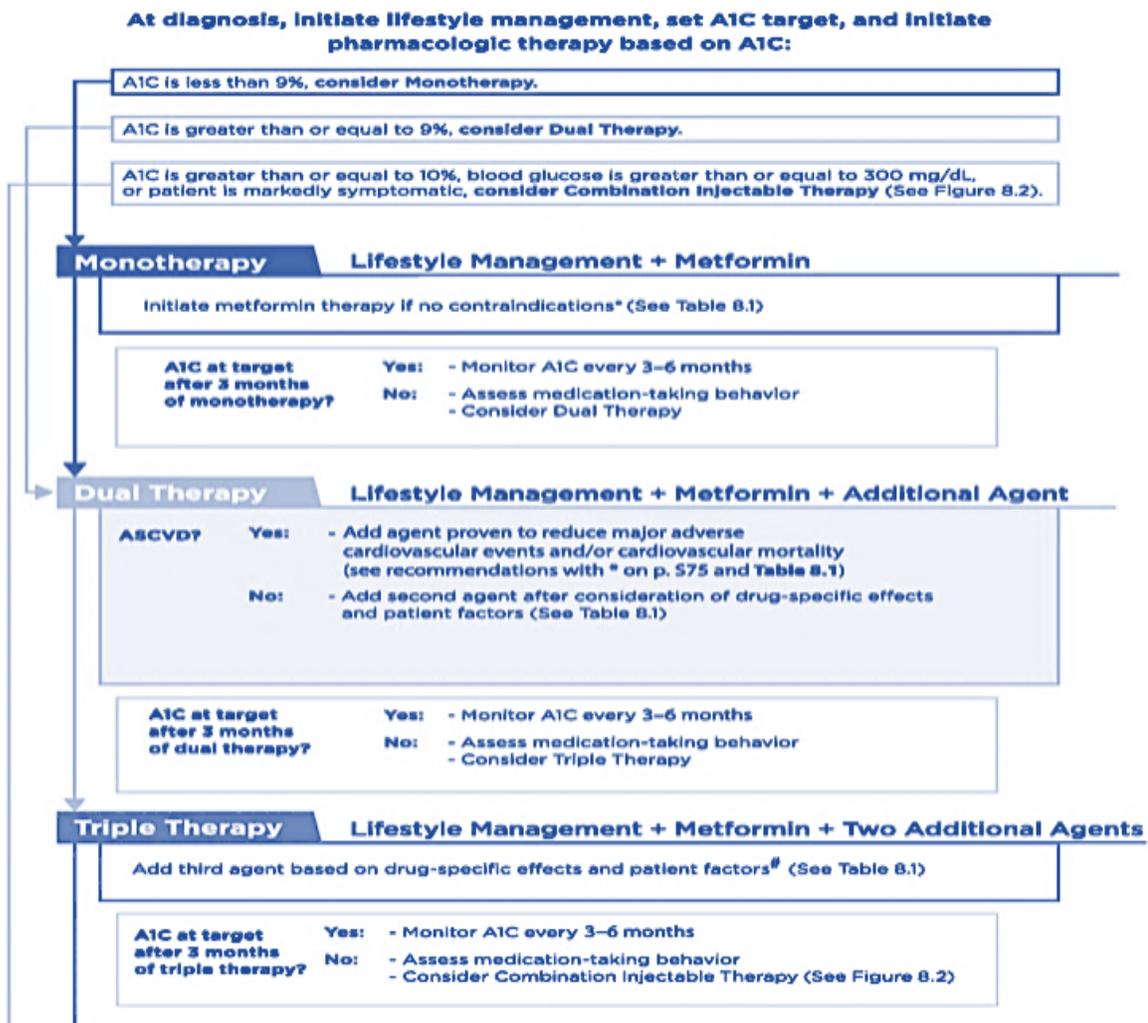


Figure 2.2. Approche thérapeutique du DM type 2. Tiré de la société américaine du diabetes_standar of medical care in diabetes ^{46,49}

2.4.3 Objectifs thérapeutiques du diabète

Le contrôle glycémique optimal est fondamental dans le traitement du diabète. Quel que soit le traitement sous-jacent, des taux d'hémoglobine glyquée (A1C) > 7,0% sont associés à un risque accru des complications micro- et macro-vasculaires dans le diabète ⁴⁹. Dans cet ordre d'idées, les objectifs thérapeutiques pour le diabète sont basés sur : (Table 2.2).

- **Un suivi continu de la glycémie** : Le contrôle glycémique intensif est la clé du traitement du diabète et le pilier de la prévention des complications vasculaires. Le contrôle journalier est surtout recommandé pour les patients ayant une insulinothérapie ⁵⁰.

- **Contrôle strict de l'hémoglobine glyquée:** Une hémoglobine glyquée inférieure à 6,5% est le gold standard et le pilier fondamental des objectifs thérapeutiques dans le traitement du diabète, puisque les taux d'hémoglobine glyquée de 6,5% ont été associés à une diminution des risques d'apparition des complications micro-vasculaires^{51,48,52}. Ce test sérique permet à la fois de déterminer le bon contrôle métabolique tant pour les patients diabétiques de type I que de type II.
- **L'hémoglobine glyquée (HbA1c):** est le test de choix pour indiquer les niveaux de glycémie des trois derniers mois. Les mesures de l'hémoglobine glyquée tous les 3 mois sont donc impératives, puisqu'elles permettent de déterminer si les objectifs glycémiques des patients ont été accomplis et maintenus tout au long de sa maladie⁵².
- **Contrôle adéquat de la tension artérielle:** Les patients atteints de diabète doivent être traités pour atteindre une pression systolique de <130 mm Hg et une pression diastolique de <80 mm Hg. Une thérapie combinée utilisant deux agents (inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine et un diurétique) peut être envisagée comme traitement initial de l'hypertension dans le diabète⁵³.
- **Contrôle lipidique et des risques de maladies cardiovasculaires:** Le diabète est un désordre métabolique avec un risque important d'artériosclérose et de maladie coronarienne⁴⁸. L'utilisation de statines pour la prévention primaire et secondaire chez les patients diabétiques est donc recommandée. L'American Diabetes Association recommande que les personnes diabétiques ayant des antécédents de maladie cardiovasculaire, ainsi que les personnes de plus de 40 ans présentant des facteurs de risque de maladie cardiovasculaire, non atteintes d'un accident vasculaire cérébral, soient traitées avec une statine indépendamment de leur concentration initiale de cholestérol LDL⁵⁴.

Critère	Objectif thérapeutique
HbA1c	<6.5%
Pression artérielle	130/80 mmHg
Cholestérol LDL	<100mg/dL

Table 2.2. Objectifs thérapeutiques dans le diabète (société américaine du diabète ADA)^{55,56}

2.4.4 Rôle des objectifs thérapeutiques non accomplis dont les complications micro et macrovasculaires

L'ADA et l'Association américaine des endocrinologues cliniciens / American college of endocrinology (AACE/ACE) ont défini des objectifs cibles pour réduire les comorbidités cardiovasculaires associées au diabète. Ces objectifs ont été décrits précédemment (Table 2.2).

Dans ce contexte, la plus grande et longue étude sur des patients atteints de diabète de type 2 a été réalisée au Royaume-Uni (United Kingdom Prospective Diabetes Study-UKPDS).

Cette étude a vu le recrutement de 5 102 patients pour déterminer si le traitement pharmacologique intensif de la glycémie entraînerait des avantages en diminuant le risque de complications vasculaires. Cette étude a permis d'établir que la rétinopathie, la néphropathie et éventuellement la neuropathie bénéficient d'une baisse de la glycémie chez les diabétiques de type 2 avec un traitement intensif. Le taux global de complications micro-vasculaires a été réduit de 25%.^{48,52}. Dans une autre étude réalisée chez de patients diabétiques de type I avec un contrôle strict de la glycémie par insulinothérapie, ils ont eu des résultats concordant avec ceux de l'UKPDS⁵⁰.

Malgré les développements récents dans le traitement du diabète, un nombre alarmant de patients ne répondent pas aux objectifs glycémiques et à d'autres objectifs importants comme la pression artérielle, ou le cholestérol, selon une étude publiée dans l'American Journal of Manage Care.^{56,57}. Ceci peut mener à des dommages endothéliaux plus importants qui favorisent l'apparition de complications micro- et macro-vasculaires en présence d'une hyperglycémie chronique mal contrôlé^{56,57}.

2.5 Le dommage endothélial : principal médiateur des complications vasculaires liées au diabète

Le mauvais contrôle métabolique et l'hyperglycémie soutenue dans le diabète sont associés à plusieurs complications vasculaires à long terme. Le moment exact où ces complications surviennent demeure inconnu. Cependant, la littérature a décrit un mécanisme clé qui déclenche leur apparition, celui-ci étant le dommage endothélial, qui est caractérisé par une biodisponibilité

réduite de l'oxyde nitrique, la réduction de la vaso-relaxation et une génération excessive de ROS (reactive oxygen species), ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire ⁵⁸.

De nombreux autres facteurs contribuent aussi à la dysfonction endothéliale. Parmi les plus importants, on retrouve un taux élevé de cholestérol LDL et de LDL oxydés, la modification du microenvironnement, l'augmentation de la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire, ainsi que l'épaississement de la membrane basale capillaire. Cet épaississement de la membrane basale capillaire est le signe pathognomonique d'une microangiopathie diabétique, tandis que d'autres changements l'accompagnent, tels que la synthèse de produits de glycation avancée, l'augmentation du stress oxydatif, et une angiogenèse anormale menant à l'hypoxie tissulaire⁵⁹.

Il existe d'autres mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des complications vasculaires diabétiques tels que la suractivation de la voie du polyol, au cours de laquelle le glucose est converti en sorbitol par l'enzyme aldose réductase (AR). À son tour, le sorbitol est ensuite converti en fructose par le sorbitol déshydrogénase (SDH). L'hyperactivation de la voie du polyol par l'activation de l'aldose réductase est décrite comme une des causes principales des dommages vasculaires par des altérations osmotiques diminuant l'activité des canaux Na⁺, K⁺ et de l'ATPase dans le diabète.

Un autre mécanisme est l'activation de la voie de signalisation du diacylglycerol/protéine kinase C, menant à une altération du flux sanguin, une angiogenèse anormale et de l'apoptose⁵⁹.

Le dernier mécanisme est l'activation de la voie de signalisation du diacylglycerol/protéine kinase C qui conduit à une activation du dihydroxycarbonate/phosphate, menant à une altération du flux sanguin, une angiogenèse anormale et un excès de l'apoptose.⁵⁹ Il existe une relation très étroite entre les complications micro et macro-vasculaires, étant donné que la microangiopathie diabétique favorise l'hypoxie tissulaire et cause des modifications dans le vasa-vasorum, ce qui finit par conduire à une athérosclérose. Il est donc impératif de comprendre le diabète dans un contexte d'hyperglycémie chronique, responsable de ces complications micro- et macro-vasculaires qu'on étudiera en détail par la suite.

2.6 Complications macro-vasculaires du diabète

2.6.1 Artériosclérose et risque accru d'infarctus

Le mécanisme pathologique central dans la complication diabétique n'est pas tout à fait clair. Il a été signalé que l'athérosclérose résulte d'une inflammation chronique qui se produit dans la paroi artérielle périphérique ou dans les artères coronariennes, ceci en réponse aux lésions endothéliales et à l'inflammation. Les lipides oxydés formés à partir de particules de LDL s'accumulent dans le mur endothélial des artères formant une plaque athérosclérotique riche en lipides⁶⁰ alors que la rupture de cette plaque peut conduire à des événements vasculaires aigus comme l'angine ou infarctus⁶⁰. Bien que les mécanismes exacts par lesquels le diabète augmente le risque d'athérosclérose ne soient pas encore très clairs, les complications macro-vasculaires et la maladie coronarienne constituent la première cause de mortalité chez les diabétiques^{61,56}. Le diabète est également un risque très puissant pour des accidents vasculaires cérébraux⁵⁷.

2.7 Complications macro-vasculaires du diabète

2.7.1 Rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique (RD) est l'une des complications micro-vasculaires les plus courantes du diabète, dû à la fragilité et à la grosseur des vaisseaux rétinien. La RD est la première cause de cécité chez les personnes âgées.⁶⁵ La perte visuelle due à la rétinopathie diabétique peut être secondaire à un œdème maculaire qui dans la plupart des cas est accompagné d'un épaissement de la rétine ou d'une hémorragie de nouveaux vaisseaux sanguins.⁶⁵ Le développement de la rétinopathie diabétique chez les patients atteints de diabète de type 2 a été associé à la sévérité de l'hyperglycémie dans la plupart des cas, et est concomitante à une hypertension artérielle. La plus grande étude rétrospective concernant le diabète, réalisée au Royaume Unis (UKPDS), a démontré qu'une majorité des patients atteints de diabète de type 1 développent des signes de rétinopathie dans les 20 ans suivants le diagnostic initial, tandis que pour les patients atteints de diabète type 2, la rétinopathie peut se présenter autour de 7-10 ans après le diagnostic du diabète.⁵²

Plusieurs mécanismes cellulaires et pathologiques sont impliqués dans le début de la rétinopathie diabétique, alors que le plus étudié est la conversion de glucose en sorbitol (alcool) à travers l'activation de la voie de signalisation du polyol. L'hyperglycémie soutenue active la voie de signalisation du polyol menant à une synthèse de sorbitol utilisant le glucose comme source. Le sorbitol s'accumule dans les cellules et endommage l'endothélium, suscitant la formation de micro-anéurysmes dans les vaisseaux sanguins.⁵⁹ Une autre caractéristique de la rétinopathie diabétique est l'augmentation de l'épaississement de la membrane basale associée également à la perte de péricytes⁶⁵. Le dommage vasculaire est produit aussi par d'autres mécanismes pathologiques, notamment l'augmentation du stress oxydatif, la production de radicaux libres, la synthèse de ROS et la formation de l'AGE (advance glycation ends products).

Le dernier mécanisme associé à la rétinopathie diabétique est l'augmentation de la synthèse des facteurs de croissance, y compris le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), l'hormone de croissance et le facteur de croissance transformant β (TGF β), ont également été postulés pour jouer un rôle important dans le développement de la rétinopathie diabétique. La production de VEGF augmente dans la rétinopathie diabétique, probablement en réponse à une hypoxie, ce qui mène à une angiogenèse anormale étant donné que ces nouveaux vaisseaux sanguins demeurent immatures^{65,59,66,67}.

2.7.2 Rétinopathie diabétique

La neuropathie diabétique est définie comme la présence de symptômes et/ou de signes de dysfonctionnement des nerfs périphériques chez les personnes atteintes de diabète après l'exclusion d'autres causes⁴⁹. Le début de cette complication micro-vasculaire, dans un contexte d'hyperglycémie, dépend à la fois d'un mauvais contrôle glycémique, de facteurs externes, comme l'alimentation, et de facteurs génétiques qui prédisposent les patients à souffrir de cette complication. L'étiologie de la neuropathie diabétique n'est pas très claire. La littérature suggère plusieurs mécanismes responsables de son apparition, tels que l'accumulation de polyols, la synthèse d'AGE et l'augmentation du stress oxydatif.⁶⁸ La neuropathie périphérique du diabète est l'une des plus graves complications à long terme du diabète, car un peu plus 80% des cas de peuvent finir par des amputations.⁶⁸

Ce dommage neuropathique se produit en présence d'une hyperglycémie soutenue qui peut se manifester sous différentes formes, notamment les neuropathies sensorielles, focales / multifocales et autonomes. ⁶⁸ Il y a deux types de neuropathie diabétique, la polyneuropathie symétrique et la sensorimotrice chronique distale, cette dernière étant la forme la plus courante de neuropathie dans le diabète.

Les signes cliniques fréquemment associés à ces types de neuropathies incluent des sensations de brûlures, de picotements et des douleurs qui ressemblent à des « chocs électriques » surtout dans les articulations distales. ⁶⁹ L'examen physique révèle une perte sensorielle du patient qui ne répond pas aux touchers légers, aux vibrations, ni au changement de température. Les anomalies dans plus d'un test de sensation périphérique sont aussi présentes lors de la détection de la neuropathie. Pour un clinicien, il est donc vital de faire un bon diagnostic d'une neuropathie diabétique, car les patients qui ont perdu leur sensation périphérique ont un risque plus accru de développer une ulcération du pied et finir par une amputation. Jusqu'à aujourd'hui, il n'existe pas de traitements spécifiques pour la neuropathie diabétique, ⁶⁹ bien que de nombreux médicaments soient disponibles pour traiter ces symptômes. L'objectif principal du traitement est donc de contrôler la douleur et les symptômes et d'empêcher l'aggravation en ciblant un bon contrôle glycémique à long terme ^{69,70}.

Chapitre 3 – Physiopathologie de la néphropathie diabétique et le rôle du dommage endothélial comme élément déclenchant de cette complication

3.1 Néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est l'une des complications microvasculaires du diabète qui constitue la première cause de défaillance rénale chronique et de dialyse ⁷¹. Cliniquement, elle est caractérisée par une protéinurie de > 500 mg en 24 heures concomitantes un diabète. Cependant, elle est précédée par des degrés plus bas de protéinurie ou de microalbuminurie. La microalbuminurie est définie comme une excrétion d'albumine de 30 à 299 mg/24 heures^{65,71,69}. Sans intervention, les patients diabétiques atteints de microalbuminurie évoluent généralement vers une protéinurie et une néphropathie diabétique manifeste. Cette progression se produit selon l'histoire naturelle de la maladie rénale chronique y compris l'hyperfiltration glomérulaire, une albuminurie progressive (qui passe de microalbuminurie à une macroalbuminurie) accompagnée par une diminution progressive du DFG. La ND débute avec une microalbuminurie qui doit être confirmée au moins deux fois à 3 à 6 mois d'intervalle, et par une augmentation de la pression artérielle, ce que se finalise par un déclin de DFG. ^{71,69}Au moins 7% des patients atteints de diabète de type 2 étaient peut-être déjà atteints de microalbuminurie au moment de leur diagnostic. Dans l'UKPDS, puisque l'incidence de la microalbuminurie était de 2% par année chez les patients atteints de diabète de type 2. ⁵²

La prévalence croissante de la néphropathie diabétique est parallèle à la hausse spectaculaire de la prévalence du diabète. En 2015, on estimait que 415 millions de personnes étaient atteintes de diabète et on s'attend que d'ici à 2040, la prévalence pourra augmenter jusqu'au 642 millions de diabétique avec une croissance disproportionnée dans les pays à revenu faible ou intermédiaire, ce qui corrèle avec l'augmentation des complications rénales à cause de diabètes^{43,73}.

3.2 Physiopathologie de la néphropathie diabétique

La néphropathie diabétique est caractérisée par différents événements. Le premier changement glomérulaire en présence d'une hyperglycémie chronique est l'épaississement de la membrane basale glomérulaire (GBM : Glomerular basement membrane), ce qui conduit à des modifications pathologiques dans les cellules mésangiales et vasculaires menant à la formation de produits de glycation avancée^{41,74,75}.

La maladie rénale chronique est une complication multifactorielle, puisqu'elle provient d'une dérégulation métabolique y compris l'hyperglycémie. La résistance des tissus à l'insuline ainsi que l'augmentation des ROS et de la production de superoxyde par les mitochondries dysfonctionnelles a été également postulés comme mécanismes pathologiques déclencheurs du dommage endothélial chez les diabétiques^{66,74}.

De plus, ce dommage endothélial produit ensuite l'épaississement de la membrane qui semble être un des phénomènes le plus remarquable dans le développement de microangiopathie diabétique.⁵⁸L'endothélium est une monocouche de cellules recouvrant la lumière vasculaire de chaque vaisseau sanguin glomérulaire, et a de multiples fonctions qui comprennent principalement la régulation de l'intégrité des vaisseaux, la croissance et le remodelage vasculaires. L'endothélium module une partie de la réponse immunitaire, l'adhésion cellulaire et l'angiogenèse^{15,58}. Il est également le principal régulateur de l'homéostasie vasculaire, car il maintient l'équilibre entre vasodilatation et vasoconstriction, inhibant et favorisant la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses, le fibrinogène et la formation de matrice extracellulaire.⁵⁸La perturbation de l'endothélium glomérulaire fenêtré due à l'augmentation de la matrice extracellulaire est un facteur important dans la progression de la néphropathie diabétique.⁷⁶Chez les patients diabétiques type I, la néphropathie diabétique est fortement corrélée à la rétinopathie, ce qui indique que les cellules endothéliales microvasculaires sont très susceptibles aux lésions métaboliques.⁵⁹. La perte de cellules endothéliales induite par l'hyperglycémie est compensée par un mécanisme d'angiogenèse anormale stimulant la formation de multiples petits vaisseaux sanguins fragiles, probablement médiée par le VEGF, les angiopoétines, les endothélines et l'oxyde nitrique⁵⁹, faisant que la principale altération endothéliale est simplement fonctionnelle, dont une biodisponibilité réduite de l'oxyde nitrique,

suivi d'une dérégulation hémodynamique de l'endothélium, augmentant le stress oxydatif et la perméabilité vasculaire (**Figure 3.1**)^{58,77,78,88}

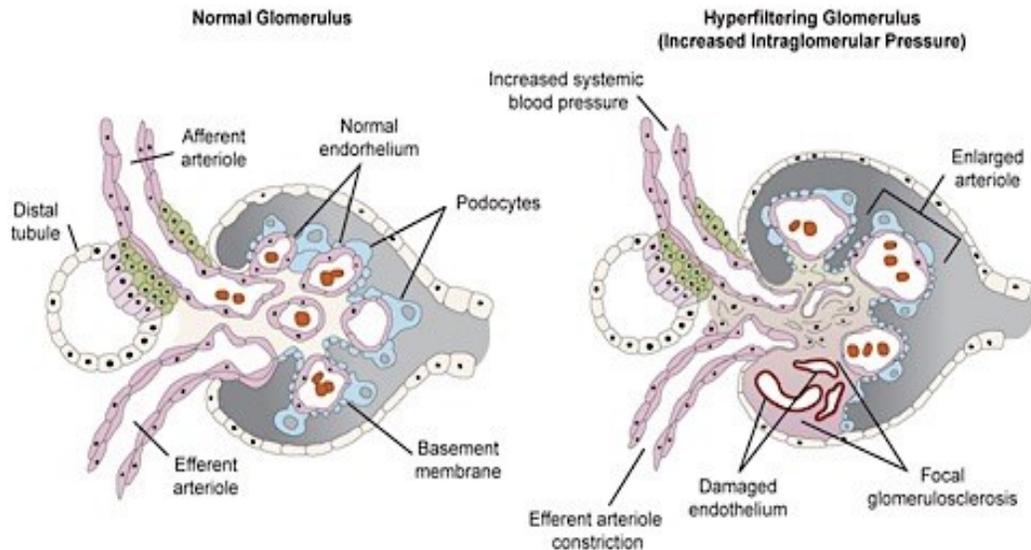


Figure 3.1 Aperçue générale du dommage endothélial dans la néphropathie diabétique. Tire de caringfordiabetes.^{15,58} Lors que la néphropathie commence à se développer, des changements liés aux glomérules prennent place, notamment le dommage endothélial que déclenchent d' autres altérations parallèles comme la perte de podocytes et l'augmentation de pression glomérulaire favorisant l'épaississement de la MBG.

3.3 Rôle des podocytes dans la pathogenèse de la néphropathie diabétique

Les altérations métaboliques et morphologiques des podocytes sont un mécanisme pathologique important pour le développement de la maladie rénale chronique⁶⁵.

Le rôle des podocytes dans la pathogenèse de la ND (Néphropathie diabétique) est devenu évident après une étude d'observation historique faite par Dr Pagtalunan à Stanford⁸⁰. Il a démontré que le nombre réduit de podocytes était fortement corrélé à l'albuminurie et à la perte de DFG chez les patients diabétiques. Plusieurs autres études cliniques ont aussi confirmé la corrélation entre la perte de podocytes et la protéinurie indiquant que la perte de podocytes est potentiellement un facteur clé contribuant à la progression de la DKD^{81,82}. Les modifications du milieu glomérulaire peuvent entraîner un réarrangement du cytosquelette des podocytes qui se

traduit en dommage podocytaire, tel qu'un élargissement des cellules ou un effacement des pedicelles, conduisant finalement à un micro ou macroalbuminurie dépendant de la durée de l'hyperglycémie²⁵. Plusieurs autres mécanismes pouvant mener aux dommages podocytaires ont été également décrits.

3.3.1 Altération du diaphragme glomérulaire : Mécanisme d'effacement du Néphrine

La néphrine est une protéine transmembranaire qui joue un rôle de protéine structurale et de signalisation dans les podocytes. Son domaine extracellulaire forme une structure semblable à une fermeture à glissière dans le diaphragme podocytaire, tandis que son domaine intracellulaire fonctionne comme système d'adhésion ce qui permet aux podocytes d'adhérer les uns aux autres et participe également à la survie des podocytes. Tandis que les dommages aux molécules d'adhésion telles la Néphrine prennent place, le diaphragme glomérulaire subit des dommages qu'on peut considérer comme réversibles. Cependant, lorsque les podocytes se détachent, cette perte représente un événement irréversible. Chez les diabétiques, comme il a été mentionné antérieurement, plusieurs études ont déjà démontré l'étroite relation entre le détachement podocytaire et le début de la micro et macro albuminurie lorsqu'il y a une hyperglycémie chronique^{81,82,83} (Figure 3.2.)

D'autres cellules glomérulaires (endothéliales, mésangiales et épithéliales) sont aussi hautement impliquées dans la pathogenèse des podocytes, car elles sont très fortement interdépendantes entre elles et ont donc des impacts négatifs, dont des altérations podocytaires, causant l'effacement des pieds des podocytes ou encore le détachement podocytaire⁸⁴.

Des données récentes indiquent que la communication paracrine entre l'endothélium fenêtré et les podocytes joue un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité de la barrière de filtration (par exemple la production de VEGF par les podocytes et que cette communication peut être perturbée par l'hyperglycémie, ce qui cause des altérations menant à une augmentation de la perméabilité vasculaire et des fuites d'albumine⁸⁵

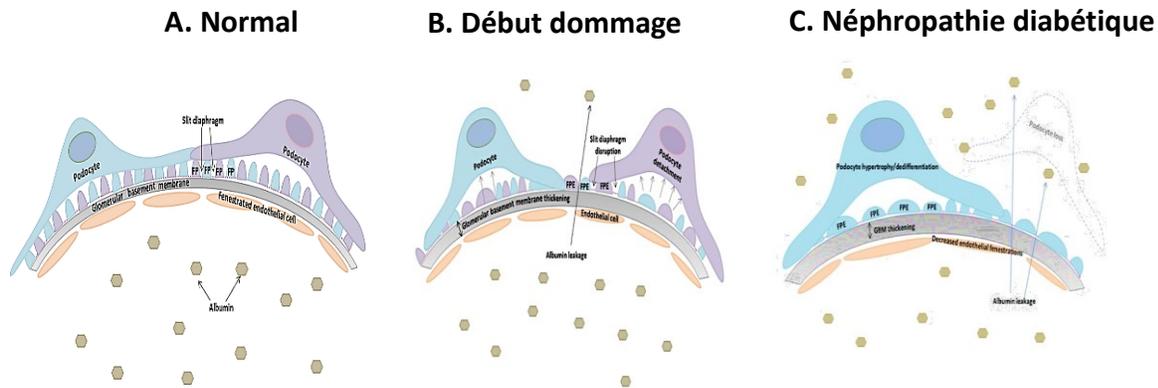


Figure 3.2. Physiopathologie de la néphropathie diabétique. Tire de the weakest link in diabetic kidney disease⁸². Le passage sélectif d'albumine a lieu grâce à une tri couche qui forme la membrane de filtration glomérulaire. Elle est composée par des cellules endothéliales, la membrane basale et les podocytes. **(A)** Dans des conditions normales, les podocytes peuvent effectuer la filtration glomérulaire ; les pédicelles et laisse passer de petites molécules d'albumine sans surpasser plus de 30g par jour. **(B)** Le début de la néphropathie diabétique causé par le dommage endothélial induit le passage de grosses molécules produisant ce qu'on appelle microalbuminurie ou néphropathie diabétique débutant, dans le cas du passage qui se situe entre 30-300g d'albumine par jour. **(C)** Le dernier phénomène est l'apoptose et le détachement des podocytes, ce qui finalise par une néphropathie manifeste accompagnée par une macroalbuminurie > 300g d'albumine par jour et un déclin de la fonction rénale progressif.

3.4 La diaphonie pathologique entre CE et podocytaires : Est-il le lien manquant pour expliquer l'albuminurie dans la ND?

Bien que l'importance des lésions endothéliales induites par l'hyperglycémie et de ses perturbations associées au diabète soit indiscutable la manière dont les lésions endothéliales peuvent entraîner une altération de la perméabilité sélective des macromolécules dans le diabète est moins claire. ^{17,86,87,88}. Un possible mécanisme par lequel le dysfonctionnement endothélial peut entraîner un passage accru d'albumine dans l'urine est l'effet direct de l'hyperglycémie sur la fonction de barrière de l'endothélium glomérulaire fenêtré¹⁷. Cependant, ce mécanisme ne tient pas compte de l'interaction structurelle et moléculaire des multiples couches de la barrière de filtration glomérulaire⁸⁹. De nos jours et grâce aux progrès technologiques, on sait que la barrière de filtration glomérulaire n'est pas simplement une membrane ressemblant à une passoire empêchant le flux macromoléculaire, mais plutôt une structure dynamique et complexe dont les altérations de l'un de ses composants peuvent affecter profondément la fonction de

l'autre. À cet égard, une altération de la communication paracrine, ou diaphonie entre les deux types de cellules à travers la barrière de filtration constitue l'un des moyens par lequel la dysfonction endothéliale peut entraîner des lésions des podocytes et l'albuminurie dans le diabète⁸⁷. L'effacement de pied des podocytes est un autre phénomène qui corrèle avec la micro et la macroalbuminurie.⁸¹D'un autre côté, des données suggèrent que la perte de podocytes survient dans le diabète précoce et que l'ensemble de l'effacement podocytaire en présence du dommage endothélial est le facteur clé qui contribuerait au défaut de la barrière de filtration glomérulaire produisant l'albuminurie^{90,91}. En revanche, le dommage endothélial accompagné par l'altération podocytaire a été identifié comme l'élément déclenchant de la microangiopathie diabétique. (Figure 3.3.)^{17,20,87}

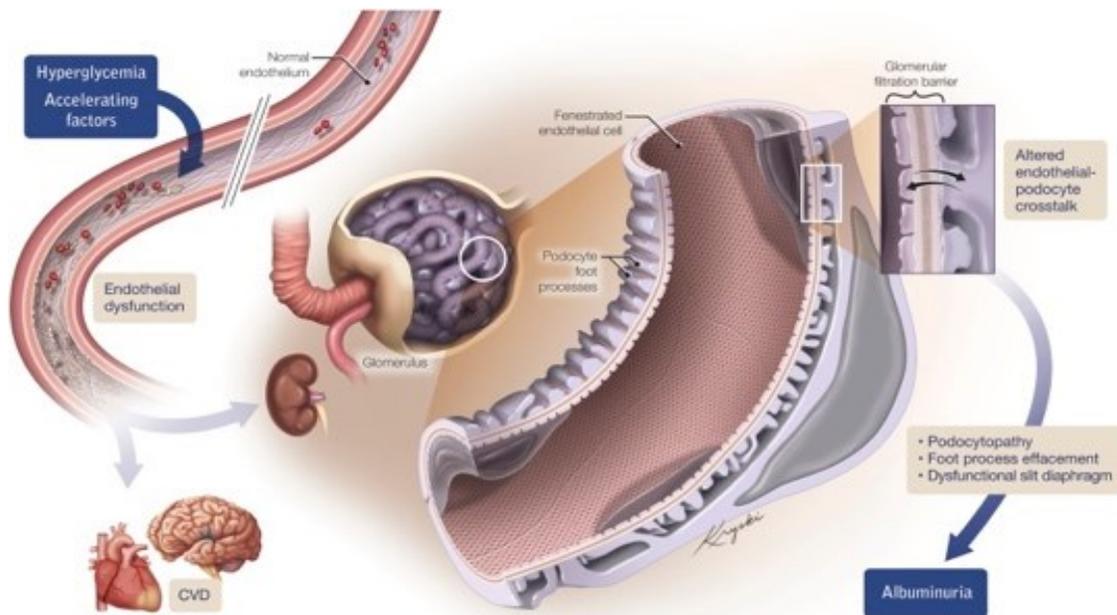


Figure 3.3. Podocyte/ endothélial cross-talk dans la pathogenèse de la néphropathie diabétique.⁸⁷. L'hyperglycémie chronique produit des altérations métaboliques conduisant à une microangiopathie, ce qui peut affecter à la fois le système cardiovasculaire, le cerveau et le rein, augmentant le risque de mortalité. La majeure affectation du rein a son origine dans la maladie glomérulaire y compris le déclin de la filtration glomérulaire. Les altérations métaboliques et morphologiques dans les cellules endothéliales et les podocytes entraînent une altération de la membrane basale glomérulaire. Ce mécanisme de diaphonie entre les cellules endothéliales et les podocytes explique la perte d'albumine dans l'urine. Ceci est principalement dû à l'augmentation de la perméabilité vasculaire produite par la podocytopenie et la dysfonction du diaphragme glomérulaire accompagnée de dommages endothéliaux.

3.4.1 Classification pathologique de la néphropathie diabétique (selon l'ASN)

La Société américaine de néphrologie a proposé une classification de la néphropathie en se basant sur sa pathologie et les changements histologiques :

- **Classe I : Épaississement de la membrane basale glomérulaire** : Si le spécimen de biopsie ne présente pas ou très peu de modifications non spécifiques à la microscopie et ne répond pas aux critères des classes II à IV. L'épaississement du GBM est un changement précoce caractéristique de la néphropathie diabétique qui se produit par l'accumulation excessive de matrice extracellulaire, avec un dépôt accru de ces composants tels que le collagène IV ou VI.
- **Classe II : Expansion mésangiale, légère (IIa) ou sévère (IIb)** : La classe II comprend les patients classés avec une expansion mésangiale légère ou sévère et présentant une augmentation du matériel extracellulaire dans le mésangium. Elle est définie comme une augmentation du matériel extracellulaire dans le mésangium glomérulaire.
- **Classe III : Sclérose nodulaire (lésions de Kimmelstiel – Wilson)** : Les lésions de Kimmelstiel–Wilson apparaissent dans les diabètes de types 1 et 2 sous forme de lésions mésangiales focales, lobulaires, arrondies, avec un noyau acellulaire, arrondi à la périphérie par des noyaux mésangiaux clairs et en forme de croissant. Les lésions de Kimmelstiel-Wilson sont souvent associées à une expansion mésangiale. L'apparition de lésions de Kimmelstiel-Wilson est largement considérée comme une transition d'un stade précoce ou modérément avancé à un stade progressivement plus avancé de la maladie rénale glomérulaire.
- **Classe IV : Glomérulosclérose diabétique avancée** : La classe IV est la présentation avancée de la néphropathie diabétique et est désignée par la présence de plus de 50% de glomérulosclérose globales dans les biopsies rénales, sans qu'il existe des preuves cliniques ou pathologiques que la sclérose puisse être attribuable à une autre maladie que la ND. Elle est caractérisée par une accumulation excessive de protéines de la matrice extracellulaire telles que les collagènes de types I, III et IV et la fibronectine dans l'espace mésangial.

3.4.2 Modèles de souris dans la néphropathie diabétique

Nombreux sont les modèles de souris utilisés pour répliquer les multiples lésions, changements et le déclin de la fonction rénale dans la néphropathie diabétique. Certains d'entre eux sont plus susceptibles que d'autres à développer la néphropathie. Nonobstant, aucun modèle actuel de diabète de type 1 ou de type 2 chez la souris ne présente de manière fiable toutes les caractéristiques de la néphropathie diabétique humaine énumérées dans le tableau 1.1 ou dans la classification pathologique du ND (Classes I au IV). Les modèles les plus utiles sont discutés ci-après.⁹²

- **Modèles de diabètes induits de type 1 STZ à haute dose** : Le diabète de type 1 induit par la STZ (Streptozotocine) a été largement utilisé comme modèle de ND. Ce médicament est composé d'une glucosamine-nitrosourée qui cause chez les animaux un diabète secondaire à une défaillance des cellules β du pancréas. La STZ est particulièrement toxique pour les cellules β pancréatiques, car son fragment glucose est transporté avec avidité dans les cellules β par GLUT2. Il est impératif de mentionner que le potentiel de toxicité rénale non spécifique de la STZ n'a pas encore été prouvé de manière rigoureuse dans la maladie rénale chronique⁹³. Ce modèle est largement accepté et utilisé pour mieux comprendre maladie rénale chronique.
- **Déficit eNOS (C57BL6 et C57BLKS)** : Les lésions endothéliales sont la caractéristique clé de la microangiopathie diabétique qui contribuent au développement de la maladie rénale chronique. Les vasodilatateurs dérivés des cellules endothéliales, telles que l'oxyde nitrique (NO), sont d'importants modulateurs de la perméabilité vasculaire,⁹⁴ alors qu'une diminution dans sa synthèse est associée au développement d'une néphropathie avancée chez les patients atteints de diabète de type 1 et de type II. Certaines études ont montré que la délétion d'*eNOS*^{-/-} induit des modifications néphropathiques chez des modèles de souris de diabète de type 1 et de diabète de type 2, imitant de nombreux aspects de la maladie humaine. De plus, les souris eNOS déficientes sur un fond B6 résistant à la néphropathie et qui ont été injectées avec STZ à faible dose développent une albuminurie diabétique 10 fois plus importante comparée aux souris contrôles diabétiques, tandis que

les groupes qui ont reçu une haute dose de STZ présentent une albuminurie 40 fois plus importante par rapport aux souris contrôles diabétiques B6⁹⁵.

- **Déficit en récepteurs de la bradykinine B2 (fond C57BL/ 6 et C57BLKS) :** Chez les souris, une augmentation de 50% de l'expression du gène ACE a des effets minimes sur la tension artérielle et l'angiotensine II. Cependant, ceci peut entraîner une diminution importante de la bradykinine, ce qui suggère que la bradykinine joue un rôle important dans les réponses rénales au diabète. Par conséquent, la contribution de la délétion ciblée du récepteur de la bradykinine 2 (B2R) fait que celui-ci est aussi considéré comme un bon modèle pour étudier la néphropathie diabétique.
- **Modèle de souris Akita :** La souris Akita est un modèle de diabète de type 1. Une mutation spontanée du gène de l'insuline entraîne un repliement incorrect de la protéine produisant une toxicité dans les cellules β pancréatiques, une réduction de la masse de cellules β et une réduction de la sécrétion d'insuline. Les souris hétérozygotes Ins2Akita développent un diabète insulino-dépendant, y compris une hyperglycémie, une hypo-insulinémie, une polydipsie et une polyurie après 3 à 4 semaines.⁹⁶.
- **Modèle des souris FVB-OVE26 (FVB Background) :** La souris FVB-OVE26 est un modèle transgénique du diabète de type 1 précoce, généré directement sur le fond FVB/N dans le laboratoire d'Epstein. Ces souris développent un diabète dans les premières semaines de vie en raison de la toxicité des cellules β en réponse à la surexpression d'un gène de la calmoduline induite par le promoteur de l'insuline.

Tous ces modèles ont en commun des caractéristiques physiopathologiques et histologiques de la ND. Cependant, l'ASN a proposé les critères ci-dessous pour leur validation.

3.5 Critères de validation des modèles de néphropathie diabétique

- Diminution supérieure à 50% du DFG au cours de la vie de l'animal.
- Augmentation de l'albuminurie supérieure à 10 fois par rapport aux souris contrôles.
- Changements pathologiques au niveau des reins, y compris expansion avancée de la matrice mésangiale +/-.

- Démonstration de l'épaississement de la membrane basale glomérulaire.
- Démonstration de la perte de podocytes.
- La démonstration de la perte de podocytes est fondamentale, compte tenu des nombreuses données selon lesquelles la perte des podocytes est un événement précoce et probablement essentiel dans le développement progressif de la DN humaine.⁹²

3.6 Marqueurs de la fonction rénale

3.6.1 Créatinine

La créatinine sérique provient presque entièrement du muscle squelettique et représente le meilleur biomarqueur endogène de filtration glomérulaire, car elle n'est métabolisée et très peu transportée par le rein, mais plutôt filtrée par celui-ci. Elle est donc excrétée au même débit par minute que la filtration glomérulaire a lieu. Le niveau normal de créatinine est compris entre 70-120 µmol/L pour les hommes, tandis que les femmes ont généralement une créatinine plus faible (50-90 µmol/L), car elles ont généralement une masse musculaire moindre⁹⁷.

3.6.2 Albumine urinaire

La mesure de l'albumine dans l'urine est un marqueur diagnostique de la fonction rénale. Ceci aide également à établir le pronostic de l'insuffisance rénale chronique, du diabète et des risques de maladies cardiovasculaires.⁹⁸ Le taux d'excrétion d'albumine journalier est standard et doit se mesurer dans une collection d'urine sur 24h ou sur un spot⁹⁸.

3.6.3 Ratio Albumine-Créatinine sérique

Le ratio albumine (µg) /créatinine (mg) (Albumine/Créatinine =30 mg/g) est recommandé par la Fondation nationale du rein et par la Société américaine du diabète pour détecter la microalbuminurie. Lorsque la microalbuminurie est établie (Ratio Albumine/Créatinine>30 mg/g), ceci devient un facteur prédictif de maladie cardiovasculaire et du diabète, constituant un outil d'importance pour identifier les personnes à risque élevé d'événements cardiovasculaires et de progression à l'insuffisance rénale⁹⁹.

Ce ratio permet d'identifier les effets délétères à long terme de l'hyperglycémie sur la fonction rénale, aidant à faire une intervention précoce afin de prévenir les complications associées au diabète ¹⁰⁰.

3.6.4 Urée sanguine

Des analyses de sang pour déterminer l'azote uréique du sang (BUN- blood urea nitrogen) sont l'un des moyens les plus simples de surveiller la fonction rénale. Cette substance (l'urée) est un déchet métabolique excrété par les reins. L'urée est un sous-produit de la dégradation des protéines. Un test peut être effectué pour mesurer la quantité d'azote uréique dans le sang. En cas d'insuffisance rénale, ce déchet n'est pas excrété, alors il s'accumule dans le corps, entraînant ainsi une augmentation des taux sanguins d'urée ⁹⁷.

3.6.5 Débit de Filtration glomérulaire (DFG/Glomerular Filtration Rate/ GFR)

L'ensemble des vaisseaux sanguins au niveau du glomérule forment une sorte de sac appelé corpuscule glomérulaire (Figure 1.3)¹⁰¹.

Le taux de filtration glomérulaire ou débit de filtration glomérulaire est constant et stable grâce à plusieurs mécanismes intrinsèques et extrinsèques. Les premiers exercent leur fonction par la constriction des vaisseaux sanguins, en maintenant la pression sanguine provenant de l'extérieur. L'homéostasie du filtrat est maintenue grâce à la pression hydrostatique existant dans la capsule de Bowman¹⁰² et à la pression des protéines qui ne peuvent pas traverser les petits capillaires, l'un des plus importants étant l'albumine ^{103,104}.

La créatinine est un marqueur endogène pour mesurer la fonction rénale. Cependant, la créatinine elle-même ne correspond pas au débit de filtration glomérulaire. Dès lors, il faut tenir en compte d'autres variables afin que le débit de filtration glomérulaire soit bien estimé, tel que le sexe, la taille ou l'âge. La combinaison de ces informations et le calcul du DFG représentent le gold standard pour le diagnostic de la fonction rénale¹⁰⁴. L'Institut national du diabète, des maladies digestives et rénales recommandent la formule suivante :

$$\text{GFR/DFG (mL/min/1.73m}^2\text{)} = 175 \times (\text{S}_{\text{cr}})^{-1.154} \times (\text{Age})^{-0.203} \times (0.742 \text{ si femme}) \times (1.212 \text{ si de race noire})$$

Où S_{cr} est la créatinine sérique en mg/dL est de 0,7 pour les femmes et de 0,9 pour les hommes. D'autres formules sont aussi utilisées pour calculer la clairance et le DFG, sont cependant moins recommandées, car elles ne prennent pas en compte la surface totale du corps. Le DFG normal est de 120ml/min par 1.73 m² alors que la maladie rénale chronique est considérée à partir d'une diminution de DFG en dessous de 60ml/min par .73 m² ^{104,105} Selon l'ASN (Société américaine de néphrologie) la néphropathie diabétique est classifié en fonction du déclin du débit de filtration glomérulaire et les changements progressifs par rapport au ratio albumine urinaire/Créatinine urinaire ce dernier a été proposé par le comité de néphropathie diabétique au Japon ¹⁰⁷.

Stade	Description	Ratio Albumine urinaire (Ug)/Créatinine urinaire (mg)	DFG (mL/min/1.73m ²)
1	Pré- ND avec un DFG normal	<30 ug/mg	>90
2	Domage rénal avec ou non légère diminution de DFG et microalbuminurie	30-300 ug/mg	89-60
3A	Diminution légère de DFG avec macroalbuminurie/ Néphropathie débutante	>300ug/mg	59-45
3B	Diminution modérée du DFG	Protéinurie	45-30
4	Diminution sévère de DFG	Protéinurie persistante	30-15
5	Insuffisance rénale chronique		<15 dialyses

Table 3.1. .Classifications de la maladie rénale chronique (selon le niveau d'albumine urinaire et du DFG : Committee on Diabetic Nephropathy) ¹⁰⁶

3.6.6 Calcul de la clairance de la créatinine pour mesurer le DFG dans la néphropathie diabétique

Une autre façon de mesurer le DFG est en calculant la clairance de créatinine. Étant donné que la créatinine est une protéine dérivée du métabolisme du système muscle squelettique qui est

mis en circulation à un taux relativement constant, elle constitue le marqueur endogène le plus couramment utilisé pour évaluer la fonction glomérulaire^{108,109}. Ainsi, le calcul de DFG se fait en utilisant la formule suivante:

$$C = (CrU \times V) / P$$

C = clairance, U = concentration urinaire, V = débit urinaire (volume / temps, c.-à-d. ml / min dans 24 heures) et P = concentration plasmatique de créatinine. La clairance de la créatinine est utilisée pour fournir un indicateur de DFG. Cela implique la collecte d'urine sur une période de 24 heures. Il faut cependant se rappeler que la clairance de la créatinine a tendance à dépasser le véritable DFG de 10 à 20%, en fonction de la proportion de créatinine urinaire dérivée de la sécrétion tubulaire. Néanmoins, cette erreur est compensée par la standardisation nationale des dosages de la créatinine sérique sur des niveaux de référence de la créatinine ce qui a largement aboli cette erreur¹⁰⁹.

3.7 Approche thérapeutique dans la néphropathie diabétique

3.7.1 Contrôle intensif de la glycémie

Les essais cliniques ont systématiquement démontré que les taux d'A1c <7% sont associés à la diminution du risque de manifestations cliniques et structurelles de la néphropathie diabétique chez les patients diabétiques de type 1 et comme de type 2.¹⁰⁷. Dans le plus grand essai clinique du diabète (UKDPS), un traitement intensif du diabète a réduit l'incidence de la microalbuminurie de 30% spécialement si ceci est associé à des chiffres artériels plus bas^{52,55,71,71},

3.7.2 Contrôles intensifs de la pression artérielle.

L'hypertension affecte environ 30-40% des patients diabétiques et constitue le facteur déterminant du taux de progression de la néphropathie.⁶². Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre l'hypertension et le déclin de la fonction rénale chez les patients diabétiques de type 1 et 2¹¹⁰. Chez les patients atteints de diabète de type 1, l'apparition de la microalbuminurie et sa progression vers une néphropathie manifeste sont associées à une pression artérielle plus élevée et la relation entre l'hypertension et la progression rénale est clairement établie étant donné que les patients diabétiques sont moins capables de vaso-relaxer

l'artériole afférente, ce qui permet à l'hypertension d'augmenter les pressions capillaires glomérulaires, en association avec une protéinurie plus importante¹¹¹ donc le traitement de l'hypertension réduit considérablement le risque d'événements cardiovasculaires et macrovasculaires chez les patients diabétiques. Dans l'UKPDS, une réduction de la pression artérielle systolique de 154 à 144 mmHg a permis de réduire de 29% le risque de développement d'une microalbuminurie. Ceci fait que l'objectif thérapeutique pour une patiente avec un ND soit un TA <130/80mmHg⁵⁵.

3.7.3 Cible thérapeutique pour le contrôle de la Pression artérielle : blocage de système rénine- angiotensine- aldostérone

Les cibles de tension artérielle pour les patients diabétiques sont inférieures (130/80 mmHg). Pour accomplir cet objectif, il est nécessaire de bloquer le système rénine-angiotensine en utilisant les ACEI (inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine) ou les ARB (Angiotensin II receptor blockers/ bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine II) pour le traitement de la néphropathie diabétique. Ces deux groupes de médicaments sont clairement réno-protecteurs puisqu'ils contrôlent la pression artérielle glomérulaire empêchant l'apparition de la néphropathie hypertensive ce qui diminue la perméabilité vasculaire les risques de microalbuminurie ¹¹².

3.7.4 Abaissements des lipides

Une méta-analyse fait par Dr. Chen en 2016 a démontré l'association entre HDL et néphropathie diabétique dans le diabète de type 1 suggérant qu'un taux élevé de HDL est un facteur de protection dans la progression de la néphropathie diabétique chez les diabétiques de type 1 ¹¹³.

3.7.5 Modifications du mode de vie

L'abandon du tabac, le contrôle du poids et une activité physique accrue ont un impact très positif chez les patientes souffrant d'une maladie rénale chronique. Pour cette raison, l'exercice et une diète santé sont recommandés chez ces patients. ¹¹⁴

3.8 Cibler le dommage endothélial dans la ND: est-ce qu'on déjà rendu là?

À l'heure actuelle, les seuls agents thérapeutiques qui peuvent retarder, mais ne stoppent pas la progression de la néphropathie diabétique sont des médicaments ciblant le bon contrôle glycémique et le blocage du système rénine-angiotensine. Leurs effets hémodynamiques intra glomérulaires pourraient diminuer le risque de déclin de la fonction rénale. Cependant, ces cibles ne sont pas dirigées vers le problème de base donc la ND : le dommage endothélial et la perte podocytaire qui déclenchent l'albuminurie à long terme.

Une possibilité intéressante, actuellement décrite est les médicaments anti-angiogéniques notamment les angiopoétines et l'anti-VEGF. Ce dernier a été déjà utilisé avec succès dans des essais cliniques pour bloquer la néo vascularisation oculaire dans la rétinopathie diabétique¹¹⁵. Malgré que de nombreuses études ont déjà confirmé l'apparition d'une angiogenèse anormale dans la néphropathie diabétique (largement décrit dans la section 2.4). Ce n'est que récemment que l'on vient d'essayer de comprendre l'importance physiopathologique de cet événement. Ainsi, l'étude des nouvelles thérapies ciblant d'autres voies comme le dommage endothélial, pourraient constituer une nouvelle option intéressante pour bloquer la progression de la néphropathie diabétique à l'avenir.

Certaines études ont déjà utilisé le blocage de l'activité du VEGF-A en tant que traitement visant à prévenir l'angiogenèse anormale dans la ND¹¹⁶. Une étude faite par le groupe de Vriese par exemple a examiné l'effet d'un traitement avec un anticorps monoclonal anti-VEGF-A dans la phase précoce du diabète induit par la streptozotocine.¹¹⁷ L'administration de l'anticorps a diminué l'hyperfiltration, l'albuminurie et l'hypertrophie glomérulaire chez des rats diabétiques améliorant le cours de la maladie. Ci-dessous sont les inhibiteurs de VEGF

Une autre étude faite par le groupe Eremina a rapporté six cas cliniques de patients traités avec le bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF.¹¹⁹ Dans ce rapport, ils ont confirmé qu'une microangiopathie thrombotique rénale s'est développée chez les patients ayant reçu l'inhibiteur de VEGF approuvés par l'US food and drug administration (Table 3.2.)

Pour démontrer que la réduction locale du VEGF dans le rein est l'élément déclencheur de la microangiopathie thrombotique chez ces patients, ils ont utilisé un modèle de souris

conditionnelles pour supprimer le VEGF des podocytes rénaux chez la souris adulte. Comme dans le cas des patients, ceci a entraîné une lésion thrombotique glomérulaire profonde. ¹¹⁹

Plusieurs autres molécules sont utilisées pour inhiber l'angiogenèse dans la néphropathie diabétique. C'est le cas de l'angiostatine, un puissant inhibiteur de la prolifération des cellules endothéliales qui induit l'apoptose et empêche la migration des cellules endothéliales ¹²⁰.

Cependant, aucune de ces études n'a examiné l'effet anti-angiogéniques dans un processus d'angiogenèse anormale. En conséquence, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer les effets bénéfiques ou nocifs de ces types de traitement avant qu'ils ne puissent être utilisés en milieu clinique ¹²¹.

Function	Médicament
Inhibition of VEGF secretion	Iressa*
	Tarceva*
Sequestration of VEGF	Bevacizumab*
	Ranibizumab*
	Pegaptanib*
Blocking binding of VEGF to VEGFR	DC101
Inhibitor of receptor tyrosine kinase	Sunitinib*
	Sorafenib*

Table 3.2. Inhibiteurs du VEGF approuvés par l'US food and Drug administration¹¹⁸

3.9 Les Anti-VEGF semblent ne pas être la meilleure option thérapeutique pour cibler les dommages endothéliaux dans la ND

Il a été démontré que le VEGF est largement impliqué dans la physiopathologie de la néphropathie diabétique et que l'hyperglycémie chronique augmente sa synthèse afin de compenser l'hypoxie glomérulaire. Donc l'utilisation de molécules bloquant ce facteur de croissance peut sembler appropriée. Cependant, on verra en détail pourquoi on n'est pas rendu à l'utilisation des anti-VEGF comme option thérapeutique dans la ND. ¹²²

Étant donné que les cellules endothéliales ont besoin de VEGF-A dans des conditions physiologiques, une inhibition importante peut provoquer des lésions endothéliales. À cet égard, l'utilisation d'inhibiteurs de VEGF-A chez les patients présentant une néphropathie diabétique peut ne pas être appropriée. Bien que le VEGF soit considérablement impliqué dans l'angiogenèse et qu'il soit capable de produire plusieurs facteurs biologiques, notamment l'oxyde nitrique endothélial (ON), le blocage de ce facteur de croissance peut être létal tant pour les podocytes que pour les cellules endothéliales glomérulaires¹²³. Ceci peut être dû au fait que la thérapie anti-VEGF peut bloquer la synthèse d'ON endothélial. L'ON est une molécule nécessaire pour l'homéostasie vasculaire puisqu'il est particulièrement impliqué dans la stimulation de la relaxation des artères du glomérule. Une étude faite par Dr Baelde en Hollande a clairement démontré qu'une élévation du VEGF peut avoir des conséquences néfastes sur la néphropathie diabétique (ce qui se passe au début du ND) principalement par une activation excessive de la voie VEGFR2.¹²³ De plus, à ce stade de la néphropathie diabétique avancée est associé une perte des cellules endothéliales et à une réduction des podocytes.¹²⁴

Ce concept a été encore mis sur place grâce à une très bonne observation réalisée par le groupe de Dr Hohenstein en Allemagne, dans lequel il a prouvé que l'activité du VEGF n'augmente que dans les glomérules légèrement blessés, mais diminue de manière significative dans les glomérules plus sévèrement endommagés dans la néphropathie diabétique stade III ou IV¹²⁴.

Subséquent, la diminution du VEGF peut indiquer un déficit relatif et local de la réparation capillaire dans les lésions diabétiques plus graves.¹²⁵ Cela peut être dû au fait qu'un rein normal nécessite un certain niveau de VEGF pour maintenir l'intégrité de la fonction rénale, de telle sorte qu'un niveau physiologique et constant de VEGF est nécessaire pour maintenir ce système vasculaire rénale. De plus, le VEGF est essentiel pour la survie des podocytes, sans laisser de côté la signalisation paracrine entre les podocytes et les cellules endothéliales. Dans cet angle, la littérature décrit un dynamique système qui contrôle la signalisation du facteur de croissance endothélial vasculaire-A entre cellules endothéliales et podocytes composées par le (VEGF-A)/(VEGFR-2), dont l'activation de VEGF via le récepteur 2 du VEGF est indispensable pour un développement glomérulaire et l'homéostasie rénale.^{113,114} De même, la suppression induite du VEGF-A peut entraîner une endothéliose semblable à une microangiopathie thrombotique

provocante également une podocytopathie ¹²⁸. En fin, l'ensemble de ces données illustrent pourquoi les anti-VEGF ne semblent pas être une bonne option thérapeutique pour la ND même si quelques études ont déjà posé la question sur son utilisation en clinique (VEGF for diabetic nephropathy are we there yet ?) ¹²¹. C'est évident qu'il manque encore de données, des expériences et des essais cliniques pour avoir une conclusion certaine sur l'utilisation des anti-VEGF pour cibler les dommages endothéliaux dans la ND.

3.9.1 Le facteur de croissance transformant - β 1 dans la ND

Le facteur de croissance transformant β est un membre de la superfamille du TGF β . Il existe trois isoformes de TGF- β dont TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Les récepteurs du TGF- β sont largement exprimés dans le rein, cependant est le facteur TGF- β 1 qui a été largement décrit comme médiateur clé dans la pathogénie de la ND. ^{129,130} Il faut noter que TGF- β subit une activation extracellulaire en réponse à divers stimuli avant de se lier à ses récepteurs. Ce signal provient notamment des modifications du pH, des espèces réactives de l'oxygène ou des intégrines et de la thrombospondine (TSP), entre autres. ¹³¹

Ainsi, des augmentations de l'expression rénale de TGF- β 1 et de son récepteur ont été observées chez des patients diabétiques. De plus, il a été observé que cette augmentation des taux de TGF- β urinaire est en corrélation avec la gravité de la fibrose interstitielle, suggérant un lien entre l'expression du TGF- β et l'insuffisance rénale diabétique progressive. ¹³¹

3.9.2 Activation et dérégulation de la signalisation TGF- β 1 / Smad dans le ND

La découverte récente de la voie de signalisation TGF- β / Smad a permis de mieux comprendre le rôle du TGF- β 1 dans la ND. Dans des conditions normales, TGF- β 1 initie sa signalisation intracellulaire via le récepteur TGF- β II (T β RII), qui active le récepteur du TGF- β I (T β RI) kinase, ce qui entraîne la phosphorylation des Smads régulés par les récepteurs Smad2. et Smad3. ¹²⁹ Les Smad2 et Smad3 activés forment alors des complexes oligomères avec le Smad4 commun (Co-Smad). Ces complexes oligomères se transfèrent dans le noyau, où ils régulent la transcription des gènes cibles, y compris l'induction de Smad7, un Smad inhibiteur (I-Smad) qui régule négativement l'activation de Smad2 / 3 en ciblant T β RI pour sa dégradation ¹³². L'activation TGF-

β via la voie smad1/5/8 semble avoir un effet anti-fibrotique. Cependant, la voie de signalisation Smad 1/3 Chez les patients atteints de DN semble être fortement activée, ce que contribue de manière significative à la fibrose glomérulaire et tubulo-interstitielle. Ceci du à que Smad 2/3 régulaient l'expression de plusieurs gènes pro-fibrotiques, notamment les collagènes de type COL1A1, COL3A1, COL5A2, COL6A1, COL6A3, COL7A1 , Alors que la suractivation de Smad 2/3 favorise l'accumulation de la matrice extracellulaire (MEC) caractéristique de la fibrose rénale ^{131,132}.

Ainsi, Les BMP, via l'activation de SMAD-1/5/8, sont capables de supprimer l'expression du gène fibrotique merdier par le TGF- β ¹³³ alors que l'hyperactivation de la signalisation SMAD-2/3 induite par l'activine / TGF- β favorise la fibrose. Cependant, l'activité accrue de BMP / SMAD-1/5/8 est probablement anti-fibrotique. ^{131,132}.

3.9.3 SMADs dans le diabète et l'obésité

De études récentes ont démontré également l'implication de la signalisation du facteur de croissance transformant (TGF) - β / Smad3 dans la pathogénie de l'obésité et du diabète de type2 ¹³⁴ Plusieurs groupes de chercheurs ont récemment démontré que la signalisation du TGF- β /Smad3 régulaient la transcription du gène de l'insuline dans les cellules β des îlots pancréatiques. ^{134,135,136} De plus, les souris Smad3-knockout (Smad3 - /-) présentaient une adiposité diminuée avec une tolérance au glucose améliorée et une sensibilité à l'insuline. De cette façon, lorsque la signalisation TGF- β / Smad3 était bloqué du a un traitement avec un anticorps neutralisant TGF- β , elle protégeait les souris de l'obésité et du diabète de type 2. Ces résultats indiquent que Smad3, le médiateur intracellulaire canonique du TGF- β , sert de régulateur à multiples facettes de l'homéostasie métabolique, identifiant ainsi Smad3 comme une cible potentielle dans le traitement de l'obésité et de ses troubles associés. ^{134,135,136}

3.9.4 Dommages de la membrane basale glomérulaire dans la ND

La laminine, une glycoprotéine non collagène, est un composant majeur de la membrane basale glomérulaire rénale et du mésangium. Les constituants principaux de la membrane basale glomérulaire sont les chaînes α 5, les β 2, β 1 et γ 1 de la laminine. Il été démontré que ils étaient surexprimées dans les reins atteints de néphropathie diabétique. Au début, les constituants du

mésangium ont augmenté proportionnellement au degré d'expansion mésangiale et au degré de néphropathie diabétique alors qu'une réduction de l'intensité de la chaîne $\alpha 2$ a été observée avec une expansion mésangiale grave et dans les zones de glomérulosclérose nodulaire. La dégradation de ces protéines de la membrane basal glomérulaire permet de décrire son rôle dans la progression de la néphropathie diabétique.^{76,137}.

Chapitre 4 – Signalisation Alk1/BMP9 : Superfamille, fonction et rôle dans l'endothélium

4.1 L'endothélium : un organe multifonctionnel

L'endothélium est une monocouche très dynamique et complexe, composé par des cellules endothéliales qui constituent le revêtement cellulaire interne des vaisseaux sanguins (artères, veines et capillaires) et du système lymphatique. Il est donc en contact direct avec le sang / la lymphe et les cellules en circulation.¹³⁸.

Les cellules endothéliales jouent un rôle régulateur important dans la circulation en tant que barrière physique et source de diverses substances régulatrices. C'est le cas de l'oxyde nitrique et de la prostacycline. Ces deux molécules sont dérivées de l'endothélium et sont libérées en réponse à des stimuli physiques, à des hormones ou en réponse aux substances dérivées des plaquettes.

Ils induisent une relaxation vasculaire et inhibent la fonction plaquettaire. Les cellules endothéliales sont également une source d'inhibiteurs de croissance et de promoteurs, tels que l'héparine et les sulfates d'héparine, le facteur de croissance dérivé des plaquettes et la thrombospondine. Plusieurs substances vasoactives sont aussi produites par l'endothélium, telles que l'endothélines et l'angiotensine II, qui sont importantes dans la régulation de la croissance vasculaire. Ainsi, la couche endothéliale peut réguler le tonus vasculaire et la croissance de vaisseaux sanguins.

4.2 Le dysfonctionnement endothélial

Le dysfonctionnement endothélial est caractérisé par un changement dans les actions de l'endothélium vers une réduction de la vasodilatation. Il est accompagné d'un état pro-inflammatoire caractérisé par la production de substances prothrombiques.

Cette dysfonction endothéliale est associée à la plupart des formes de maladies cardiovasculaires, telles que l'hypertension, les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque chronique, les maladies vasculaires périphériques, le diabète, l'insuffisance rénale chronique ou aiguë.^{58,140}

Si l'endothélium est endommagé, les niveaux de NO deviennent déséquilibrés, faisant que les cellules qui devraient rester dans le sang peuvent passer à travers les vaisseaux sanguins et pénétrer dans les tissus corporels adjacents. Lorsque l'action du NO est inhibée, la signalisation endothéliale peut être altérée, entraînant une maladie étendue et une vasoconstriction ce qui diminuent considérablement l'apport d'oxygène dans les tissus.

4.2.1 Dysfonction endothéliale, début de l'angiogenèse anormale dans la néphropathie diabétique :

Les patients diabétiques présentent inévitablement une altération de la vasodilatation dépendante de l'endothélium. Ceci est en partie dû à l'association fréquente de la maladie avec des autres facteurs de risque cardiovasculaires, notamment l'hypertension, l'obésité et la dyslipidémie et l'hyperglycémie chronique. Les mécanismes menant aux lésions endothéliales du diabète sont interdépendants à d'autres facteurs de risque cardiovasculaire, incluant la résistance à l'insuline, l'hyperglycémie, la diminution de l'oxyde nitrique, la production de ROS, l'hyperlipidémie et l'hypertension artérielle.

Vu la carence de molécules ciblant le dommage endothélial comme approche thérapeutique dans la néphropathie diabétique et à l'égard des multiples effets collatéraux de l'utilisation des anti-VEGF, nous avons voulu caractériser une nouvelle cible thérapeutique impliquée dans l'angiogenèse et le remodelage vasculaire, ceci-ci est la voie de signalisation Alk1/BMP9.

4.3 La super famille des TGF- β

La super famille de TGF- β est composée par un groupe cytokines. Les cytokines sont des molécules type glycoprotéines de faible poids moléculaire qui sont responsables du contrôle de la communication intracellulaire et de la direction de la réaction immunologique. Elles sont impliquées dans le développement et l'homéostasie de la plupart des tissus vasculaires en régulant diverses fonctions cellulaires, telles que sa prolifération et différenciation. ¹²⁹

La superfamille Le TGF- β est un groupe élargi de polypeptides régulateurs, comprenant une famille de facteurs de croissance transformateurs modèles et d'autres familles équivalentes. On distingue plusieurs groupes dont les protéines morphogénétiques osseuses (BMP), les facteurs de croissance et de différenciation (GDF/ Growth/differentiation factors), les activines (ACT), les

inhibines (INH), les facteurs neurotrophiques dérivés de la glie (GDNF/ Glial cell line-derived neurotrophic factor), ainsi que certaines protéines non incluses dans les familles ci-dessus, telles que la substance inhibitrice de Müller (MIS) également connue sous le nom de hormone anti-Müllérien (AMH), facteur de détermination gauche-droite) et le facteur de différenciation de la croissance nodale.¹²⁹

4.3.1 Caractéristiques des récepteurs de la famille TGF- β

La super famille de TGF- β est caractérisée par ses effets dans la plupart des tissus corporels de manière autocrinienne, paracrénique et endocrinienne. Ainsi, TGF- β est également impliqué dans la prolifération et la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC), la production de substance extracellulaire dans les tissus des os et du cartilage.¹⁴¹⁻¹⁴³

Cette famille de TGF- β comprend trois isoformes notamment TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Chacune de ces isoformes ont été trouvées chez l'homme et elles sont codées par des gènes ayant des emplacements différents dans différents chromosomes : Par exemple, le TGF- β 1 est situé dans le bras long du chromosome 19 (19q13.1) tandis que le TGF- β 2 se trouve sur le bras long du chromosome 1 (1q41) et finalement le TGF- β 3 qui est situé sur le bras long du chromosome 14 (14q24).¹⁴¹⁻¹⁴³

Ces trois isoformes (TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3). Ils peuvent être activés à partir de l'ECM, et ensuite interagir avec un complexe récepteur formant une combinaison hétérotétramère contenant deux sous-unités de type I (T β RI, TGFBR1) ou de type II (T β RII, TGFBR2). Les deux sous-unités, T β RI et T β RII, sont des glycoprotéines transmembranaires pénétrant à travers toute l'épaisseur de la membrane cellulaire.¹⁴¹⁻¹⁴³

4.3.2 Activin receptor like kinase 1 (ALK1)

L'Activin receptor like kinase 1 aussi connue sous le nom Alk1 ou ACVRL1 appartient à la famille des sérines-thréonine kinase et agit comme un récepteur de type I pour la superfamille des ligands du TGF- β . Il est constitué par plus de 503 acides aminés et est un récepteur spécifique à l'endothélium selon la base de données des gènes EBI (European Bioinformatics Institute). Il joue un rôle majeur dans le développement et la maturation des vaisseaux sanguins.

ALK1 est une protéine transmembranaire sérine/thréonine kinase qui est faite de trois domaines : un domaine extracellulaire, une région cytoplasmique et une région intracellulaire.

La partie extracellulaire est composée d'un peptide type signal qui est clivé pour générer un Alk1 mature. La partie intracellulaire contient la région GS juxta membranaire riche en glycine et en sérine qui régule l'activité kinase, et une région sérine-thréonine kinase qui est responsable principalement de la phosphorylation des facteurs de transcription Smad.

L'activation de ALK1 dépend de son association à différents récepteurs de type II et III pour générer des complexes hétérotétramériques sérine/thréonine kinase avec une capacité de signalisation variée.¹⁴⁵ Des mutations de l'Alk1 ont été associées à une télangiectasie hémorragique de type 2, également appelée syndrome de Rendu-Osler-Weber. Cette maladie se caractérise par des dysplasies vasculaires avec l'apparition de télangiectasies au niveau des muqueuses ou formants des fistules artérioveineuses. La déficience d'Alk1 est aussi associée à l'hypertension pulmonaire familiale, et le syndrome de Loeys-Dietz.^{116, 121.}

4.3.3 Rôle d'ALK1 dans l'angiogenèse

Alk1 est inactivé chez les patients atteints de télangiectasie hémorragique héréditaire (Hereditary hemorrhagic telangiectasia -HHT). La manière dont la signalisation Alk1 régule l'angiogenèse reste incomplètement comprise.

Le blocage de la signalisation Alk1 au cours du développement postnatal chez la souris conduit à une hyper vascularisation et à l'apparition de malformations artérioveineuses (MAV). Le rôle crucial d'Alk1 dans l'endothélium a été démontré par des délétions complètes de ce gène sur des souris homozygotes Alk1 Cre⁺. Alors que la délétion complète d'Alk1 est létal au stade embryonnaire.¹⁴⁸ Cette létalité est due principalement à des défauts dans l'angiogenèse et du développement cardiaque, qui causent des dilatations excessives des vaisseaux sanguins. Ce phénotype est concomitant avec des lésions vasculaires similaires à celles observées dans la HHT. Après la naissance, la délétion chez les souris homozygotes ALK1 qui ont été floxées (système Cre⁺) résulte aussi en un effet néfaste sur l'endothélium alors que leur taux de mortalité demeure très élevé.¹⁴⁸

De leur côté, les souris hétérozygotes Alk1 se développent normalement sans phénotypes notables. Cependant, ce développement normal a lieu jusqu'à un certain point, puisque les observations pathologiques vasculaires faites chez l'humain notamment les MAV et le HHT sont aussi présents chez les patients ayant des mutations Alk1 .

Ces délétions partielles d'Alk1 chez l'humain qui présentent des altérations fonctionnelles de l'endothélium sont également liées à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Une étude sur les mécanismes potentiels sous-jacents à ce phénomène explique que la perte d'Alk1 entraîne une stimulation soutenue de la synthèse du VEGF conduisant à une perturbation de l'intégrité de la barrière endothéliale associée à une perte des cellules murales ¹⁵⁰.

4.3.4 Gènes régulés par ALK1

L'activation de Alk1 peut aussi avoir lieu via TGF- β , ce que favorise l'activation de la CE pendant l'angiogenèse, tandis que l'activation de ALK5 inhibe la croissance et est supposée jouer un rôle dans la maturation et la stabilité des vaisseaux, Subséquemment, nombreux études on monte que les souris knock-out d'Alk1 meurent également au jour 10 à 11 et présentent une défaillance du réseau capillaire et des vaisseaux sanguins dilatés.¹⁴⁸

Alk1 a plusieurs cibles de transcription qui ont été identifiées. Des expériences de puces à ADN comparant la condition inhibée par Alk1 ou activée par Alk1 à la ligne de base ont identifié plusieurs cibles pSMAD1 / 5/8 établies, y compris ID1, ID2, ID3 qui codent des répresseurs de transcription, et smad6 et smad7.¹⁵¹. Ces études ont également identifié l'endogline comme une cible d'Alk1.¹⁵¹ Dans les cellules en culture, les stimulations Notch et Alk1a démontre des effets additifs ou synergiques sur l'expression de l'ARNm de cibles canoniques de type Notch (induites par RBPJ / NICD) telles que HEY1 et HEY2 et la stimulation de BMP9 induit une liaison de pSMAD1 / 5/8 promoteurs.¹⁵² De plus, Smad4 semble être nécessaire pour l'induction des cibles Notch via l'activation d'Alk1 /BMP9. ¹⁵² Subséquemment, des autres gènes supplémentaires régulés par Alk1 comprennent CXCR4 et DLL4, qui codent pour des marqueurs artériels et des facteurs pro-migrateurs qui sont exprimés par les cellules de l'extrémité endothéliale tel que l'endothéline 1, qui code pour un peptide vasoconstricteur. ¹⁵³

4.3.5 TGF- β et ces voies de signalisation intracellulaires canoniques et non canoniques

La transduction de la signalisation intracellulaire de la famille de TGF- β est faite à travers des protéines cytoplasmiques. Ceci est possible en appartenant des facteurs de transcription de la famille Smad. Actuellement, on distingue trois classes de protéines Smad, notamment ce qui sont régulés par les récepteurs (R-Smad), y compris Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 et Smad8, le médiateur commun Smad (Co-Smad) dont Smad4, et les Smad inhibiteurs (I- Smad), y compris Smad6 et Smad7¹⁵⁴.

Dans la transmission du signal intracellulaire via une voie de signalisation canonique, le signal est propagé de l'hétérotétramère récepteur lié au ligand TGF- β au noyau via les protéines de la famille Smad. Cependant, chaque membre de la famille se lie et signale sélectivement via son propre répertoire de combinaisons de types I/II. ¹⁵⁴ En conséquence, les domaines intracellulaires interagissent les uns avec les autres, permettant à la kinase de type II de phosphoryler le récepteur de type I sur des résidus spécifiques de sérine et de thréonine dans un domaine riche en glycine-sérine, appelé GS-box¹⁵⁴.

D'un autre côté, il faut noter que la cascade SMAD est la voie de signalisation la plus importante régulée par les membres du TGF- β et sépare tous les membres du TGF- β en deux classes distinctes : Les récepteurs TGF- β , de type activines et nodaux dont Alk5, Alk4 et Alk7, eux induisent sa signalisation via la phosphorylation de (R-) SMAD2 et 3. Le deuxième groupe est formé par trois activines dont Alk1, Alk2, Alk3 et Alk6 qui sont aussi activées par les récepteurs BMP de type I. cependant ils envoient leur signal via phosphorylation de R-SMAD1, -5 et -8. ¹⁵⁴ Les R-SMAD activées forment alors des complexes hétéromères avec un médiateur commun (Co) - SMAD4, et ces complexes peuvent se déplacer vers le noyau où, conjointement avec un autre facteur de transcription se liant à l'ADN, des co-répresseurs / co-activateurs et des modulateurs de la chromatine, ils régulent les réponses transcriptionnelles des gènes¹⁵⁴.

De son côté, le complexe récepteur TGF- β / activines peut également transmettre le signal via une voie non canonique (voie indépendante de Smad), c'est-à-dire par d'autres voies de transmission du signal intracellulaire. Les voies de transmission possibles du signal vers le noyau incluent les protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK), telles que les kinases 1/2

régulées par un signal extracellulaire (ERK1 / 2), la kinase N-terminale de c-Jun (JNK), p38 et le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PI3K), voie AKT / PKB, ainsi que de des protéines tyrosine kinases (PTK2, Src et Abl) et enfin la voie NF- κ B et la voie Wnt / β -caténine¹⁵⁵.

4.3.6 Les co-récepteurs de TGF- β : Les activines et GDF activant SMAD2 /3

Les endoglines et les bétaglycanes structurellement apparentés représentent des protéines transmembranaires avec de grands domaines extracellulaire capable transmettre le signal de TGF- β via l'activation de Smad 2/3. Les endoglines et les bétaglycanes partagent des segments très similaires et par conséquent, ils partagent probablement des fonctions biologiques similaires. Les domaines cytoplasmiques des deux co-récepteurs peuvent être phosphorylés par des sérine / thréonine kinases telles que les récepteurs TGF- β de types I et II.

Il a également été observé que l'endogline possède des propriétés similaires à celles de T β RIII, puisqu'elle contient également un domaine RGD et présente une affinité pour TGF- β 1 et TGF- β 3 mais pas pour TGF- β 2. Ainsi, les membres de la famille TGF- β peuvent aussi exercer leur fonction cellulaire via deux protéines transmembranaires structurellement apparentées des récepteurs de type I (également appelé activin récepteur like kinase) et les récepteurs de type II, dotés aussi de domaines intrinsèques sérine / thréonine kinase¹⁴⁴.

4.4 La sous-famille des BMPs

Les Bone Morphogenic Proteins (BMP) ont premièrement été découvertes par leur capacité à réguler la formation des os et du cartilage¹⁵⁶.

Les membres de cette famille ont une multitude de rôles différents dans tout corps humain et des souris, compte tenu son importance lors du développement embryonnaire. De plus, cette famille des BMP est également connue pour son importance dans le développement vasculaire. Parmi ce groupe des protéines, on trouve le ligand physiologique d'Alk1 : la BMP9 (protéine morphogénétique osseuse 9) et la BMP10. C'est d'ailleurs dans les années 2000 que la BMP9 et BMP10 ont été découvertes comme ligands physiologiques d'Alk1¹⁵⁶.

4.4.1 Gènes cibles pour les BMPs

De nombreux gènes cibles de BMPs ont été identifiés dans divers type cellules. Au cours de la différenciation ostéoblastique des cellules mésenchymateuses précoces, par exemple les cellules C2C12, la BMP-2 a induisent la synthèse des divers gènes qui peuvent être classés en gènes de réponse précoce immédiate et tardive (2h après stimulation par BMP ou 24h après stimulation avec BMP). Ces gènes sont impliqués dans la transduction du signal, y compris Id1-3 (inhibiteur de la différenciation ou inhibiteur de la liaison de l'ADN 1–3), OASIS, Prx2, TIEG et Snail. Les BMP induisent autres gènes dans les cellules progénitrices mésenchymateuses, notamment Runx2 et Osterix qui jouent un rôle dans la différenciation en ostéoblastes. Les BMP stimulent aussi la prolifération des cellules endothéliales, ceci dû à l'expression du récepteur 2 du facteur de croissance endothélial vasculaire et de Tie2. Parmi les divers gènes cibles des BMP, les gènes Id constituent l'une des cibles les plus importantes des BMP. Les quatre isoformes des protéines Id (Id1 à 4) présentent des activités biologiques similaires, mais non identiques et elle sont clairement implique dans l'organisation de la réseau vasculaire et le maintien de l'endothélium¹⁵⁷.

4.4.2 BMP9

La BMP9 est une protéine circulante qui constitue le ligand physiologique d'Alk1. Il a été mis en évidence que la BMP9 et la BMP10 possèdent un rôle indéniable dans la physiologie des cellules endothéliales. La fonction de ces deux protéines est tellement critique qu'elles sont responsables de la fermeture physiologique du ductus artériel pendant l'embryogenèse du cœur. La BMP9 est une protéine circulante et elle est principalement produite par les cellules hépatiques. La BMP9 et la BMP10 ont presque 65% d'homologie séquentielle au niveau protéique et ont une très haute affinité et spécificité pour Alk1^{160,161}.

De plus, la BMP9 semble jouer un rôle important dans la formation et le maintien des vaisseaux lymphatiques, puisque l'inactivation de la BMP9 chez la souris affecte sévèrement le drainage du système vasculaire lymphatique présentant des défauts importants dans la maturation de ce réseau lymphatique^{160,161}. Ainsi, le signalisation Alk1/BMP9 est fortement impliquer dans la prolifération et la migration de cellules endothéliales alors que cette voie de signalisation a

plusieurs gènes cibles comme la fibronectine, le collagène, l'Id 1 ou le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor)¹⁶¹.

4.4.3 Voie de signalisation Alk1/BMP9 dans les cellules endothéliales

L'activation d'Alk1 via la voie de signalisation Alk1/BMP9 joue un rôle important dans la survie des cellules endothéliales, son organisation et prolifération. Celui-ci puisque cette voie de signalisation est fortement impliquée dans l'angiogenèse et le remodelage vasculaire.

En conséquence, certains essais peuvent être contradictoires montrant que le fait de surexprimer la BMP9 in vitro semble favoriser l'inhibition de la migration, de la prolifération et de l'angiogenèse induite par le FGF chez les CE^{146,162,163(p1)}. Cela est concordant avec des résultats du groupe du Dr Vant qui ont montré que la surexpression par des vecteurs adénoviraux d'une forme constitutivement active d'Alk1 montre une inhibition de la prolifération, de la migration et des déficiences d'adhésion par la réorganisation anormale du cytosquelette de plusieurs types de CE macrovasculaires endothéliales humaines (HMVEC) ou dans des cellules primaires endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC)^{131,154,155(p1)}.

Par contre, d'autres études ont aussi établi que tout comme la BMP9, la BMP10 avait un effet sur l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales macrovasculaires et que la surexpression de ces protéines peut favoriser la phase de maturation de l'angiogenèse et/ou le maintien du phénotype de quiescence.

4.4.4 Signalisation Alk1/ BMP9 canonique

Alk1/bmp9 active sa signalisation par des effecteurs type Smad qui sont phosphorylés pour ensuite traduire le signal vers le noyau. C'est le BMPRII qui régule la transcription du signal. Ensuite, la signalisation intracellulaire prend place via la régulation des protéines Smads.

On distingue trois types de Smads : les Smads régulateurs ou r-smad (Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 et Smad8/9), les Smads coopérateurs ou co-smad (Smad4) et les Smads inhibiteurs (smad6, smad7). Ensemble, ces facteurs vont transmettre la signalisation pour réguler l'expression de leurs gènes cibles^{164,165} (Figure 4.1).

4.4.5 BMP9 / BMP10/Endogline dans la signalisation d'Alk1

Les récepteurs de type II et de type III interagissent avec BMP9 / BMP10 et Alk1 à la surface de la CE pour effectuer sa signalisation. En fait, plusieurs données suggèrent qu'Alk1 peut interagir avec les trois récepteurs BMP de type II et que le complément des récepteurs peut varier en fonction du lit vasculaire¹⁶⁶.

D'un autre côté, bien que le récepteur de type III, (Endogline) ne soit pas requis pour l'activation de BMP9 / BMP10 d'Alk1, il améliore la signalisation via pSMAD1 / 5/8. De ce fait, l'endogline a été initialement décrite comme un co-récepteur pour de nombreux ligands de la famille TGF β , y compris TGF β 1, TGF β 3, l'activine A, BMP2 et BMP7. Cependant, la liaison de l'endogline à ces ligands nécessite la co-expression d'un récepteur de type I ou de type II a été aussi décrite.¹⁶⁶

En détail, les structures et les études de liaison suggèrent un mécanisme d'assemblage complexe dans lequel, en l'absence d'endogline, le récepteur de type II déplace le facteur de croissance BMP9 ou BMP10 de son précurseur et à son tour le récepteur de type I. Ainsi, il faut mentionner qu'Alk1 se lie pour activer sa signalisation lorsque l'endogline est présente, ce qu'améliore la signalisation Alk1/BMP9¹⁶⁶ (Figure 4.1).

4.4.6 Signalisation Alk1/BMP9 non canonique

La littérature décrit aussi d'autres voies de signalisation non canoniques (non-SMAD) qui peuvent être activées par Alk1/BMP9. Les voies non-canoniques incluent les voies des MAPK, NF- κ B, Wnt et Rho-GTPase et la modulation des microRNA. Ces voies sont complémentaires à la voie Smad, ce qui permet d'obtenir des réponses biologiques distinctes à celle de la voie canonique comme on avait déjà mentionné¹⁶⁷.

4.4.7 SMADS

Dans le noyau, les Smads régulent la transcription des gènes cibles par liaison directe à l'ADN, interaction avec d'autres protéines de liaison à l'ADN et recrutement de coactivateurs transcriptionnels et / ou de corepresseurs . La séquence GTCT / AGAC est spécifique au Smad3 et Smad4, tandis que les R-Smads sont spécifiques au BMP sens se liant aux séquences riches en

GC (motif GCCGnCGC). Les R-Smads spécifiques aux BMP se lient également à d'autres séquences riches en GC, par exemple la séquence (T) GGCGCC dont Bambi, Vent2, Smad7 ou le promoteur du gène *Id1*, ce qui sont importants pour une activation transcriptionnelle efficace.

Les smads interagissent avec diverses protéines de liaison à l'ADN, ce qui est essentiel pour montrer les effets spécifiques des protéines de la famille TGF- β dans les différents types de cellules. De nombreuses protéines de liaison à l'ADN, notamment Runx, Schnurri, Menin, OAZ, MAN-1, MyoD, Vent2, Hoxc-8 et Msx1, interagissent avec les R-Smads puisqu'elles sont spécifiques du BMP¹⁶¹.

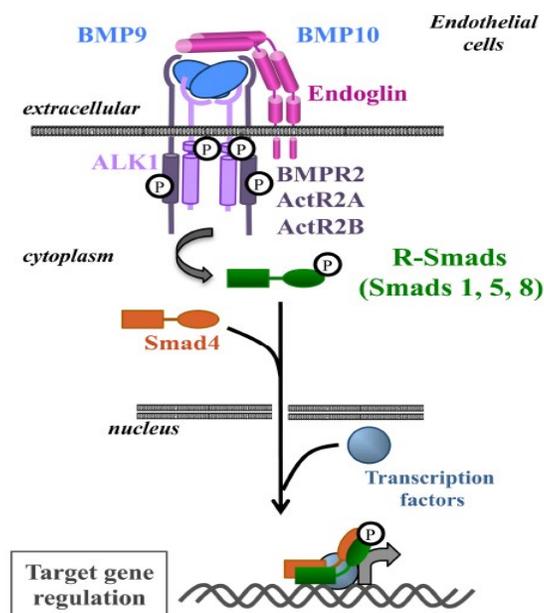


Figure 4.1 Signalisation du récepteur Alk1. Tire du Emerging roles of BMP9 and BMP10 in hereditary hemorrhagic telangiectasia.¹⁶⁸

4.4.8 Perte de fonction de la signalisation Alk1 dans l'endothélium

Certains sous-groupes de patients HHT ayant une mutation des gènes *ALK1* et *Eng* peuvent aussi développer une hypertension artérielle pulmonaire (PAH)¹⁶⁹. Cette maladie progressive et fatale se manifeste par une élévation exagérée de la pression pulmonaire. Les altérations génétiques impliquant l'HHT peuvent aussi inclure des altérations des récepteurs de type II ou le *BMPR2*. Ces altérations génétiques rencontrées dans l'HHT se caractérisent par le dysfonctionnement de

l'endothélium suite à une série d'évènements incluant l'apoptose des CE capillaires, une hyperprolifération et une angiogenèse menant à un endothélium instable et désorganisé¹⁷⁰.

4.4.9 La délétion d'Alk1 favorise l'apoptose des cellules endothéliales

Une étude récente, fait par le laboratoire du Dr. Nassim à la Université de London a identifié les effets favorables à la survie de la signalisation induite par BMPRII dans les cellules endothéliales. Ils ont étudié les mécanismes sous-jacents par lesquels BMPRII régule les effets anti-apoptotiques tout en caractérisant l'effet de la signalisation des BMP sur l'apoptose. En bref, des cellules HEK293T (cellules 293 de rein embryonnaire humain) ont été stimulées avec un ligand BMP4/9.¹⁷¹ Ensuite ils ont évalué l'activité des de la caspase 3/7 ayant comme résultat une atténuation dans l'activité de la caspase. Ce que suggérait que les cellules endothéliales répondaient positivement à l'activation de la signalisation BMP via le récepteur Alk1, ceci en atténuant les niveaux des Caspase 3/7. Ces données ont permis de déterminer qu' Alk1 a un rôle important dans la survie de cellules rénales¹⁷¹.

4.4.10 Perte d'Alk1 augmente la synthèse de matrix extracellulaire

Le facteur de croissance transformant bêta 1 (TGF- β 1) joue un rôle majeur dans la fibrose tissulaire. Compte tenu qu'Alk1 est un récepteur de type I du TGF- β 1 qu'il est impliqué dans la biologie cellulaire et la signalisation du TGF- β . Il a été démontré qu'Alk1 a une action particulière dans la biologie des fibroblastes.

Des résultats de recherche récentes ont montré qu'Alk1 régule l'expression de la protéine ECM dans un modèle murin de néphropathie obstructive.¹⁷² Ce groupe a utilisé un modèle de souris ayant des fibroblastes embryonnaires (MEF) $+/+$ et ALK1 $+/-$ qu'ils ont stimulé avec TGF- β 1 et inhibiteurs. Ayant observé que les souris hétérozygotes Alk1 montrent une expression accrue des protéines de la MEC (collagène I, fibronectine et CTGF / CCN2), une prolifération cellulaire et une migration en raison d'une altération de la signalisation du TGF- β / Smad. La rupture dû à une augmentation de la phosphorylation de Smad2 et Smad3. En conséquence, ils ont observé une augmentation de CTGF / CCN2, de la fibronectine et du collagène I. Par conséquent, nous suggérons

que ALK1 joue un rôle important dans la régulation de l'expression, de la prolifération et de la migration des protéines ECM¹⁷².

4.5 Inhibition de la voie Alk1/BMP9 comme cible thérapeutique

4.5.1 L'anticorps anti-hALK1 comme une cible thérapeutique

Des agents ciblant Alk1 sont déjà utilisés en clinique. Les nombreux rôles déjà décrits sur l'Alk1 ont donné suite à des essais cliniques inhibant ce récepteur. Les inhibiteurs d'Alk1 sont utilisés afin de bloquer l'angiogenèse anormale qui caractérise les tumeurs solides dans le cancer. Les résultats de ces essais cliniques jusqu'à nos jours, sont très prometteurs.

En relation avec les effets d'alk1 sur la voie de signalisation BMP9, il a été démontré que l'anticorps anti-Alk1 bloque la signalisation induite par la BMP9 dans les cellules endothéliales, bloquant l'angiogenèse anormale typique du cancer. (Figure 4.2) Cependant, ces effets anti-angiogéniques n'ont pas encore été évalués ni sur l'endothélium glomérulaire ni en présence d'une hyperglycémie chronique, ce qui est le but de notre projet¹⁷².

4.5.2 L'inhibition de la signalisation ALK1 en utilisant le dalantercept

Dalantercept est une protéine de fusion recombinante entièrement humaine produite par la liaison du domaine extracellulaire du récepteur Alk1 humain à la partie Fc de l'immunoglobuline humaine G1 (ALK1-Fc).¹⁷³ Elle fonctionne comme un piège sélectif pour BMP9 / BMP10 alors que le blocage de la signalisation ALK1 par ALK1-Fc entraîne un développement défectueux des réseaux vasculaires et lymphatiques *in vivo*.¹⁷⁴ . Dans cette étude il a été montré que l'inhibition combinée des voies ALK1 et VEGFR a des effets profonds sur l'angiogenèse tumorale.

Le mécanisme d'action du traitement d'association est probablement dû en partie à une dérégulation des voies de signalisation VEGF / VEGFR, BMP / ALK1 et DII4 / Notch interconnectées, ce qui interfère avec le développement de la résistance acquise par le récepteur type tyrosine kinase du VEGF.

Ainsi, l'antagonisme combiné des voies ALK1 et VEGFR semble être option thérapeutique pour les patients atteints d'un carcinome des cellules rénale avancé.¹⁷⁵

4.5.3 L'anticorps anti-BMP9 comme une cible thérapeutique

BMP9 ait été impliqué est dans la prolifération et la migration de cellules endothéliales et nombreux autres processus physiologiques qu'on décrit auparavant. Cependant, ses fonctions restent controversées et spécifiques au contexte. À ce jour, l'effet du ciblage pharmacologique sélectif de la BMP9 a été évalué que sur la progression tumorale et l'angiogenèse in vivo. Il a été décrit que des niveaux significativement élevés de précurseur BMP9, suggérant que plus de BMP9 est produite chez les patients cancéreux. Ceci en raison du déplacement de pro-domaine après la liaison au récepteur BMP9.

Il a été démontré qu'il y a des taux élevés de BMP9 chez les patients cancéreux, en particulier dans les cas de cancer du sein.¹⁷⁶ Ceci a motivé l'intérêt du groupe de Dr. Kienast en Allemagne qui ont voulu évaluer le potentiel du traitement anticancéreux anti-BMP9. Ils ont généré un anticorps monoclonal sélectif BMP9, l'anticorps anti-BMP9 BMP90093, qui cible toutes les différentes formes de BMP9 (protéine précurseur BMP9, BMP9 complexé au pro-domaine et la cytokine BMP9 mature). Compte tenu le rôle de cette protéine dans le maintien de l'endothélium ils s'attendaient d'avoir une réponse inhibitoire au niveau de croissance de la tumeur et l'organisation de l'endothélium¹⁷⁶.

Cependant, ces résultats étaient étonnants puisque la neutralisation sélective de BMP9 n'a eu aucun effet sur les cellules endothéliales in vivo. De plus, ils n'ont pas détecté aucune diminution significative de la densité microvasculaire (MVD) et des investigations ultérieures ont révélé que l'architecture vascularisée n'était pas affectée par le traitement avec l'AcM BMP9-0093, sans effet sur la longueur et le diamètre des vaisseaux ni sur leur perfusion¹⁷⁶.

En revanche, la double neutralisation de BMP9 / BMP10 par ALK1-Fc ou ALK1-ciblage par un anticorps monoclonal a conduit à une inhibition de la croissance tumorale associée à une réduction du MVD dans plusieurs modèles de xénogreffes. Ce qu'a donné des résultats encore plus controversés et a laissé la porte ouverte à des nouveaux essais afin de mieux comprendre le rôle de l'inhibition de BMP9 dans le cancer. Il faut souligner que qu'aucune de études récentes ont été réalisées sur un contexte d'hyperglycémie chronique ou même dans la néphropathie diabétique tant que tel¹⁷⁶.

Ces données montrent que les composantes de la signalisation Alk1/BMP9 sont cruciales pour le maintien l'endothélium. Cependant, le rôle de cette voie de signalisation dans la néphropathie diabétique n'a pas été évalué auparavant.

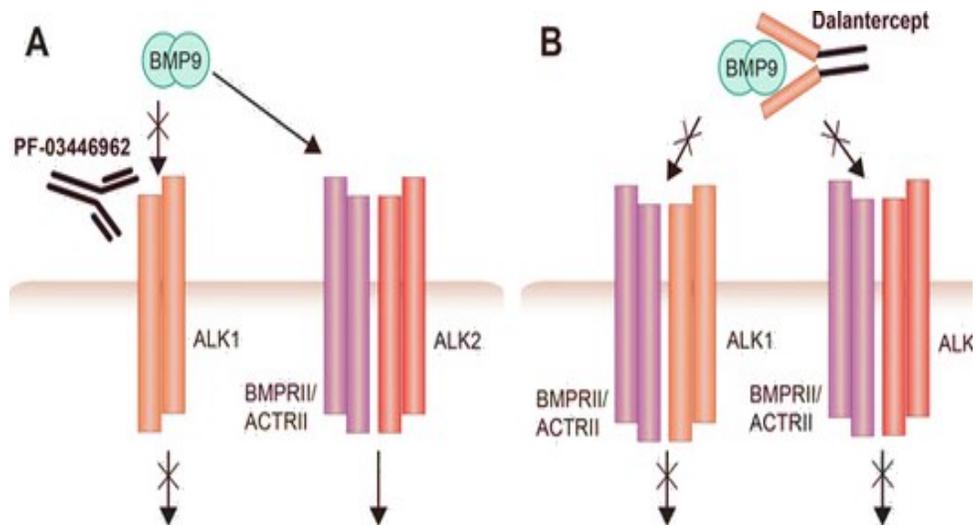


Figure 4.2 Anti-ALK1 sur des essais cliniques pour le traitement des tumeurs solides dans le cancer (Tire de clinicaltrials.gov)¹⁷⁷

Chapitre 5 – Contexte du projet, hypothèse et objectif de recherche

5.1 Problématique

La néphropathie diabétique est l'une des complications microvasculaires les plus fréquentes chez les patients diabétiques. Elle est la première cause de maladie rénale chronique ayant besoin de dialyse, et affecte la qualité de vie de millions de patients par année.

Une revue de la littérature nous a permis de discuter du rôle du dysfonctionnement endothélial dans la pathogenèse des lésions glomérulaires impliquées dans maladie rénale diabétique et son pronostic. Les traitements actuels sont surtout concentrés sur le contrôle intensif de la glycémie et de la pression artérielle, laissant de côté la pertinence clinique du dommage endothélial et en même temps celle de l'interaction des CE et podocytes associés à la ND. Il a été suggéré que les traitements anti-hypertensifs pourraient offrir des effets sur l'endothélium glomérulaire. Cependant, des molécules ciblant directement le dommage endothélial ne sont pas disponibles. Certains facteurs anti-angiogéniques tels que les inhibiteurs du VEGF ont déjà été testés sur des modèles murins. Malgré cela et d'innombrables efforts, ces molécules sont encore très loin de pouvoir être considérées comme thérapie pour la ND.

Bien qu'il semble que les injections d'anti-VEGF puissent prévenir les lésions rénales et les altérations glomérulaires dans des modèles de souris diabétique, des études ont aussi prouvé que ces injections d'inhibiteurs du VEGF pourraient être catastrophiques pour les cellules endothéliales et podocytaires. Ainsi, la recherche de nouvelles molécules ciblant le dommage endothélial dans la ND doit demeurer très active. Nous proposons l'étude de la voie Alk1/BMP9 comme nouvelle cible thérapeutique dans la néphropathie diabétique, ceci en raison de ses effets anti-angiogéniques et dans le remodelage vasculaire.

5.2 Contexte du projet du projet

Des données préliminaires de notre groupe ont montré que l'haploinsuffisance d'Alk1/bmp9 en présence d'une hyperglycémie chronique exacerbe l'hyperperméabilité de l'endothélium rétinien. Cette hyperperméabilité est associée à une réduction des niveaux de protéines des jonctions de type occludines et VE-cadhérines ^{178(p9)}. Nous avons montré dans une étude préliminaire (Chapitre 8-Article 2) que plusieurs facteurs protecteurs vasculaires étaient inhibés ou inactivés en présence d'une hyperglycémie chronique dont la voie de quiescence BMP9/Alk1/Smad1,5,8. Les résultats de cette étude nous ont amenés à démontrer que l'activation d'Alk1/ BMP9 en hyperglycémie renforce la barrière inter endothéliale, par la stabilisation des niveaux de protéines VE-cadhérine et occludine, qui facilite ainsi les co-localisations jonctionnelles. ¹⁷⁸ Nous avons donc pu conclure que Alk1 joue un rôle crucial dans l'intégrité vasculaire, et que sa perte de fonction dans le diabète peut mener à des complications vasculaires importantes. Dans le rein, il a été suggéré que Alk1 joue un rôle important dans la régulation du dépôt de matrice extracellulaire et que la perte d'Alk1 était associée à une fibrose rénale accrue dans un modèle murin de néphropathie obstructive ¹⁷⁹.

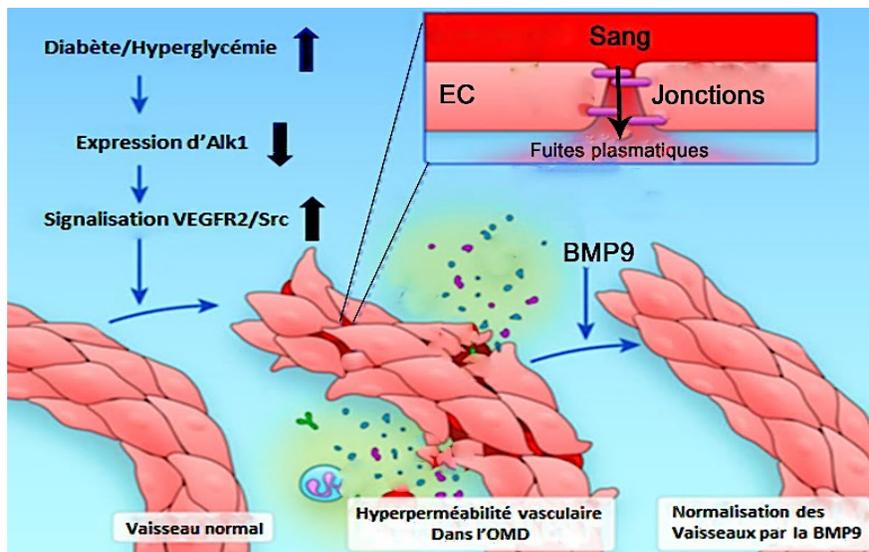


Figure 5.1. La perte partielle d'alk1 augmente la perméabilité vasculaire (Tire de l'ahajournals/ATVBAHA) ^{178,180}. La perte de la signalisation Alk1 dans le diabète exacerbe la signalisation VEGFR2/Src et l'hyperperméabilité rétinienne. Mécaniquement, la déficience d'Alk1 exacerbe la signalisation VEGF/VEGFR2/Src,

menant à la dégradation des jonctions d'ancrage VE-cadhérines, ce qui peut expliquer en partie l'hyperperméabilité de l'endothélium hyperglycémique.

5.3 Hypothèse de recherche

La signalisation Alk1 joue un rôle essentiel dans le contrôle de la perméabilité vasculaire. Nous avons trouvé que des altérations moléculaires des protéines jonctionnelles et la perte d'intégrité de la barrière endothéliale menant à l'hyperperméabilité hyperglycémique étaient associées à une perte de fonction de la voie BMP9/Alk1. Basés sur nos données préliminaires, nous pouvons émettre l'hypothèse que la diminution des niveaux d'Alk1 dans l'endothélium glomérulaire hyperglycémique fragiliserait l'intégrité vasculaire, causant indirectement la perte de podocytes. Nous émettons l'hypothèse que la voie de signalisation alk1/bmp9 pourra potentiellement jouer un rôle dans le maintien et la stabilité de l'endothélium glomérulaire.

5.4 Objectifs de recherche

1. Démontrer l'expression rénale d'alk1 chez la souris et chez les patients ayant un diagnostic de ND.
2. Caractériser le rôle d'alk1 dans la fonction rénale à court et à long terme en utilisant des modèles des souris ayant des délétions spécifiques d'ALK1 dans l'endothélium.
3. Comprendre l'implication de la perte de fonction d'ALK1 dans la fonction rénale en utilisant un modèle de néphropathie diabétique afin de déterminer son rôle dans la progression de la maladie rénale chronique.

Chapitre 6 – Premier article scientifique (premier auteur)

Alk1 haploinsufficiency causes glomerular dysfunction and microalbuminuria in diabetic mice

Cindy Lora Gil^{1,2}, Nathalie Henley², François A. Leblond², Naoufal Akla², Louis-Philippe Laurin², Casimiro Gerarduzzi², Vincent Pichette² and Bruno Larrivée^{1,2,3*}

¹ Department of Biomedical Sciences, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

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

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

*Corresponding author: Bruno Larrivée, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 boul. L'Assomption, Montréal, QC, Canada, H1T 2M4

6.1 Abstract

Endothelial dysfunction has been shown to play an important role in the pathogenesis of glomerular damage during diabetic kidney disease (DKD). As such, a better understanding of the molecular mechanisms involved in glomerular endothelial dysfunctions could provide novel therapeutic strategies for the prevention of DKD. We have previously shown that Alk1/BMP9 signaling plays an important function to maintain vascular integrity in diabetic animals. As such, we evaluated the effects of Alk1 suppression on glomerular endothelial function in diabetic mice.

In the present study, we used mice with conditional heterozygote deletion of Alk1 in the endothelium (Alk1 Δ EC) to evaluate the role of Alk1 on kidney function during STZ-induced diabetes. DKD was investigated in diabetic control and Alk1 Δ EC mice euthanized eight weeks after the onset of diabetes. We showed that Alk1 expression is reduced in the glomeruli of human DKD patients, and, to a lesser extent in diabetic mice. While renal function was not altered in Alk1 Δ EC non-diabetic mice, we showed that Alk1 haploinsufficiency in the glomerular endothelium leads to microalbuminuria, glomerular apoptosis and podocyte loss in diabetic mice. These data suggest that Alk1 is important for the proper function of glomerular endothelial cells and that decreased Alk1 combined with chronic hyperglycemia can impair renal function.

6.2 Introduction

Diabetes is the leading cause of end-stage kidney failure in the developed world ¹⁸¹. Diabetic kidney disease (DKD) is characterized by dysfunction and damage to the renal microvasculature ¹⁸². In particular, the glomerulus is the primary site of diabetic injury in the kidney. Glomerular hypertrophy and loss of podocytes, which are involved in glomerular filtration and maintenance of healthy kidney function, have been shown to be hallmarks of progressive DKD, and the degree of podocyte depletion correlates with the stage of the disease ^{183,184}. In the earlier stages of the disease, glomerular hyperfiltration and hypertrophy, basal glomerular membrane thickening and microalbuminuria are usually observed and are followed by mesangial matrix expansion and proteinuria ¹⁸⁵. Subsequently, nodular glomerulosclerosis and worsening proteinuria develop at an advanced stage, leading to end-stage kidney disease ¹⁸⁶. Glomerular endothelial dysfunction, through the involvement of reactive oxygen species and mitochondrial stress, has been shown to be critical in the early steps of the pathogenesis and progression of DKD ¹⁸⁷. New treatments that aim to restore endothelial function could represent an effective strategy for preventing and treating the early stages of DKD.

In diabetic glomeruli, increased levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) leading to new capillary formation and pre-existing capillary elongation have been reported ¹⁸⁸. Furthermore, exacerbated activation of glomerular VEGF signaling in mice has been shown to cause mesangial matrix expansion, which has also been associated with DKD ¹⁸⁹. Therefore, anti-angiogenic therapies targeting VEGF signaling have been explored as options for the prevention and treatment of DKD. Indeed, the renal protective efficacy of anti-VEGF antibodies in diabetic mice have previously been reported ¹⁹⁰. However, concerns have been raised in regards to anti-VEGF unwanted effects on the microcirculation, including potential renal thrombotic microangiopathy ¹⁹¹. For these reasons, the identification of vascular signaling pathways involved in the pathogenesis of DKD could lead to a better understanding of the molecular events involved in glomerular vascular injury and allow the development of improved therapeutic strategies while minimizing side-effects.

The Bone Morphogenetic Protein (BMP) receptor Activin receptor–like kinase 1 (Alk1), which is predominantly expressed in the vascular endothelium, has been shown to play a critical role in angiogenesis ^{192(p1),193(p1),194(p1)}. Embryos lacking Alk1 die early during embryonic development due to impaired vascular remodeling and lack of perivascular cell coverage ¹⁹⁵. In renal physiology, Alk1 has been suggested to play an important role in the regulation of extracellular matrix deposition, including collagen type I and fibronectin, and Alk1 heterozygosity has been associated with increased renal fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy, probably due to the decrease in the Alk1/Smad1 antifibrotic/protective signaling in renal fibroblasts ¹⁹⁶.

We have previously shown that chronic hyperglycemia in a model of STZ-induced diabetes in mice leads to impaired Alk1 signaling and contributes to loss of retinal vascular barrier function ¹⁹⁷. Given its critical role in the maintenance of a quiescent, stable endothelium as well as its described effects on perivascular cell recruitment ^{195,198}, we evaluated the role of Alk1 in the kidney during the development of diabetic nephropathy. In the present study, we show the worsening of kidney function in diabetic mice haploinsufficient for Alk1 solely in the endothelium. Reduced Alk1 expression was associated with microalbuminuria, increased glomerular apoptosis as well as podocyte loss. Together, these data suggest that vascular Alk1 signaling is protective in glomerular endothelial cells in diabetic conditions.

6.3 Material and Methods:

Human samples: The study conforms to the tenets of the Declaration of Helsinki, and approval of the human clinical protocol was obtained from the Maisonneuve-Rosemont Hospital Ethics Committee. All subject recruitment procedures and informed consent forms, including consent to use renal biopsy samples for research purposes, were approved by the Maisonneuve-Rosemont Hospital Ethics Committee and written informed consent was obtained from each patient.

Animals: The Maisonneuve-Rosemont Hospital ethics committee, overseen by the Canadian Council for Animal Protection, approved all experimental procedures (protocol number: 2014-18). All the animal experiments were conducted according to the Standard Operation Procedures (SOP) of the Maisonneuve-Rosemont Hospital Animal Ethics Committee. C57BL/6J mice (Jackson Laboratories) were maintained in the animal research facility in Maisonneuve-Rosemont Hospital. Tamoxifen-inducible *Cdh5-CreErt2* and *acvr1* floxed mice were kindly provided by Ralf Adams^{199(p1)} and S. Paul Oh respectively²⁰⁰. To generate *Alk1ΔEC* mice, *Cdh5-CreErt2* and *acvr1* floxed mice were crossed and injected with 50 mg/kg tamoxifen dissolved in corn oil for five consecutive days.

Streptozotocin (STZ) induced diabetes: Six to eight-week old *Alk1ΔEC* mice were individually marked, weighed and their baseline blood glucose levels determined prior to STZ injection. Mice received daily intraperitoneal (IP) injections of 45 mg/Kg body weight STZ (Sigma-S0130) dissolved in sterile sodium citrate dehydrate buffer, pH 4.5 for 5 consecutive days. For non-diabetic controls, mice received citrate buffer injections. Tail blood glucose was monitored (AlphaTrak 2) every week for up to 8 weeks after the final STZ injection. Mice were considered diabetic if their non-fasted blood glucose levels reached 17 mM (300 mg/dL).

Urine and Blood Collection: Urine samples were collected from animals in individual urine collection cages after acclimatization for 24 h and stored at -80°C until analysis. Blood was collected from mice through cardiac punctures into tubes containing EDTA for plasma or allowed to clot for 30 min at room temperature for serum, and centrifuged at 4°C for 15 min at $1\ 000 \times g$. Serum or plasma were removed and assayed immediately or stored at -80°C .

Evaluation of Biochemical parameters: Creatinine clearance was calculated and expressed as milliliters per min per 100 g of body weight. Serum and urine creatinine levels and urine albumin concentration were determined as previously described (CREP2, Roche Diagnostics, Canada) ²⁰¹. Briefly, samples were prepared by transferring 50µl of standard or serum to a 1.5 ml microcentrifuge tube. Proteins were precipitated and supernatant were lyophilized on a speed vac (LABCONCO freeze Dry system, VWR, Canada). Lyophilized samples were resuspended in deionized water and then centrifuged at 11 000 x g for 5 min. 8µl of each supernatant were transferred to a half area plate (Costar #3695), in duplicate. 62µl of CREP2 R1 buffer was added to each well. The plate was vortex mixed (MixMate, Eppendorf, Canada) at 1000 rpm 30 sec, and incubated 15 min at 37°C to allow endogenous creatinine degradation. Readings at 405 nm and 540/630nm were performed and CREP2 R2 buffer was then added to each well. Readings were performed on a kinetic mode, each minute for a 30 minutes period (ELx808, BioTek, USA). Urinary Creatinine and urine proteins were measured on an Architect c16000 clinical chemistry analyzer (Abbott Diagnostics, IL, USA), using a kinetic alkaline picrate method and a turbidimetric method respectively. Microalbuminuria was assessed using a Mouse Albumin ELISA Kit (ICL LAB, Portland, OR).

Immunofluorescence: Immunofluorescence was performed using frozen sections (10 µm). The following antibodies were used as primary antibodies: monoclonal rat anti-CD31 antibody (BD Biosciences); polyclonal rabbit anti-type IV collagen antibody (Abcam); anti-Alk1 antibody (R&D systems); anti-Nephrin antibody (Abcam); anti-WT1 antibody (Abcam); anti-podocin antibody (Abcam). Alexa Fluor 488 or 647 conjugated antibodies (Thermo Fischer Scientific) were used as secondary reagents. Images were obtained by confocal microscopy (Olympus Fluoview).

Determination of Glomerular Surface Area

CD31 immunofluorescence staining from the different treatment groups was used for morphometric studies. The surface area of a minimum of 50 glomerular sections from each animal was determined in digital images using the ImageJ software. Glomerular surface area was measured in captured digital images by tracing around the perimeter of the glomerular capillary tuft using the tracing tool.

Cell culture

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) were obtained from PromoCell and cultured in endothelial growth medium ECGM-2 (Lonza) and kept at 37°C and 5% CO₂. For RNAi experiments, cells were seeded in 6-well plate with complete media till 90% confluency was reached. Cells were then transfected with 75 pmol/well of target or control siRNA for 48 hours. mRNA was isolated using RNeasy kit (Qiagen) and cDNA was synthesized using iScript cDNA synthesis kit. Primers for quantitative PCR were obtained from QIAGEN (Quantitect primer assays).

Statistical analysis: All values are expressed as the mean ± standard error (SEM). Unpaired Student t tests were utilized for inter-group comparisons. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software. A level of P <0.05 was considered statistically significant.

6.4 Results

Glomerular expression of Alk1 in mice and DKD patients.

We have recently shown that chronic hyperglycemia impairs Alk1 signaling, which in turn impacts retinal barrier function in diabetic animals ¹⁹⁷. Given the importance of the endothelium in renal filtration and its susceptibility to dysfunction in diabetes, we evaluated the role of Alk1 in glomerular endothelial cell function and renal filtration in diabetic animals. We first assessed Alk1 expression in mouse kidney by immunofluorescence. In adult mouse kidneys, immunostaining of glomeruli and small blood vessels of the renal interstitium using CD31 and Alk1 antibodies showed that both markers co-localized in the glomerular endothelium (**Fig. 6.1A**). However, we did not detect cross-reactivity of either Alk1 or CD31 with the tubular epithelium or interstitial cells. Next, as we have previously shown that Alk1 expression is reduced in the pulmonary and retinal endothelium of diabetic mice ¹⁹⁷, we also evaluated Alk1 expression in the glomerular endothelium in mice eight weeks after the onset of STZ-induced diabetes and in renal biopsies obtained from diabetic nephropathy patients. In control diabetic mice, Alk1 expression, while showing a slight decrease, was not significantly reduced in glomeruli eight weeks after the onset of diabetes (**Fig. 6.1B**). However, histological assessment of Alk1 expression in the glomeruli of patients with DN revealed a significant loss of Alk1 glomerular immunostaining compared with non-diabetic patients (**Supplementary Fig. 6.1**). The observation that Alk1 was down-regulated in diabetic patients, which were characterized as stage 4 chronic kidney disease, and not in diabetic mice may be reflective of the advanced stage of diabetic nephropathy.

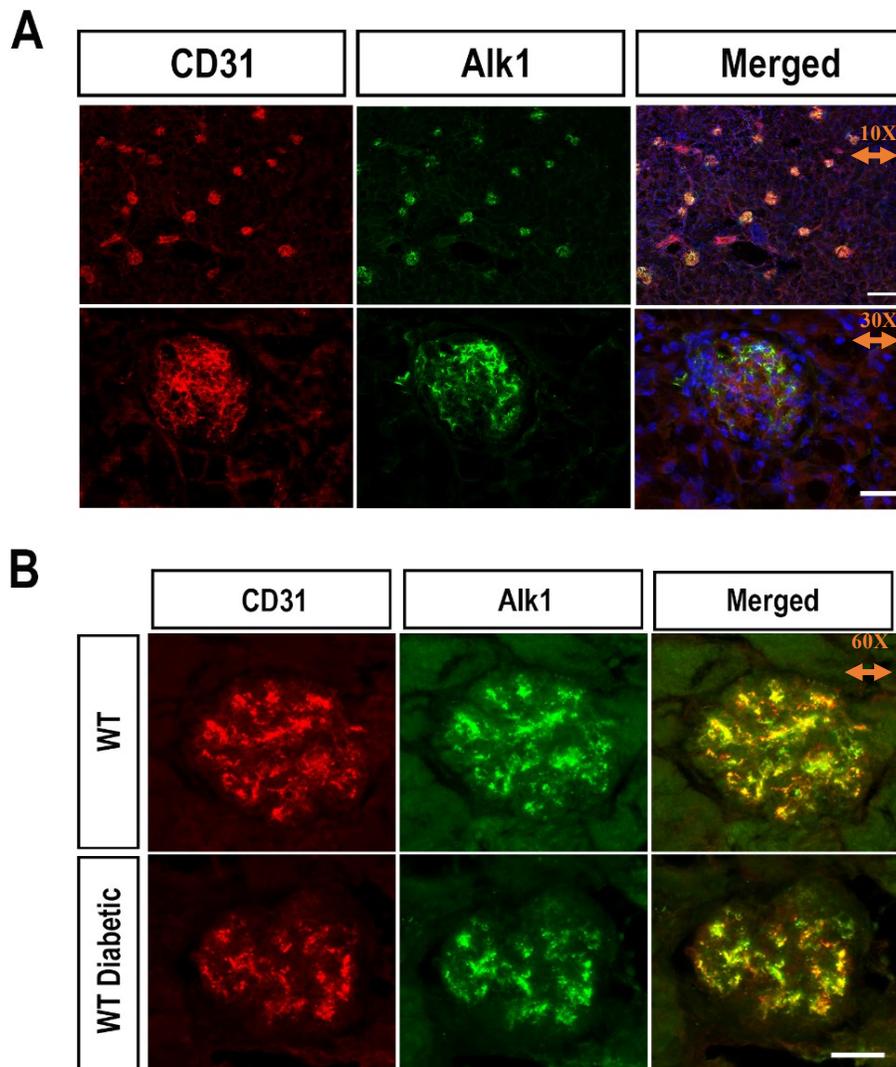


Figure 6.1. Expression of Alk1 in mouse kidney tissue. **A)** Immunofluorescent staining of Alk1 and CD31 in kidney sections harvested from eight-week old C57/Bl6 mice. Scale Bars: top row: 150 μ m; bottom row: 25 μ m. **B)** Expression of Alk1 in C57/Bl6 mice injected eight weeks previously with citrate buffer (top row) or STZ (bottom row). Scale bar: 25 μ m.

Evidence of urine albumin excretion and hyperfiltration in Alk1-deficient diabetic mice

In order to characterize the consequences of Alk1 deletion in the endothelium of diabetic mice on renal function, we used mice bred on a C57/Bl6 background with conditional deletion of *acvr1* in the endothelium (Alk1 Δ EC). The C57/Bl6 strain has been reported to be relatively resistant to the development of renal injury in experimental models of kidney diseases, including DKD²⁰². Indeed, albuminuria and renal pathological changes are less commonly observed in diabetic

C57/Bl6 mice than in other strains. However, several specific genetically modified mice with a C57/Bl6 background were shown to progress to diabetic nephropathy when diabetically-induced, such as the eNOS knockout in STZ-induced diabetic or db/db mice and the ApoE knockout in STZ-induced mice ²⁰³.

Given that Alk1 deficiency has been associated with eNOS uncoupling, reduced NO, and increased reactive oxygen species (ROS) production ²⁰⁴, we evaluated the consequences of Alk1 deficiency on renal function and whether diabetic Alk1 haploinsufficient mice would be more susceptible to develop renal dysfunction. To address this, control and heterozygous Alk1 Δ EC mice, in which Alk1 is specifically deleted in the endothelium, received tamoxifen followed eight weeks later by STZ injections to induce diabetes (**Fig. 6.2A**). Citrate buffer vehicle-injected control and Alk1 Δ EC mice served as nondiabetic controls. Heterozygous mice were used for STZ experiments, as the severity of the vascular phenotype and the short-term lethality of homozygous Alk1 Δ EC mice ²⁰⁵ preclude long-term experiments. While heterozygous Alk1 Δ EC mice develop no detectable blood vascular malformations, we have recently demonstrated that chronic hyperglycemia leads to impaired Alk1 signaling and vascular permeability defects in these animals ²⁰⁶.

Following STZ or citrate injections, blood glucose levels were measured weekly (**Supplementary Fig. 6.2A**) and all mice were euthanized 8 weeks later. The induction of diabetes in STZ-injected mice was confirmed by measuring blood glucose levels, which were not significantly different between control (33 mM) and Alk1 Δ EC (37 mM) mice (**Supplementary Fig. 6.2A; Fig. 6.2B**). Decreased Alk1 expression in glomeruli of Alk1 Δ EC+/- diabetic mice was also shown by immunofluorescence eight weeks after the induction of diabetes (**Supplementary Fig. 6.2B**). Eight weeks after STZ or citrate injections, mice were monitored for renal function by measuring creatinine clearance, microalbuminuria and urine electrolytes. Under non-diabetic conditions, Alk1 haploinsufficiency had no effects on urinary albumin excretion, body weight, daily urine volume, urine and serum electrolytes and serum creatinine (data not shown). Additionally, the extent of albuminuria, as assessed by the albumin-to-creatinine ratio of 24-hour urine albumin excretion at 8 weeks post-diabetes, was not markedly changed between control diabetic and non-diabetic mice (**Fig. 6.2C**), which is consistent with studies showing that mice bred on a C57/Bl6 background are refractory to diabetes-induced kidney disease ²⁰². However, in contrast to control

mice, $Alk1\Delta EC$ diabetic mice displayed increased microalbuminuria, an early sign of DKD (**Fig. 6.2C**). Significantly, no changes in glomerular filtration rate (**Fig. 6.2D**) or urine electrolytes were observed (**Supplementary Fig. 6.3**) between control and $Alk1\Delta EC$ diabetic mice, suggesting that $Alk1$ haploinsufficiency does not affect reabsorption in proximal tubules. Taken together, these data suggest that reduced $Alk1$ expression in the endothelium may predispose the kidney to glomerular dysfunction rather than affect tubule function in diabetic conditions.

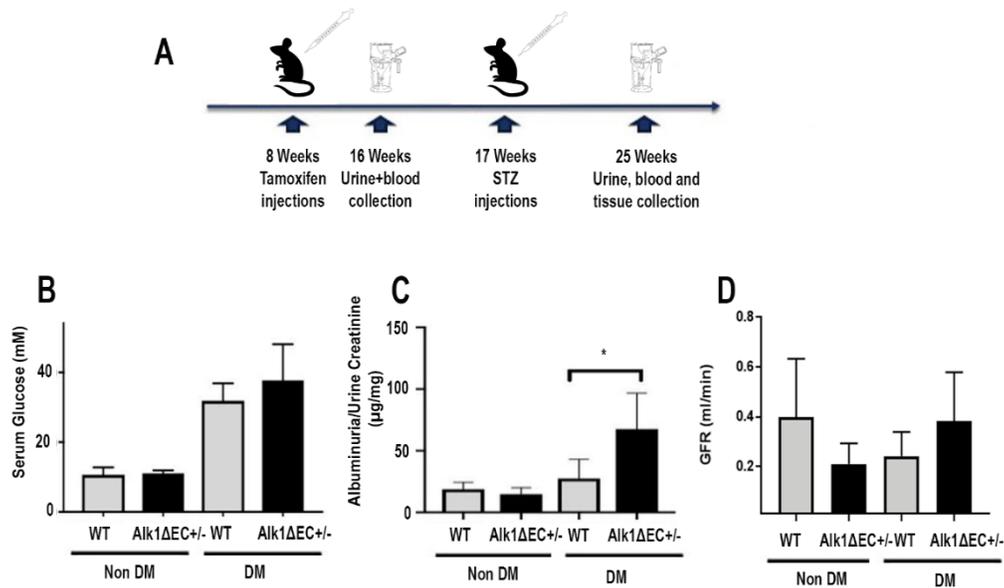


Figure 6.2. Evaluation of albuminuria in $Alk1\Delta EC+/-$ diabetic mice. **A**) Experimental timeline for the generation of diabetic $Alk1\Delta EC+/-$ mice, in which CRE-Ert2 expression was placed under the control of the VE-Cadherin promoter ($Cdh5$ -CRE). For inactivation of $Alk1$ in the endothelium, $Cdh5$ -CRE-Ert2 transgenic mice were crossed with homozygous or heterozygous $Acvr1$ floxed allele mice. **B**) Measurement of blood glucose levels in control and $Alk1\Delta EC+/-$ eight weeks after injection of sodium citrate or STZ. **C**) Measurement of ratio of albumin to creatinine levels in control and $Alk1\Delta EC+/-$ eight weeks after injection of sodium citrate or STZ. **D**) Measurement of glomerular filtration rate in control and $Alk1\Delta EC+/-$ eight weeks after injection of sodium citrate or STZ. * $p < 0.05$, ($n = 8$ mice/group).

Glomerular alterations in $Alk1$ -deficient diabetic mice

As our data suggest changes in glomerular barrier function in diabetic $Alk1$ -deficient mice, we evaluated glomerular histology in control and $Alk1\Delta EC$ non-diabetic and diabetic mice. Diabetes-induced glomerular hypertrophy is an early sign of renal dysfunction in diabetic patients²⁰⁷.

However, no significant changes in glomerular size could be observed between diabetic control and Alk1-haploinsufficient diabetic mice by fluorescence microscopy (**Fig. 6.3A**). Glomerular accumulation of mesangial matrix, including type IV collagen is also an early hallmark of DKD ²⁰⁸. Eight weeks after the onset of diabetes, no significant changes in collagen IV deposition were observed between control diabetic and non-diabetic animals nor between control and Alk1 Δ EC non-diabetic mice (**Fig. 6.3B**). However, compared to non-diabetic WT mice, Alk1 Δ EC diabetic mice showed significant increase in glomerular deposition of type IV collagen (**Fig. 6.3B**). These data are in accordance with previous studies showing that Alk1 heterozygosity is associated with increased matrix deposition by mesangial fibroblasts ^{196,209}. We subsequently investigated podocyte injury by evaluating the expression of desmin, a biomarker of injured podocytes. Our data show an increase in desmin-positive cells in diabetic Alk1-deficient mice compared to non-diabetic control mice (**Fig. 6.3C**). Together, these data suggest that Alk1 deficiency may accelerate glomerular extracellular matrix production and glomerular damage in diabetic mice and may be associated with the development of microalbuminuria.

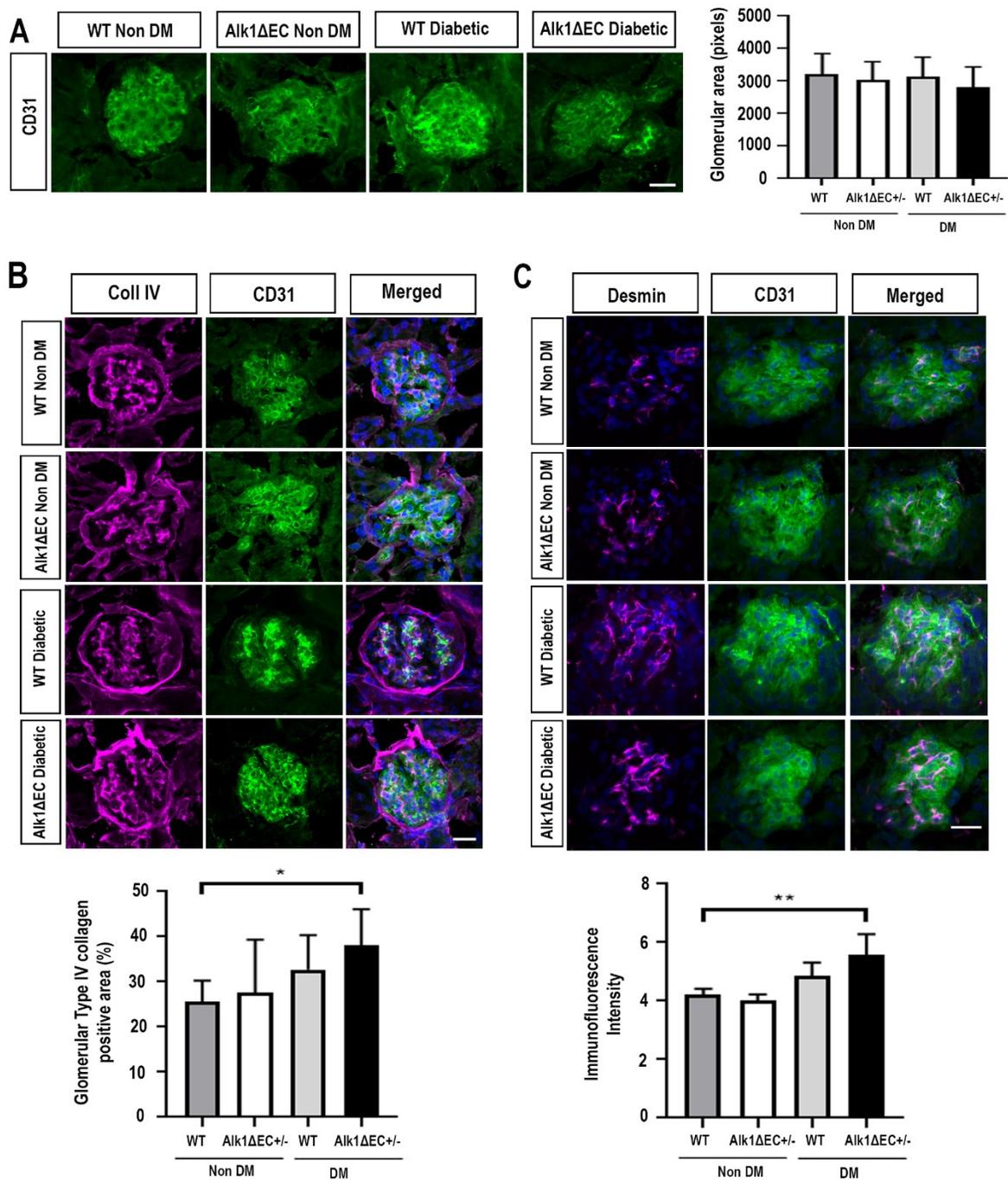


Figure 6.3. Alk1 haploinsufficiency exacerbates collagen IV matrix accumulation and podocyte injury indicator desmin in diabetic mice. **A)** Glomerular area analysis in non-diabetic wild-type and diabetic wild-type and Alk1 Δ EC $^{+/-}$ mice eight weeks after the onset of diabetes. Images show representative CD31 immunostaining, along with quantification of at least 50 glomeruli from 8 to 10 mice. **B)** The glomerular accumulation of type IV collagen was assessed by immunofluorescence for non-diabetic or diabetic wild-type and diabetic Alk1 Δ EC $^{+/-}$ mice. Immunoreactivity for type IV collagen was enhanced in diabetic Alk1 Δ EC $^{+/-}$ mice compared with

non-diabetic wild-type. **C)** Immunofluorescence analysis of desmin and quantification in non-diabetic or diabetic wild-type and diabetic Alk1 Δ EC \pm mice. Analysis show quantification of at least 50 glomeruli from 5 mice/group. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Scale bars: 25 μ m.

Glomerular filtration involves a complex cross-talk between endothelial cells and podocytes. As we observed significant microalbuminuria and increased matrix deposition in heterozygote Alk1 Δ EC diabetic mice, we evaluated the effects of Alk1 deletion in endothelial cells on glomerular podocytes and endothelial cells. Using WT-1 staining, which stains the nuclei of glomerular podocytes, we observed that Alk1 conditional deletion in endothelial cells resulted in significant podocyte loss in diabetic mice (**Fig. 6.4A**). The decrease of WT-1-expressing cells in Alk1 Δ EC diabetic mice was also accompanied by a reduction in the expression of nephrin, which encodes a member of the immunoglobulin family of cell adhesion molecules implicated in the glomerular filtration barrier in the kidney (**Fig. 6.4B**). Furthermore, a similar reduction was observed in podocin, a membrane protein that oligomerizes in lipid rafts together with nephrin to form filtration slits (**Fig. 6.4C**). To evaluate the consequences of Alk1 deficiency in glomerular endothelial cells, ERG staining, which specifically labels endothelial nuclei, was performed. There were no evident losses of ERG-positive endothelial cells between control and diabetic control and Alk1 Δ EC diabetic mice (**Fig. 6.4D**). Together, these data suggest that Alk1 deletion in diabetic glomerular endothelial cells causes glomerular injury through the loss of podocytes rather than endothelial cells.

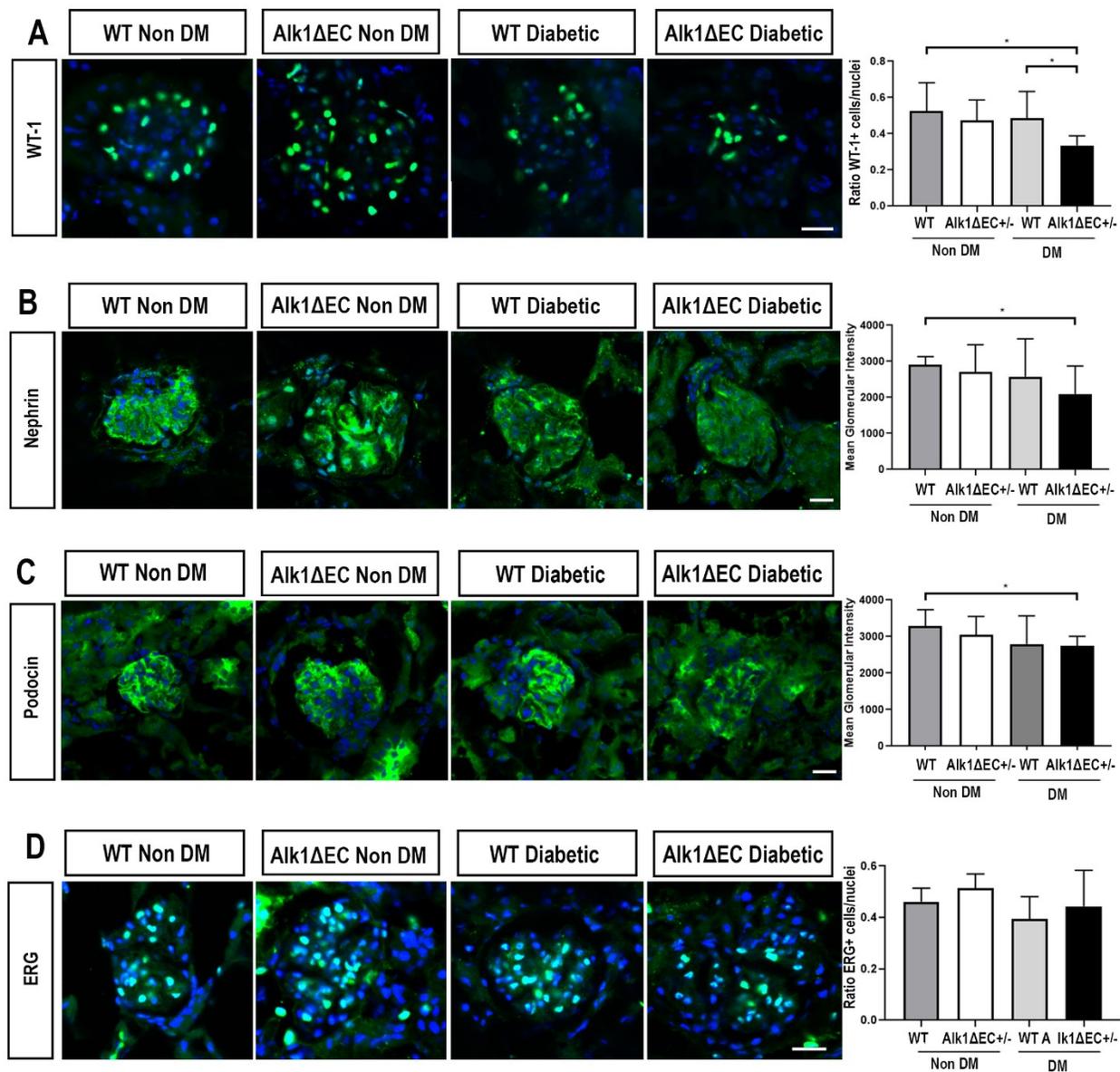


Figure 6.4. Effects of Alk1 haploinsufficiency on podocytes and endothelial cells in non-diabetic or diabetic wild-type and diabetic Alk1ΔEC+/- mice. Immunofluorescence analysis of WT-1 (A), nephrin (B), podocin (C) and ERG (D). Quantification was performed by evaluating the number of positive cells per glomerular nuclei for WT-1 and ERG staining, or by assessing glomerular staining intensity for nephrin and podocin. Analysis show quantification of at least 50 glomeruli from 5 mice/group. *p<0.05. Scale bars: 25μm.

To quantify the rate of glomerular apoptosis, cleaved caspase 3 staining was performed (Fig. 6.5). Positive cells in 50 glomeruli of at least five animals of each group were counted. No significant apoptosis was detected in control mice, both in non-diabetic or diabetic conditions. However, the

number of glomerular cells undergoing apoptosis was significantly increased in $Alk1\Delta EC$ diabetic mice compared to non-diabetic control or $Alk1\Delta EC$ animals. It is noteworthy that apoptosis appeared to be restricted mostly to the glomeruli. Altogether, these data show that $Alk1$ expression in the glomerular endothelium protects endothelial cells in diabetic animals, and that $Alk1$ deficiency may precipitate glomerular dysfunction leading to microalbuminuria and diabetic kidney disease.

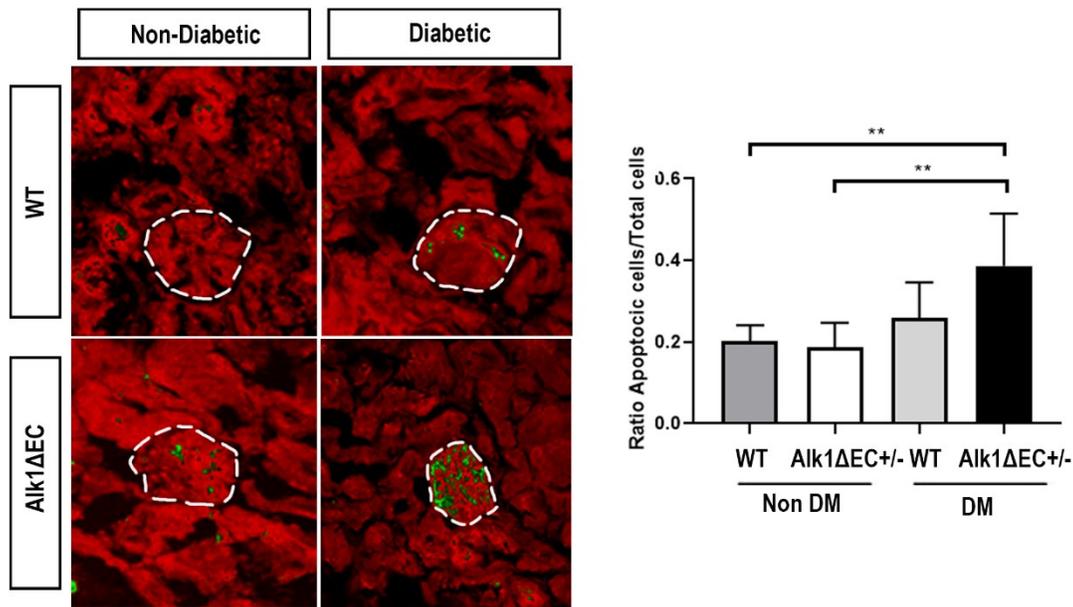


Figure 6.5. Increased glomerular apoptosis in diabetic $Alk1\Delta EC+/-$ mice. Immunofluorescence analysis of cleaved caspase 3 (green) in non-diabetic or diabetic wild-type and diabetic $Alk1\Delta EC+/-$ mice. Quantification was performed by evaluating the number of positive cells per glomerular nuclei. Analysis show quantification of at least 50 glomeruli from 5 mice/group. $**p < 0.01$. Scale bars: $75\mu m$.

$Alk1$ homozygosity leads to glomerular apoptosis

We have previously shown that chronic hyperglycemia results in impaired $Alk1$ signaling¹⁹⁷. The effects observed in heterozygous $Alk1\Delta EC$ diabetic mice may therefore be a combination of $Alk1$ haploinsufficiency which, combined with hyperglycemia, further inhibits $Alk1$ signaling leading to glomerular endothelial cell dysfunction. To evaluate whether complete loss of $Alk1$ was sufficient to induce glomerular dysfunction, we evaluated glomerular filtration in non-diabetic homozygote $Alk1\Delta EC$ mice. As homozygote $Alk1\Delta EC$ mice display high lethality after tamoxifen injections, we

evaluated renal function 5 days after the onset of Alk1 deletion. Loss of Alk1 expression in glomeruli of homozygote Alk1 Δ EC mice was shown by immunofluorescence (**Fig. 6.6A**). Five days following tamoxifen-induced deletion of Alk1, mice were placed in collection cages and serum and 24 hours urine was collected. Cdh5Cre mice injected with tamoxifen were used as controls. Contrary to what was observed in diabetic heterozygote Alk1 Δ EC mice, no albuminuria was observed in non-diabetic homozygote Alk1 Δ EC mice (**Fig. 6.6B**). Furthermore, no significant changes were detected in serum creatinine (**Fig. 6C**), glomerular filtration rate (**Fig. 6.6D**) urine or serum glucose (**Fig. 6.6E**). Serum and urine electrolytes levels were also measured in control and Alk1 Δ EC $^{-/-}$ mice (**Supplementary Fig.6.4**), and showed decreased levels of urine sodium and chloride levels in Alk1 Δ EC $^{-/-}$ mice. Since urine albuminuria and serum electrolytes did not vary between control and Alk1 Δ EC $^{-/-}$ mice, changes in sodium and chloride levels in urine may be indicative of vascular hyperpermeability or early cardiac failure, which have been associated with Alk1 loss-of-function^{206,210–212}.

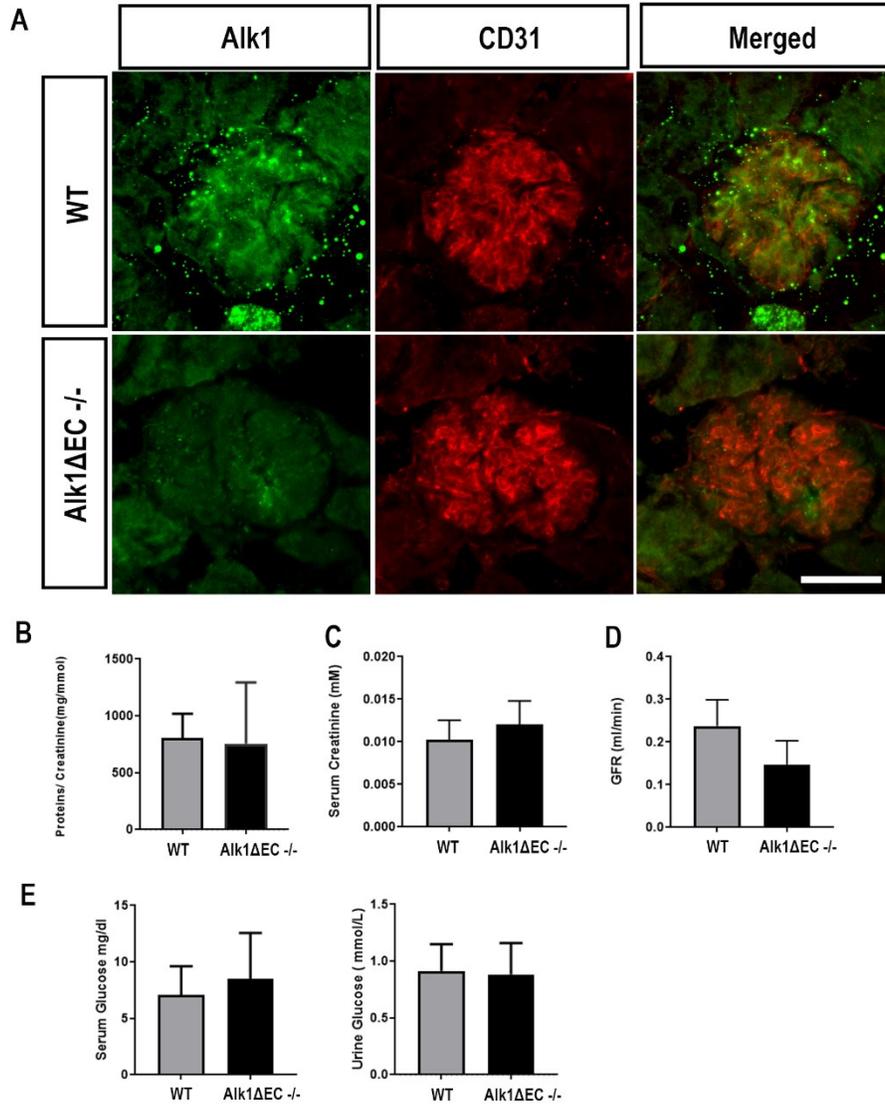


Figure 6.6. Effects of Alk1ΔEC homozygote deletion on renal function. **A**) Expression of Alk1 in Alk1ΔEC^{-/-} mice seven days after tamoxifen delivery. Urine proteins (**B**), serum creatinine (**C**), glomerular filtration rate (**D**), blood and urine glucose (**E**) in wild-type and Alk1ΔEC^{-/-} mice 7 days following tamoxifen injections. (n=8 mice/group). Scale bar: 50 μm.

Even though complete Alk1 deletion did not result in glomerular filtration defects within the time-frame of these experiments, we evaluated whether it could result in early glomerular alterations which could predispose to the development of glomerular dysfunction. While immunofluorescence staining did not reveal changes in WT-1-positive glomerular podocytes (**Fig. 6.7A**) or ERG-positive endothelial cells in homozygote Alk1ΔEC^{-/-} mice compared to control mice (**Fig. 6.7B**), we did observe increased glomerular apoptosis in Alk1ΔEC^{-/-} mice compared with

control mice, which may be a sign of early glomerular damage (**Fig. 6.7C**). Taken together, these data suggest that lack of Alk1 signaling can lead to increased glomerular apoptosis, which may precede podocyte loss. While we did not observe microalbuminuria in *Alk1 Δ EC $^{-/-}$* mice, the lack of effects on glomerular filtration may be resultant from the relative short time-frame of the experimental settings.

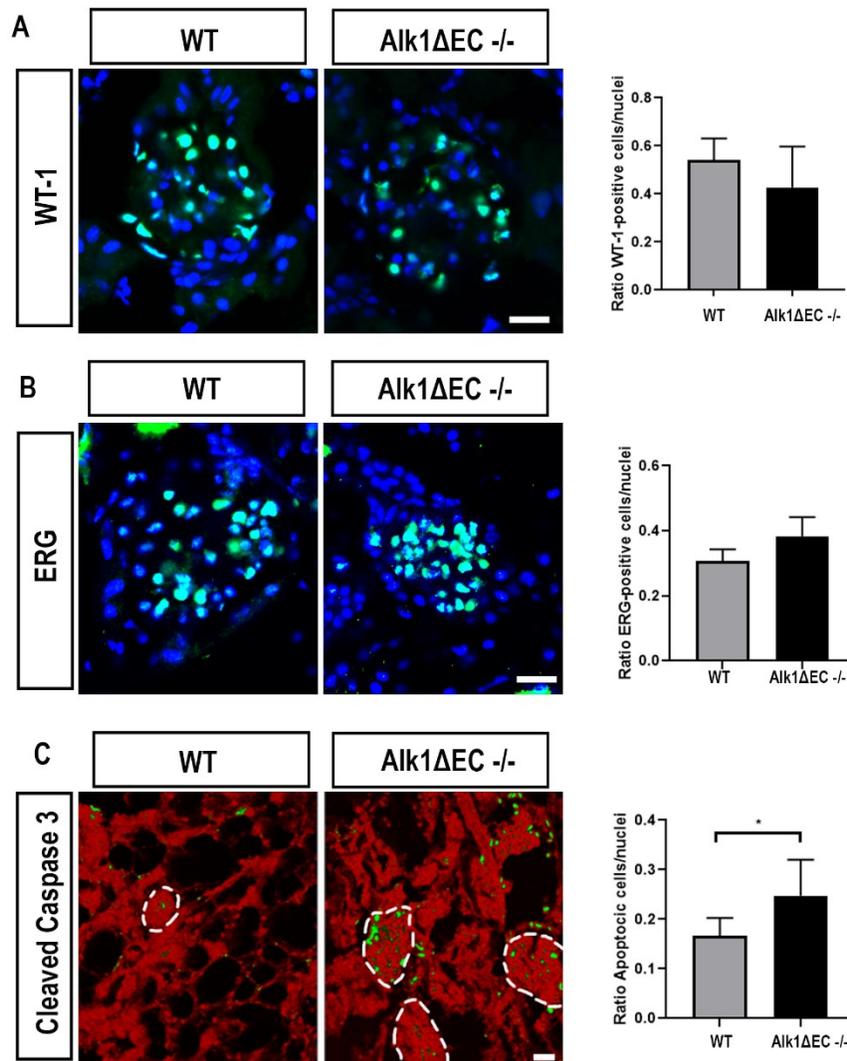


Figure 6.7. Effects of Alk1 homozygous deletion on podocytes and endothelial cells in wild-type and *Alk1 Δ EC $^{-/-}$* mice. Immunofluorescence analysis of WT-1 (**A**), ERG (**B**), and cleaved caspase-3 (**C**). Quantification was performed by evaluating the number of positive cells per glomerular nuclei. Analysis show quantification of at least 50 glomeruli from 5 mice/group. * $p < 0.05$. Scale bars: 25 μ m.

6.5 Discussion

Global endothelial dysfunction has been closely associated with diabetes. Some evidence suggests that endothelial dysfunction is present in the early stages of renal insufficiency and that it plays a role in the progression of renal disease. Thus, the glomerular endothelium, which has been linked to the development of proteinuria as a hallmark of diabetic nephropathy, may be a prominent target for damage in longstanding diabetes. Indeed, gene expression analysis of experimental DKD, as well as biopsies of patients with advanced diabetic nephropathy, has shown significant changes in endothelial gene expression consistent with glomerular endothelial cell dysfunction. Specifically, several genes of the TGF- β family, which play a prominent role in renal cell hypertrophy and extracellular matrix accumulation, have been shown to be dysregulated in the diabetic glomerular endothelium ²¹³. For example, TGF- β 1 expression has been found to be increased in diabetic mice presenting glomerulosclerosis and albuminuria, and contributes to disease progression through its effects on extracellular matrix deposition, including collagen IV, fibrosis and angiogenesis ^{214,215}. Dysregulation of other factors involved in TGF- β signaling, including BAMBI ²¹⁶, TGFBR2 and TGFBR3 ²¹⁷ have also been shown to be predisposing factors for the development of nephropathy in diabetic individuals.

Alk1 is a vascular-specific receptor of the TGF- β family and binds the circulating factors BMP9 and BMP10 ^{218,219}. Extensive work has been performed in the vascular field on Alk1, demonstrating its capacity to regulate morphogenesis, and its role as a quiescence receptor for endothelial cells ²¹⁹. Alk1 signaling is critical for the development of mature, functional vessels, as is made evident by Alk1-deficient homozygous mice displaying severe vascular developmental defects, including fusion of major arteries and veins, impaired placental vascular development and deficient perivascular cell coverage, and consequently die by mid-gestation¹⁹⁵. In adults, Alk1 helps prevent the formation of vascular lesions and plays a crucial role in endothelial quiescence, as demonstrated by the inducible-deletion of Alk1 in the endothelium at the post-natal stage, which results in rapid lethality ^{197,205}.

We have recently shown that in a model of STZ-induced diabetes, there is a significant impairment of Alk1 signaling in the retinal endothelium ¹⁹⁷. Inhibition of Alk1 signaling in hyperglycemic

endothelial cells resulted in the destabilization of vascular junctions, leading to fluid and protein leakage in the diabetic retina. Given the critical role of Alk1 in the maintenance of a mature, functional endothelium, we evaluated how long-term hyperglycemia affects Alk1 signaling, and the consequences of Alk1 haploinsufficiency on renal function. Under diabetic conditions, we revealed the worsening of urine albumin excretion and glomerular alterations within diabetic mice that were Alk1-haplodeficient in kidney endothelial cells. The data we collected provide evidence that genetic elimination of Alk1 renders mice on a C57BL/6 background more susceptible to the development of diabetic glomerular abnormalities, as determined by proteinuria and changes in podocyte survival and extracellular matrix production. The observation that non-diabetic Alk1 Δ EC haploinsufficient mice did not present urine albumin excretion and glomerular alterations suggest that an additional detrimental signal, such as chronic high glucose levels, is necessary to trigger vascular dysfunction in endothelial cells haploinsufficient for Alk1. Because Alk1 expression is also downregulated in glomeruli from biopsies of patients with DN, these considerations may also apply to human diabetic glomerulopathy, where therapeutic intervention using strategies to modulate BMP signaling may be of therapeutic interest.

Some of the main hallmarks of the inhibition of Alk1 signaling in the diabetic glomerular endothelium were the increased deposition of collagen IV basement membrane and the significant loss of podocytes. Collagen IV basement membrane thickness increased significantly in diabetic Alk1 Δ EC mice. These data are consistent with quantitative PCR analysis of *ACVRL1* siRNA-transfected endothelial cells, which show a significant increase in α 1 type IV collagen (COL4A1) expression compared to controls (**Supplementary Fig. 6.5**). Other glomerular basement membrane molecules, including fibronectin, Laminin α 4, Laminin β 2 or Laminin γ 1 did not change, while Laminin β 1 levels were decreased following Alk1 downregulation. These changes are consistent with a previous study showing that heterozygous Alk1 expression increased expression of ECM proteins in fibroblasts due to an alteration of TGF- β signaling, leading to an increase in Smad2 and Smad3 phosphorylation²⁰⁹. Our data show that Alk1 expression in the endothelium can also play an important role in building and maintaining the glomerular basement membrane and that its inhibition can alter its composition by increasing type IV collagen production in the

glomerular endothelium, which has been associated with the progression of diabetic nephropathy ²²⁰.

The loss of podocytes in Alk1 Δ EC diabetic mice was associated with increased albuminuria. The reason for the increased proteinuria and decreased podocyte numbers in diabetic Alk1 Δ EC mice is unclear but could be due to altered endothelial and podocyte cross-talk. Indeed, in the vascular endothelium, Alk1 signaling has been shown to play a role in the recruitment and function of perivascular cells such as pericytes, which occurs in part through the regulation of factors such as PDGF-B and Jagged1 by Alk1 signaling, which are essential in endothelial/perivascular cell interactions ^{193,198}. Therefore, heterozygous loss of Alk1, combined with chronic hyperglycemia and changes in basement membrane composition, could lead to the destabilization of endothelial/podocyte cross-talk, which could accentuate podocyte apoptosis and result in glomerular filtration defects. This is in agreement with previous studies showing that disruption of glomerular endothelial cells can lead to podocyte apoptosis ^{221,222}. While we did not observe significant podocyte loss in non-diabetic Alk1 Δ EC $^{-/-}$ mice, as experiments could only be performed over 7 days due to the lethality of these mice, we did show that there was significant glomerular apoptosis in these mice, which may be precursor to podocyte loss.

Overall, our results point to a role for Alk1 in protecting the glomerular endothelium during chronic hyperglycemia. Alk1 is downmodulated in a model of diabetes in mice and in biopsies from patients with established DN. Decreased Alk1 signaling in diabetes may be an early step in the development of glomerular endothelial dysfunction, leading to podocyte loss. This novel mechanism of Alk1 action in the glomerulus may be of significance not only for diabetic proteinuria but also for other diseases leading to glomerulosclerosis.

Acknowledgements

This work was supported by a grant-in-aid from the Heart and Stroke Foundation of Canada. B.L. was a recipient of a New Investigator Award from the Heart and Stroke Foundation of Canada. L.P.L is a Fonds de recherche du Québec – Santé Junior 1 Scholar.

Duality of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest relevant to this article.

Author contributions

C.L.G., N.H., F.A.L., N.A. and B.L. performed experiments, and analyzed data. L-P. L provided human kidney samples. C.L.G. and B.L. designed the experiments, reviewed all the data and wrote the manuscript. C.L.G., C.G., V.P. and B.L. reviewed and edited the manuscript.

Chapitre 7 – Discussion des résultats du projet

La néphropathie diabétique est l'une des complications les plus fréquentes chez les patients diabétiques à long terme, et est la première cause du besoin de dialyse. Les lésions glomérulaires semblent jouer un rôle clé dans le développement de la néphropathie diabétique. L'épaississement de la membrane basale glomérulaire, l'hypertrophie des cellules glomérulaires et la perte de podocytes font partie des principaux changements pathologiques survenant au cours de la néphropathie diabétique et peuvent conduire à une protéinurie.

Il a été suggéré que le dysfonctionnement endothélial joue un rôle important dans la pathogenèse des lésions glomérulaires au cours de la maladie rénale diabétique. En effet, l'altération de la fonction et de l'intégrité des cellules endothéliales glomérulaires est l'une des principales causes de la microalbuminurie observée dans l'insuffisance rénale diabétique précoce. Les lésions des cellules endothéliales glomérulaires peuvent endommager les podocytes et même induire une perte podocytaire ce qui aggrave d'avantage les liaisons des cellules endothéliales glomérulaires et ainsi de suite. Actuellement, les traitements de la néphropathie diabétique visent le contrôle de la glycémie et de la pression artérielle dans le but de maintenir un bon débit de filtration glomérulaire. Cependant, l'étude de traitements pouvant cibler les lésions endothéliales ou les interactions podocyte-cellule endothéliales, qui jouent un rôle essentiel dans la progression de la maladie rénale diabétique, est nécessaire.

Les traitements ciblant l'endothélium glomérulaire pourraient offrir des avantages thérapeutiques pour la néphropathie diabétique. En effet, des facteurs anti-angiogéniques tels que les inhibiteurs du VEGF pourraient prévenir les lésions rénales et les altérations glomérulaires sur des modèles de souris diabétiques. Cependant, d'autres données ont montré que des injections d'inhibiteurs du VEGF pouvaient être néfastes pour les cellules endothéliales et podocytaires. Ainsi, de nouvelles molécules ciblant l'endothélium vasculaire pourraient améliorer le pronostic et la qualité de vie chez les patients présentant une insuffisance rénale diabétique à un stade précoce. Nous avons précédemment montré que Alk1, avec son ligand BMP9, joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité vasculaire chez les animaux diabétiques. En effet, la perte de signalisation

Alk1 chez les animaux diabétiques conduit à la dissociation des jonctions vasculaires et à une augmentation des fuites vasculaires. Compte tenu de son rôle dans le maintien de la quiescence et de l'intégrité de l'endothélium, nous avons évalué les effets de la suppression d'Alk1 sur l'intégrité de l'endothélium glomérulaire et la fonction rénale chez la souris diabétique.

Nous avons utilisé des souris avec délétion conditionnelle de Alk1 dans l'endothélium (Alk1 Δ EC) pour évaluer le rôle de Alk1 dans la filtration glomérulaire chez des souris diabétiques induits par le STZ. Les souris ont été euthanasiées quatre mois après le début du diabète et des analyses sérologiques, électrolytiques et urinaires ont été effectuées, ainsi que des études immunohistochimiques. Nous avons démontré que l'haplo-insuffisance d'Alk1 aggrave la microalbuminurie et induit une perte de podocytes chez des souris diabétiques. De plus, une augmentation significative de l'apoptose glomérulaire a été observée chez les souris Alk1 Δ EC hétérozygotes diabétiques. L'analyse de souris Alk1 Δ EC homozygotes non diabétiques a également révélé une augmentation importante d'apoptose surtout au niveau glomérulaire.

Ensemble, ces données suggèrent que la signalisation du récepteur Alk1 joue un rôle essentiel dans le maintien des cellules endothéliales glomérulaires et participe au maintien de l'intégrité glomérulaire à travers un mécanisme de podocyte-endothelial cross-talk.

7.1 Mécanismes physiopathologiques : microalbuminurie dans les souris Alk1 Δ EC hétérozygotes

Il a été suggéré que Alk1 joue un rôle important dans la régulation du dépôt de matrice extracellulaire, y compris le collagène de type I et la fibronectine. Alors qu'il a une fonction probablement antifibrotique / protectrice via l'activation de Smad 1/5/8 dans les fibroblastes rénaux¹⁷⁹.

Il faut mentionner que plusieurs gènes de la famille TGF- β ont été impliqués dans l'hypertrophie des cellules rénales et l'accumulation de matrice extracellulaire chez les patients diabétiques, ceci est dû à une activation de la voie TGF- β /Smad2/3. Dans notre modèle de néphropathie diabétique l'inhibition de la voie de signalisation Alk1/Smad1/5/8 est l'un des mécanismes pour laquelle il y a une accumulation de matrice extracellulaire, notamment le collagène IV. Ceci est dû à ce que la perte partielle de l'expression de Alk1 augmentait l'expression de protéines de MEC

dans les fibroblastes en raison d'une altération de la signalisation du TGF- β via la phosphorylation de Smad2 et Smad3.

D'un autre côté, la perte de la signalisation Alk1 dans le diabète a été associée à une suractivation de la signalisation VEGFR2/Src ce qui augmente la perméabilité vasculaire. Cette hyperperméabilité vasculaire est due à la dégradation des jonctions d'ancrage comme les VE-cadhérines. Dans notre étude nous avons démontré une augmentation des niveaux de microalbuminurie dans les souris hétérozygote Alk1 qui était associée à une perte de protéines de jonctions particulièrement la néphrine et la podocine, cette perte est alors associée à une détachement podocytaire et une augmentation de la matrice extracellulaire ce qui aggrave la microalbuminurie.¹⁷⁹

En effet, dans l'endothélium vasculaire, il a été démontré que la signalisation Alk1 joue un rôle dans le recrutement et la fonction des cellules périvasculaires telles que les péricytes, ce qui se produit en partie par la régulation de facteurs tels que PDGF-B et Jagged1 par la signalisation Alk1, qui sont essentiels dans les interactions entre les cellules endothéliales et périvasculaires. Par conséquent, la perte hétérozygote de Alk1, associée à une hyperglycémie chronique et à des modifications de la composition de la membrane basale, pourrait entraîner la déstabilisation de la jonction endothéliale / podocyte, ce qui pourrait accentuer l'apoptose podocytaire et entraîner des défauts de filtration glomérulaire.²²³

7.1.1 L'hyperglycémie chronique diminue la signalisation d'Alk1

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer la diminution de la signalisation Alk1 en présence de d'une hyperglycémie chronique, notre groupe a récemment démontré que l'hyperglycémie modifiait la localisation et la signalisation des récepteurs endothéliaux, notamment le VEGFR2. Nous avons évalué les conséquences des concentrations élevées de glucose sur la localisation et l'internalisation de la surface des cellules Alk1 après la stimulation de la BMP9 utilisant des HUVEC (Human umbilical vein cells/HUVEC) (**Article 2- Chapitre 8**)

L'analyse par cytométrie en flux de cellules HUVEC non perméabilisées a montré une réduction significative de l'expression de la surface cellulaire de Alk1 en présence de D-glucose à 11 et 25 mM. Le traitement des cellules HUVEC avec BMP9 a entraîné une diminution de la localisation de Alk1 à la surface des cellules après 30 minutes à 5 mM de glucose, ce qui est compatible avec

l'internalisation des récepteurs. Cependant, l'internalisation de Alk1 après la stimulation par la BMP9 était significativement altérée dans les cellules HUVEC cultivées en présence de glucose à 11 ou 25. Ensemble, ces données suggèrent que des taux de glucose élevés réduisent l'expression de la surface des cellules Alk1, tout en empêchant l'internalisation des récepteurs après une stimulation par un ligand, ce qui pourrait expliquer la diminution de la phosphorylation de Smad1,5,9 induite par BMP9 observée dans les CE hyperglycémiques. **(Article 2- Chapitre 8).**

7.1.2 Perte partielle d'alk1 et l'apoptose glomérulaire

Comme il a été démontré que la signalisation médiée par BMPRII protégeait les cellules endothéliales des artères pulmonaires de l'apoptose. Le groupe de Dr. Nassim a utilisé les siRNA contre BMPRII ou ALK1 afin de déterminer leur effet sur l'apoptose des cellules endothéliales en mesurant les activités de la caspase 3/7. Leur recherche a permis de conclure que l'inhibition de BMPRII ou ALK1 a augmenté les activités de la caspase 3/7, indiquant les rôles pro-survie de la signalisation de BMP dans les cellules endothéliales des artères pulmonaires.¹⁷¹

De plus, comme on avait déjà mentionné Alk1 est fortement impliqué dans l'organisation, prolifération et survie de l'endothélium, raison pour laquelle sa délétion partielle, peut porter une augmentation au niveau de l'activité de caspase 3/7, altérant la fonction normale de l'endothélium et par un mécanisme de cross-talk, le reste des composants de la membrane de filtration glomérulaire dont les podocytes.

7.2 On est déjà prêt pour l'utilisation préclinique ou clinique de molécules ciblant le dysfonctionnement endothélial dans la ND ?

Bien que la dysfonction endothéliale (DE) soit la caractéristique qui précède le début de l'albuminurie dans la ND et que celle-ci soit hautement impliquée dans la progression de cette maladie vers l'hémodialyse, il est vrai aussi que le dommage endothélial est également présent dans les pathologies cardio-rénales.

À la lumière de ces réflexions, il est impératif de chercher des molécules pour réparer le dommage endothélial afin d'éviter l'évolution de ces maladies. Cependant, cette affirmation devient complexe si on prend en considération les différents aspects qui pourraient limiter la considération clinique de cette approche.

À cet égard la question plus importante à se poser est donc : comment arrivons-nous à mesurer avec précision la DE, étant donné qu'il existe plusieurs molécules, voies de signalisation et des effets paracrines et autocrines associées au DE ? La DE suppose aussi une réponse de la part des facteurs externes qui interagissent entre eux afin d'améliorer la fonction endothéliale perdue, tels que le NO, l'endothéline, le facteur de Von Willebrand et la thrombomoduline soluble, qui sont fortement impliqués dans le maintien physiologique de l'endothélium. Tout cela peut clairement compliquer les mesures quantitatives de la dysfonction endothéliale et limiter les essais précliniques d'une molécule ciblant la DE.

Présentement, il existe des méthodes pour évaluer la DE chez l'homme. Ces méthodes sont raisonnables, mais pas tout à fait fiables, étant donné qu'il y a divers mécanismes impliqués de façon directe ou indirecte dans la pathogenèse du dommage endothélial. Subséquemment, l'interdépendance entre ces effets et ces réponses compensatoires est claire.

Grâce à nos travaux de recherche, nous avons démontré que la voie de signalisation Alk1/BMP9 joue en rôle critique dans le maintien de la fonction endothéliale, puisque l'haploinsuffisance d'alk1 entraîne une augmentation de la microalbuminurie et une perte de cellules podocytaires associée à l'apoptose. (**Article 1- Chapitre 6**). Il donc impératif de mentionner que des tests supplémentaires pour mieux étudier la DE pourront être faits afin d'établir l'interaction d'alk1/bmp9 en relation avec ces effets compensatoires.

7.3 La mesure de marqueurs de la DE dans la néphropathie est-elle valable ?

C'est une question que demeure à être évaluée. De nombreuses études transversales ont montré que l'albuminurie dans la ND est liée à une DE.

Cette DE dérive dans la plupart de cas d'une diminution de la production de ON. Alors que la mesure de l'ON comme marqueur de DE dans la néphropathie diabétique peut être utile, l'utilisation de ce test n'est pas aussi simple qu'on le souhaiterait. Premièrement, parce que les niveaux d'ON sont influencés par d'autres vasodilatateurs endothéliaux, tels que la prostacycline et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium. Ensuite, parce que la mesure quantitative de l'ON en soit ne garantit pas un diagnostic fiable de la normalité ou

anormalité de l'endothélium étant donné les molécules externes qui peuvent influencer sa synthèse.

7.4 La dysfonction endothéliale seule provoque-t-elle la microalbuminurie ?

La microalbuminurie dans le diabète de type 1 et 2 est habituellement accompagnée d'un dysfonctionnement endothélial généralisé, mais pas dans tous les cas. D'autres aspects peuvent aussi l'accompagner ou l'exacerber, notamment de l'augmentation de la ME ou la diminution du NO. D'un autre côté, l'association entre la microalbuminurie et la DE a été également observée chez les personnes non diabétiques : C'est le cas du syndrome néphrotique¹⁷⁹. Néanmoins, il faut noter que la DE précède le début de la microalbuminurie. Il est donc intéressant de postuler que la DE peut être un facteur crucial causant la microalbuminurie. Or, il faudra des études supplémentaires afin de mieux comprendre le rôle de la perte d'Alk1 dans la ND. Cela pourra nous aider à prédire la progression de la maladie rénale chronique associée au diabète.

Structurellement, on pense que les souris Alk1 Δ EC +/- diabétiques ont subi une augmentation de la pression glomérulaire entraînant le passage d'albumine vers l'urine. Cette augmentation de la pression glomérulaire est également accompagnée d'une augmentation de perméabilité vasculaire qui favorise la microalbuminurie. D'ailleurs, un autre facteur qui contribue à l'augmentation de la microalbuminurie chez ces souris est la diminution des niveaux de protéines importantes pour le maintien du diaphragme glomérulaire comme la néphrine et la podocine.

La diminution des protéines de jonction comme la néphrine et la podocine chez les souris Alk1 Δ EC +/- diabétiques altère les jonctions interendothéliales ce qui empêchent les podocytes de demeurer soudés. L'ensemble de ces observations, dont l'augmentation de la matrice extracellulaire, l'apoptose et la perte des podocytes associées à une microalbuminurie seraient les altérations principales causées par la perte partielle d'alk1 dans l'endothélium rénal.

Finalement, il faut mentionner que nous avons montré que la microalbuminurie été associée à l'une perte partielle d'Alk1 dans un stade d'hyperglycémie chronique, puisque les souris Alk1 Δ EC -/- ne démontrent pas de changements dans le nombre de podocytes ou dans le niveau d'albumine urinaire. En revanche, les souris avaient Alk1 Δ EC -/- un taux de mortalité élevé (5 à 7 jours) ce qui a limité la validation de l'impact de la perte totale d'alk1 sur la fonction rénale à court terme.

7.5 Microalbuminurie et DFG normal sont-ils possibles ?

Bien que la majorité des études montrent qu'il y a une relation importante entre la diminution du DGF et la micro ou macro-albuminurie, selon la classification du comité de néphropathie diabétique, les stades précoces de la ND peuvent ou non être associés à un déclin du débit de filtration glomérulaire.

Même si on a utilisé cette classification pour notre modèle, il faut rappeler que présentement il y n'a pas de classification de la ND pour les modèles murins. La Société canadienne du diabète de son côté, confirme ce concept sur ses guides cliniques du diabète, affirmant également que le stade 1 de la ND peut ou non être associé aux changements de DFG. Par contre, ces deux circonstances sont associées à des dommages rénaux (augmentation de la ME, pour exemple). Ici, nous avons exposé un modèle de ND de stade 2. Ce modèle démontre une microalbuminurie accrue chez les souris Alk1 Δ EC +/- diabétiques avec un DFG normal. Le DFG normal aux stades précoces de DN avec une microalbuminurie.

Ainsi, ce modèle de ND pourra aussi nous aider à mieux prédire la progression de la maladie rénale chronique et ses complications CV à long terme. Il faut noter que de façon surprenante, les souris diabétiques ayant une perte partielle d'alk1 n'ont pas expérimenté des changements dans la taille des glomérules. Ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les souris n'ont été euthanasiées que 2 mois après le début du diabète. Il se peut alors que dans des stades plus chroniques de la ND, les changements au niveau de la taille glomérulaire pourront être mieux appréciés.

7.6 Début du dysfonctionnement endothélial dans la ND

Le moment exact où la DE a lieu au cours d'une néphropathie diabétique demeure encore à être établi. Dans nos observations, les souris ont développé un stade précoce de ND (Stade 2) 8 semaines après le début de diabète de type I. La perte de podocytes associée au dommage endothélial pourra nous donner un concept clair que ce phénotype de dommage endothélial prend place tout au début de la ND, facilitant son évolution progressive vers l'insuffisance rénale chronique. D'autres facteurs de risques comme la résistance à l'insuline ou l'hypertension sont aussi à tenir en compte pour l'avenir de ce projet.

7.7 Potentiel thérapeutique de la voie ALK1/BMP9

La suractivation BMP9/Alk1/Smad1,5,9 pourrait potentiellement prévenir la dysfonction endothéliale en présence d'une l'hyperglycémie chronique. Rétablir la voie de signalisation Alk1/bmp9 pourra avoir un impact positif sur l'endothélium, stabilisant les jonctions glomérulaires et évitant la perte de cellules podocytaires. Ceci pourra aussi améliorer la perfusion dans les tissus affectés par l'hypoxie, et prévenir la progression de la microangiopathie diabétique vers la maladie rénale chronique.¹⁵⁶Ainsi, la surexpression de la BMP9 afin de sur activer son récepteur (Alk1) pourra prévenir l'hyperperméabilité vasculaire et l'albuminurie tout en ayant un effet positif dans le mécanisme de podocyte-EC cross-talk.

Par contre, il faut signaler que la signalisation d'Alk1 semble avoir des effets opposés sur plusieurs études. Il est donc impératif de réaliser des observations supplémentaires afin de mieux comprendre rôle de cette voie de signalisation en relation avec les voies de signalisation de VEGF et VEGF /VEGFR2 et dans la production de molécules largement engagées dans le contrôle de la pression glomérulaire (NO par exemple).

Nous pourrons aussi caractériser les effets fonctionnels des récepteurs de type II aux BMP en présence du BMP9/BMP10 chez les CE afin d'évaluer le rôle de ces récepteurs dans la fonction de l'endothélium glomérulaire. Ceci pourra nous permettre de mieux comprendre certains des mécanismes impliqués dans la morphogenèse des vaisseaux glomérulaires et les voies de signalisation activées ou inactivées lors de l'hyperglycémie chronique.

7.7.1 Alk1 pour traiter le cancer. Quoi dire de son utilisation dans la ND ?

Des anti-alk1 sont déjà en essais cliniques pour le traitement du cancer. Le blocage complet d'alk1 permet d'inactiver toutes les voies non canoniques des SMADs qui participent à l'organisation des cellules endothéliales. Le groupe du Dr Meeteren a aussi démontré que les anticorps anti-hALK1 inhibaient la germination des cellules. Pourtant, ceci n'interférait pas directement avec la signalisation du facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF). Il est cependant indispensable d'insister que ces résultats n'ont pas été obtenus dans des conditions d'hyperglycémie chronique comme dans notre cas. Cela pourrait expliquer pourquoi dans notre modèle la voie de signalisation VEGF/VEGFR2 est inhibée lors de l'hyperglycémie. De telle sorte, il est impossible de dire que les anti-Alk1 utilisés en clinique pour traiter le cancer pourraient avoir un comportement semblable dans un milieu hyperglycémique et plus particulièrement sur l'endothélium glomérulaire, qui est un endothélium fenêtré.

7.7.2 Thérapie avec Anti-bmp9 dans le cancer

Comme on avait mentionner auparavant, taux élevés de BMP9 ont été observés chez les patients attentifs de cancer.¹⁷⁶ alors que des recherches menaient par Dr. Kienast en Allemagne ont permis de d'élucider que l'utilisation des l'anticorps anti-BMP9 BMP90093,¹⁷⁶ n'avaient pas aucun effet sur les cellules endothéliales in vivo. De plus, ils n'ont pas détecté aucune diminution significative de la densité microvasculaire (MVD) et des investigations ultérieures ont révélé que l'architecture vascularisée n'était pas affectée par le traitement avec l'AcM BMP9-0093, sans effet sur la longueur et le diamètre des vaisseaux ni sur leur perfusion.¹⁷⁶ En compensation, la double neutralisation de BMP9 / BMP10 par ALK1-Fc ou ALK1-ciblage par un anticorps monoclonal a conduit à une inhibition de la croissance tumorale associée à une réduction du MVD dans plusieurs modèles de xénogreffes.¹⁷⁶ Nonobstant, il faut mentionner que ces études et même les essais cliniques en cours sont faits sur des patients ayant un diagnostic de cancer et pas en présence d'une hyperglycémie chronique. (Comme dans notre modèle) Alors qu'il a été que établis la hyperglycémie chronique module de façon importante la réponses des récepteurs et des ligands ou niveau de l'endothélium. Alors que l'inactivation de la voie de signalisation Alk1/BMP9 peut mener à une hyperperméabilité vasculaire, augmentation de synthèse de matrix extracellulaire, accompagner par une diminution de nombre de podocyte. Donc à la lumière de

ces résultats, il faut dire qu'utiliser des anti-bmp9 comme cible thérapeutique dans la ND peut être fatale pour la survie podocytaire et la protection de la DFG à long terme.

7.7.3 Perspectives : Alk1/BMP9 : potentiel cible thérapeutique dans la ND

Un mauvais pronostic chez les patients diabétiques est associé à un abaissement du DFG, une diminution de nombre de podocytes ou même une augmentation de l'albuminurie.

L'utilisation des homologues de BMP9 ou des peptides ayant la capacité d'activer le récepteur Alk1 via BMP9 pourrait procurer des avantages thérapeutiques, dû à l'expression préférentielle d'Alk1 dans l'endothélium vasculaire. Ces thérapies basées sur l'activation d'Alk1 pourraient présenter des avantages par rapport aux anti-VEGF présentement utilisés en clinique.

Un des principaux avantages est lié à la spécificité d'expression d'Alk1, qui est spécifiquement endothéliale, alors que le VEGFR2 (médiateur de l'activation du VEGF) se trouve aussi dans plusieurs autres types de cellules, tels que les neurones ou les cellules musculaires lisses. Un autre avantage est que cette voie de signalisation Alk1/BMP9 c'est qu'elle peut potentiellement inhibée l'hyperglycémie évitant les effets adverses liés au traitement avec le VEGF dans la ND (par exemple, la thrombose rénale).¹⁹¹ Puisque la BMP9 a été aussi impliquer dans la régulation de l'hémostase du glucose.^{226,227}

Une nouvelle recherche pourra évoluer vers l'utilisation de thérapies en utilisant des peptides de BMP9 afin de mieux stabiliser l'endothélium en suractivant la voie de signalisation Alk1/BMP9, ce qui pourra prévenir les dysfonctions glomérulaires et prévenir le déclin de DGF à long terme.²²⁸

7.8 Conclusion du projet

En résumé, nous montrons ici que l'hyperglycémie chronique induit des modifications pathologiques dans les cellules endothéliales des glomérules, associées à une diminution de l'expression glomérulaire d'Alk1. Cela affecte l'intégrité de l'endothélium entraînant une perte des podocytes, une altération du diaphragme glomérulaire associée à une microalbuminurie accrue présente chez les souris Alk1 Δ EC +/- diabétiques. L'ensemble de ces dommages contribuent aux fuites vasculaires aggravant la microalbuminurie.

Ces lésions ont un impact sur le podocyte-EC cross-talk, ce qui conduit à une augmentation de la synthèse de la matrice extracellulaire dans la membrane glomérulaire basale afin de compenser les dommages causés par la perte d'alk1 au cours de la néphropathie.

Pour conclure, il faut mentionner que ces données suggèrent que la signalisation Alk1 joue un rôle crucial dans le maintien de l'intégrité vasculaire glomérulaire, la progression de la ND et la stabilité du diaphragme glomérulaire.

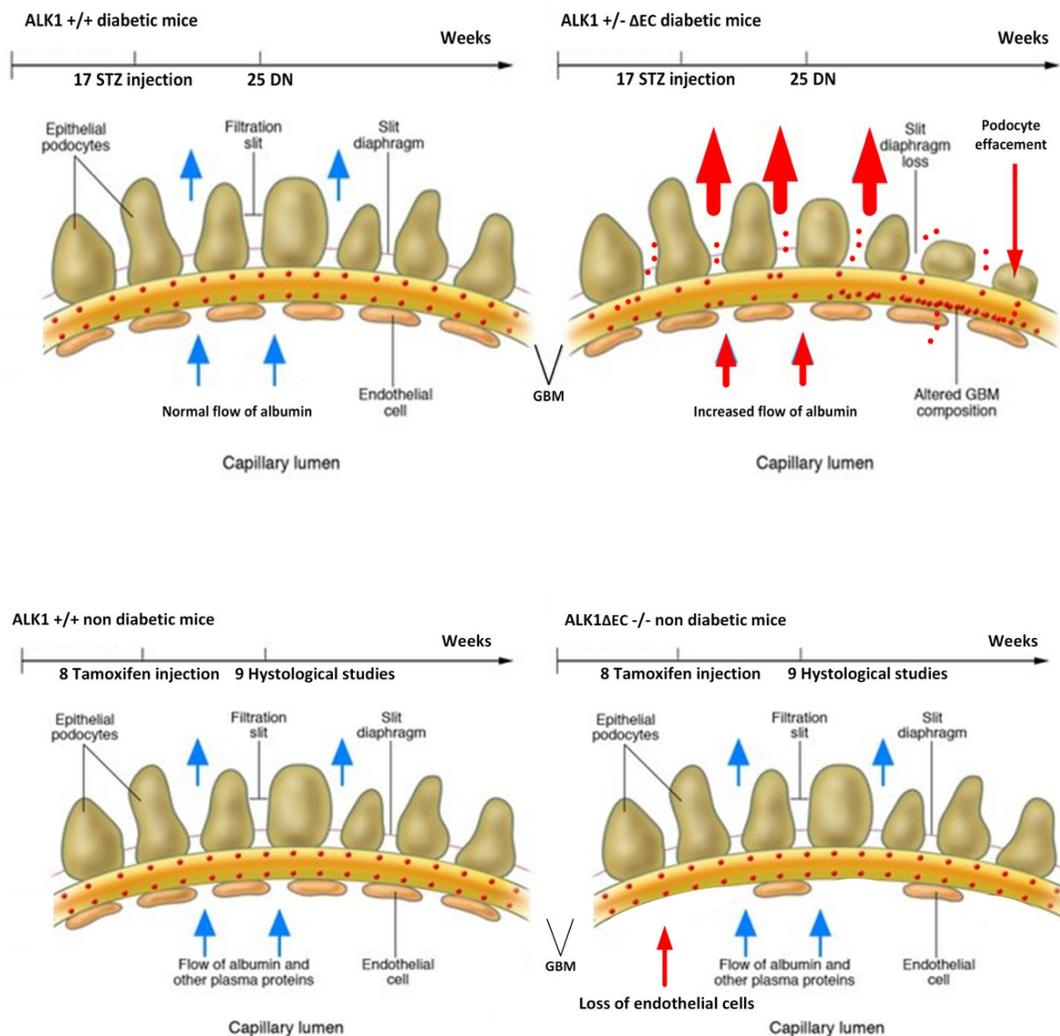


Figure 7.1 résumée graphique du projet : Évaluation du rôle du récepteur Activin receptor like kinase type 1 dans un modèle de néphropathie diabétique. (Figure adaptée de : The glomerular basement membrane : not gone, just forgotten²²⁹)

Chapitre 8 – 2eme Article scientifique (3e auteur)

2e Article scientifique (3e auteur)

BMP9 (Bone Morphogenetic Protein-9)/Alk1 (Activin-Like Kinase Receptor Type I) Signaling Prevents Hyperglycemia-Induced Vascular Permeability

Naoufal Akla^{1,4}, Claire Viillard^{5,4}, Popovic Nataljia^{3,4}, Cindy Lora Gil^{3,4}, Przemyslaw Mike Sapieha^{1,2,4} and Bruno Larrivé^{2,3,4,5*}

¹Department of Biochemistry and Molecular Medecine, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

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

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

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

⁵Departments of Molecular biology, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

*Corresponding author: Bruno Larrivé, Maisonneuve-Rosemont Hospital, 5415 boul. L'Assomption, Montréal, QC, Canada H1T 2M4.

8.1 Abstract

Objectives: Diabetic macular edema (DME) is a major cause of visual impairment in diabetic retinopathy. It is caused by blood-retinal barrier breakdown that leads to vascular hyperpermeability. Current therapeutic approaches consist of retinal photocoagulation or targeting Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) to limit vascular leakage. However, long-term intravitreal use of anti-VEGFs are associated with potential safety issue, and the identification of alternative regulators of vascular permeability may provide safer therapeutic options. The vascular specific Bone Morphogenetic Protein (BMP) receptor Activin-like kinase receptor type I (ALK1) and its circulating ligand BMP9 have been shown to be potent vascular quiescence factors, but their role in the context of microvascular permeability associated with hyperglycemia has not been evaluated.

Approach and results: We investigated Alk1 signaling in hyperglycemic endothelial cells and assessed whether BMP9/Alk1 signaling could modulate vascular permeability. We show that high glucose concentrations impair Alk1 signaling, both in cultured endothelial cells and in a Streptozotocin (STZ) model of mouse diabetes. We observed that Alk1 signaling participates in the maintenance of vascular barrier function, as Alk1 haploinsufficiency worsens the vascular leakage observed in diabetic mice. Conversely, sustained delivery of BMP9 by adenoviral vectors significantly decreased the loss of retinal barrier function in diabetic mice. Mechanistically, we demonstrate that Alk1 signaling prevents VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin and induces the expression of Occludin, thus strengthening vascular barrier functions.

Conclusions: From these data, we suggest that by preventing retinal vascular permeability, BMP9 could serve as a novel therapeutic agent for DME.

8.2 Introduction

Diabetic patients frequently suffer from ischemic vascular disease or wound healing defects. It has been established that chronic hyperglycemia associated with diabetes causes endothelial cell dysfunction, glycosylation of extracellular matrix proteins, as well as vascular denervation.²³⁰

These adverse effects ultimately impair vascular function and significantly increase the risks of complications such as renal failure, amputations, strokes, cardiopathies and blindness.²³¹ A frequent microvascular complication induced by diabetes is retinopathy, of which diabetic macular edema (DME) is a major consequence²³², and is the leading cause of blindness in the diabetic population.²³³ It has been reported that 27% of type 1 diabetic patients go on to develop macular edema within 9 years after the onset of diabetes, while in type 2 diabetic patients, the prevalence ranges from 3% within 5 years of diagnosis to 28% after 20 years²³⁴.

DME is a complex disease of multifactorial origin and is the consequence of destabilization of the blood-retinal barrier (BRB)²³⁵. BRB breakdown is typically caused by pericyte and endothelial cell loss and changes in vascular tight junctions, leading to vascular hyperpermeability (Romero-Aroca, 2011; Shin, Sorenson, & Sheibani, 2014)^{236,234}. The disruption of the BRB leads to the accumulation of fluid into the retina, resulting in tissue damage and, eventually, to vision loss. The pathogenesis of DME is thought to occur as a consequence of chronic hyperglycemia, along with the accumulation of free radicals, AGE proteins, and the subsequent induction of VEGF²³⁸, leading to increased vascular permeability^{5,8}. Mechanistically, increased vascular permeability occurs as a consequence of disrupted cell-cell junctions in the endothelium and loss of junctional proteins such as occludin^{239,240,241,242}. Furthermore, increased VEGF signaling can promote the activation of Src through the phosphorylation of VEGFR2, which leads to the phosphorylation and internalization of VE-cadherin and the loss of vascular adherens junctions^{244,245}. Clinical trials and recent approval of anti-VEGFs for the treatment of diabetic retinopathy and DME have shown the benefits of VEGF inhibition for the prevention of vascular leakage and have demonstrated beneficial effects on visual acuity and retinal thickness;¹⁷. However, despite encouraging results, intravitreal injection of anti-VEGF agents may be associated with systemic adverse events and devastating ocular complications. Thus, there is a need to identify alternative signaling pathways to prevent vascular leakage in DME.

Among the causative factors involved in the progression of cardiovascular damage in diabetes is pericyte loss, increased capillary permeability, new vessel formation, endothelial cell death and capillary occlusion²⁴⁷. These features of the pathological diabetic endothelium are characteristic of immature, poorly-remodeled blood vessels. In this regard, the endothelial-specific receptor Alk1 has been shown to be a critical inducer of blood vessel remodeling and maturation during vascular development^{174,248,249}. Alk1 is a TGF-beta/Bone Morphogenetic Protein receptor expressed in endothelial cells¹⁴⁵. Following ligand binding, the activated receptor propagates the signal by phosphorylating members of the Smad family of transcription factors.

Non-Smad signaling pathways have also been described for BMPs.^{251,252,152} Recently published studies suggest that BMP9, which is produced by the liver and circulates in the bloodstream²⁵³, binds with high affinity to Alk1 in association with type II BMP receptors, including BMP receptor 2 (BMPR2) and Activin Receptor 2B (ActRIIB)^{254,255,256,158,257}. Mice lacking Alk1 die early during embryonic development (E11) due to a severe lack of vascular remodeling²⁴⁹. The vessels in these mice are characterized by enlarged lumen, inadequate pericyte coverage, increased proliferation which leads to blood vessel rupture and hemorrhages^{258,248,259,260}. In addition, we have previously shown that triggering Alk1 signaling in endothelial cells using its ligand BMP9 prevents VEGF-induced signaling and promotes mature, stable vessels.¹⁵² Hence, the phenotype associated with Alk1 deficiency is reminiscent of the vascular pathology observed in diabetic retinopathy. We therefore hypothesize that promoting Alk1 signaling in endothelial cells subjected to chronic hyperglycemic stress may prevent vascular damage and loss of junctional integrity leading to permeability.

Here, we examined the protective role of BMP9 on hyperglycemia-induced vascular permeability in STZ-treated diabetic mice and human endothelial cells. The effect of BMP9 in VEGF-independent and dependent microvascular permeability through key subcellular mechanisms and adherens and tight junction integrity in endothelial cells were evaluated. We demonstrated that BMP9/Alk1 signaling is impaired in endothelial cells exposed to hyperglycemic conditions, which can contribute to increased vascular permeability. Exogenous BMP9 was able to prevent vascular permeability in both endothelial cells subjected to hyperglycemia and STZ-treated diabetic mice.

Mechanistically, we showed that BMP9/Alk1 signaling induced the expression of occludin and prevented VEGF-induced VE-cadherin phosphorylation and stabilized adherens junctions.

8.3 Materials and methods

The authors declare that all supporting data are available within the article and its online supplementary files.

Cell culture

Human Umbilical Endothelial Cells (HUVECs) were obtained from PromoCell and Human Retinal Microvascular Endothelial Cells (HRMECs) were obtained from Cell Systems and cultured in endothelial growth medium ECGM-2 (Lonza) and kept at 37°C and 5% CO₂. For most experiments, cells were seeded in 6 well plates or 8 wells Millicell EZ Slide (Millipore) and grown to confluence before starvation overnight in EBM-2 minimal media (Lonza) supplemented with 0.5% FBS while exposed to D-glucose (5 mM, 11 mM or 25 mM) with or without BMP9 treatment for 18 hrs. As EBM-2 already contains 5 mM of D-Glucose, differential addition of glucose was added to media to obtain final concentrations.

Animals

C57BL/6J mice (Jackson Laboratories) were maintained in the animal research facility in Maisonneuve-Rosemont Hospital. All protocols were approved by the Animal Research Ethic committee of the research center. Tamoxifen-inducible *Cdh5-CreErt2* and *acvr1* floxed mice were kindly provided by Ralf Adams and S. Paul Oh respectively. *Cdh5-CreErt2* mice were crossed with *acvr1* floxed mice and gene deletion was induced by injection of 100 mg/kg tamoxifen dissolved in corn oil for five consecutive days to produce *Alk1 Δ EC* mice. *Cdh5-CreErt2* mice lacking the *Alk1* floxed allele injected with tamoxifen were used as control. To avoid variability, only males were used for all experiments, as they are more susceptible to STZ-induced diabetes²⁶¹

Antibodies and reagents

The following primary antibodies were used: ALK1; (human AF370; or mouse AF770; 0.4 μ g/mL), Eng (AF1320; 0.2 μ g/mL) were obtained from R&D Systems. pSmad1,5,9 (cs9511; 10 μ M), Smad1 (cs6944; 10 μ M), pVEGFR2-Y951 (cs4991; 10 μ M), VEGFR2 (cs55B11 or cs9698; 10 μ M), pSrc (cs6943; 10 μ M), Src (cs2108; 10 μ M), peNOS (cs9570; 10 μ M), p β -catenin/Ser 675 (cs4176; 10 μ M) and eNOS (cs32027; 10 μ M) were acquired from Cell Signaling Technology. Anti-BMPR2

(ab96826; 0.5 µg/mL), ActR2B (ab135635; 0.7 µg/mL), pVE-Cadherin (ab119785; 1 µg/mL), Desmin (ab32362; 1.5 µg/mL) were obtained from Abcam. Antibodies against Occludin (40-4700; WB-0,25 µg/mL; IHC-0,8 µg/mL; Thermo Scientific) and VE-Cadherin (sc9989; 0,2 µg/mL) were used for WB while anti-VE-Cadherin (sc6458; 1µg/mL) was used for immunohistochemistry (Santa Cruz). Anti-β-actin (sc47778; 0,1 µg/mL) and β-catenin (sc7963; 0,2 µg/mL) were acquired from Santa Cruz. Claudin-5 (352588; 0,5 µg/mL) was purchased from Invitrogen. Recombinant human proteins rhBMP9 and rhVEGF-165 were obtained from R&D systems. Validated pre-designed siRNA against *occludin* (AM16708; AMBION), *acvr1* (s102659972) or scrambled control (QIAGEN) were used for permeability and signaling assays.

Streptozotocin (STZ) induced diabetes

Six to eight-week old C57BL/6J, *Cdh5-Cre* or *Alk1ΔEC* male mice were individually marked, weighed and their baseline blood glucose levels determined prior to STZ injection. Mice received daily intraperitoneal (IP) injections of 45 mg/Kg body weight STZ (Sigma-S0130) dissolved in sterile sodium citrate dehydrate buffer, pH 4.5 for 5 consecutive days (modified from (K. K. Wu & Huan, 2008; Xu, Qaum, & Adamis, 2001)). For non-diabetic controls, mice received citrate buffer injections. Tail blood glucose was monitored (AlphaTrak 2) every week for up to 8 weeks after the final STZ injection. Mice were considered diabetic if their non-fasted blood glucose levels reached 17 mM (300 mg/dL)²⁶².

Adenovirally-delivered BMP9 system (Ad-BMP9)

Adenoviral constructs were produced and purified as previously described.¹⁵² Mice groups with stable hyperglycemia were randomly assigned to receive i.p. injections of 5 X 10⁸ pfu of Ad-BMP9 or empty vehicle adenovirus (CTL) once every 4 weeks.

Flow cytometry analysis of cell surface expression/receptor internalization

HUVECs cultured in the presence of 5, 11 or 25 mM D-glucose for 18 hours were stimulated with or without 5 ng/ml BMP9 for 30 minutes. Receptor internalization was halted by shifting the cells to ice followed by two washes in ice-cold PBS. Noninternalized ligand was stripped from the cell surface using freshly prepared, ice-cold acid stripping buffer (DMEM/0.2% BSA, pH 3.5 adjusted with HCl), followed by PBS washes. Cells were then incubated in the presence of Alk1 (AF370;

R&D systems; 1 µg/ml) or goat isotype control for 1 hour in FACS buffer (PBS/2% FBS). After washing the cells three times with ice-cold PBS, the cells were incubated in cold FACS buffer containing 1 µg/mL of anti goat Alexa488-conjugated secondary antibody for 1 h on ice. After washes, cells were analysed using a Fortessa (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo (TreeStar, Ashland, OR). The mean fluorescence intensity (MFI) of the cells for each data set was compared to negative control plates stained with an isotype antibody and the secondary antibody.

In vivo Miles assay for vessel permeability

Mice were injected intravenously with Evans Blue Dye (Sigma) (45µg/g of mice weight) and 2 hours later were perfused with 9 mL of PBS. Immediately after, eyes were enucleated and fixed in 4% paraformaldehyde and retinas were microsurgically removed and placed in formamide for 24 hrs at 65 °C for Evans Blue extraction. Retinas were then dried and weighed on cotton wool paper. Absorbance maximum at 620 nm was read with a spectrophotometer (TECAN 1000). A background minimum absorbance at 740 nm was subtracted. The concentration of dye in the extracts was calculated from a standard curve of Evans blue in formamide. Retinal vascular permeability was normalized taking into consideration circulating Evans Blue plasma concentration, retinal dry weight and time of Evans Blue circulation, and calculated using a previously described equation^{262,263}.

To evaluate the functional mechanism by which BMP9 affects vascular leakage, a modified Miles assay on skin was performed²⁶⁴. Briefly, shaved mice injected three days prior with adenoviral particles were injected intravenously with 150 µL of Evans Blue in PBS (10 mg/mL) for 30 min, followed by subcutaneous injections of 50 µL VEGF (1 ng/µL) or PBS (Lim et al., 2014). After 45 min, mice were sacrificed and equal dimension of skin regions sites were excised and placed in formamide for 48 hrs at 65 °C for Evans Blue extraction, followed by absorbance measurements with a microplate reader at 620 nm.

In vitro EC monolayer permeability assay

In vitro Evans Blue permeation assays were performed as previously described²⁶⁵. HUVECs were seeded (1,5 mL; 2 X 10⁵ Cells) on the upper chamber of a fibronectin-coated transwell insert (0.4 µm pore size; costar 6 Transwell permeable support (Corning)) and 3 mL of EGM2 media was

placed in the lower chamber. Cells were grown until full confluency was reached and were exposed to hyperglycemia or normoglycemia and treated with BMP9 as described above. After 18 hrs, Evans Blue bound to albumin (2 mg of Evans Blue/100 mL of EBM2 supplemented with 0.5% FBS-0.1% BSA) was added for 90 min in the upper chamber. The same media without Evans Blue was added to the lower chamber. To determine Evans Blue/Albumin extravasation across the EC layer, 1 mL samples were then removed from each side of chamber, vortexed and the Evans Blue concentration in the upper and lower chambers were measured at 620 nm for quantitative analysis, which was determined by calculating the Evans Blue ratio in the lower/upper chambers. In some experiments, HUVECs were transfected with control or *occludin* siRNA (2.5 pmol) 24 hours prior to seeding.

In vitro ECIS permeability assay

Endothelial barrier function analysis was achieved using electric cell-substrate impedance sensing system (ECIS Z θ , Applied Biophysics). HUVECs and HRMECs were seeded on Collagen-coated ECIS arrays each holding 8 wells with 10 electrodes per well (8W10E PET, Applied Biophysics). Electrodes were calibrated and baseline monitoring was measured for 1hr Before cell inoculation. Initial seeding density was $\sim 50,000$ cells/cm² for at least 24hrs at 37^oC in complete EC growth medium. The impedance of the cell culture was monitored with Multiple frequency/time (MFT) mode was for the real-time assessment of barrier function and cell monolayer confluency was estimated before rhBMP9 treatment (10 ng/mL) for 18h in minimal media containing 0,5% FBS. For the assessment of cell permeability after treatment, D-glucose was added for a final concentration of 11 mM and 25 mM and monitored in real time over 6 hrs. To assess the disruption of the EC barrier through paracellular pathway upon administration of D-glucose, a frequency of 4000 hz was assessed for further analysis.

Immunohistochemistry

HUVECS were grown on 8 wells Millicell EZ slides. After treatments, cells were permeabilized for 3-5 min with pre-extraction buffer (Triton 0,1%, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 200 mM sucrose, 10 mM Hepes in PBS) and fixed with ice cold Methanol for 5 min. In between washes, cells were incubated with primary antibodies in PBS-3% BSA O/N at 40C. Cells were then

incubated with secondary antibodies for 2 hours at room temperature in blocking medium. Slides were then mounted with fluoromount containing DAPI (Sigma) and visualized by confocal microscopy. Z-stacks were acquired and reconstructed into a 3D cell monolayer with Imaris software. For In vivo retinal IHC permeability visualization, lens was removed upon extraction and ocular globes were snap frozen in OCT molds using liquid nitrogen. Cross-sections of eyes were visualized after incubation with Alexa 488-labeled IsoB4 and Evans blue-albumin extravasation was visualized by confocal microscopy.²⁶²In some experiments

Statistical analysis

All statistics were carried out with the Graphpad Prism 5.01 software. In experiments evaluating differences between 2 experimental groups, significance was assessed using Student t-test. ANOVA was used to evaluate statistical significance between 3 or more groups. If the P value was < 0.05, Tukeys *post hoc* multiple comparison tests were performed to compare differences between pairs of means. For colocalization experiments, Pearson's correlation coefficient calculated using the COLOC toolkit was used²⁶⁶. All group data are shown as mean \pm SEM and a p value < 0.05 was considered statistically significant.

8.4 Results

Hyperglycemia inhibits BMP9/ALK1/Smad1,5,9 signaling in endothelial cells.

To investigate Alk1/BMP9 signaling in the vascular endothelium during hyperglycemic insult, we first exposed HUVECs for 18 hours to increasing concentrations of D-Glucose (i.e. 5, 11, 25 mM; **Figure 8.1.A**) or its non-metabolizable enantiomer, L-Glucose (**Figure S8.1.A**), followed by stimulation with 1 ng/ml BMP9 for up to 60 minutes. Immunoblotting showed that BMP9 induced rapid phosphorylation of Smad1,5,9 at 5mM D-Glucose, but this was inhibited when cells were exposed to 11 mM D-glucose (**Figure 8.1.A**). This inhibition was not observed in the presence of L-Glucose, which is not metabolized by mammalian cells (RUDNEY, 1940) (**Figure S8.2.1A**). A 2-hour pre-treatment with D-glucose was sufficient to inhibit BMP9/Alk1 signaling, but the greatest inhibition was observed after 18 hours (**Figure S8.1.B**). A dose response of BMP9 under different concentrations of glucose also revealed that hyperglycemia inhibited BMP9 signaling at concentrations of up to 1 ng/mL, while no significant inhibition of Alk1 signaling was observed at

higher concentrations of BMP9 (**Figure S8.1.C**). Considering that endothelial of micro- and macro-vascular origins can respond differently to hyperglycemia, we also evaluated the effects of high glucose concentrations in Human Microvascular Endothelial Cells (HRMECs). Similarly, to what we observed in HUVECs, a significant inhibition of BMP9/Smad1,5,9 signaling was observed in HRMECs at 11 mM D-glucose (**Figure S8.1.D**). These changes in BMP9/Smad1,5,9 signaling in hyperglycemic ECs were associated with significantly decreased levels of the Alk1 receptor after 18 hrs (**Figure 8.1.B**). A time course also revealed that Alk1 levels started to decrease after 6 hours exposition to 11 mM D-glucose and maintained low expression for up to 72 hours (**Figure S8.1.E**). While Alk1 protein levels were decreased, significant changes in the expression of endoglin or type II BMP receptors BMPR2 and ActRIIb were however not observed (**Figure 8.1.B**).

As hyperglycemia has recently been shown to alter the localization and signaling of endothelial receptors, including VEGFR2²⁶⁷ we evaluated the consequences of high glucose concentrations on Alk1 cell surface localization and internalization following BMP9 stimulation. Flow cytometry analysis of unpermeabilized HUVECs showed a significant reduction in cell surface expression of Alk1 in the presence of 11 and 25 mM D-glucose (**Figure 8.1C**). Treatment of HUVECs with BMP9 resulted in decreased cell surface localization of Alk1 after 30 min at 5mM glucose, consistent with receptor internalization (**Figure 8.1.D**). However, Alk1 internalization following BMP9 stimulation was significantly impaired in HUVECs cultured in the presence of 11 or 25 mM glucose (**Figure 8.1.D**). Using immunofluorescent staining, we also observed that Alk1 undergoes rapid internalization in HUVECs following BMP9 treatment in normoglycemic conditions, in line with our flow cytometry data and previously published results (**Figure S8.1.F**) (Kraehling et al., 2016). However, the intensity of Alk1 immunostaining, as well as the number of internalization vesicles following BMP9 stimulation were significantly reduced under hyperglycemic conditions (11mM) (**Figure S8.1.F**). Together, these data suggest that high glucose levels reduce Alk1 cell surface expression, while preventing receptor internalization following ligand stimulation, which may account for decreased BMP9-induced Smad1,5,9 phosphorylation observed in hyperglycemic ECs. We next evaluated whether we could detect changes in BMP9/Alk1/Smad1,5,9 signaling in the endothelium of hyperglycemic mice. Diabetes was induced in C57BL/6J mice using STZ, as previously described ^{262,268}. Mice with blood glucose consistently above 17mM were

considered diabetic¹⁴⁴. Eight weeks after the onset of hyperglycemia, analysis of circulating BMP9 levels by ELISA showed no significant differences between normoglycemic and diabetic groups (**Figure S8.1G**). By contrast, we observed a significant reduction in the levels of Alk1 in endothelial rich pulmonary tissue, which was associated with reduced Smad1,5,9 phosphorylation (**Figure 8.1E**). Immunofluorescent staining of retinas harvested from diabetic mice eight weeks after STZ injections also revealed a substantial decreased in Alk1 staining in retinal blood vessels (**Figure 8.1F**). Together, these data suggest that hyperglycemia impairs Alk1 expression and signaling in endothelial cells.

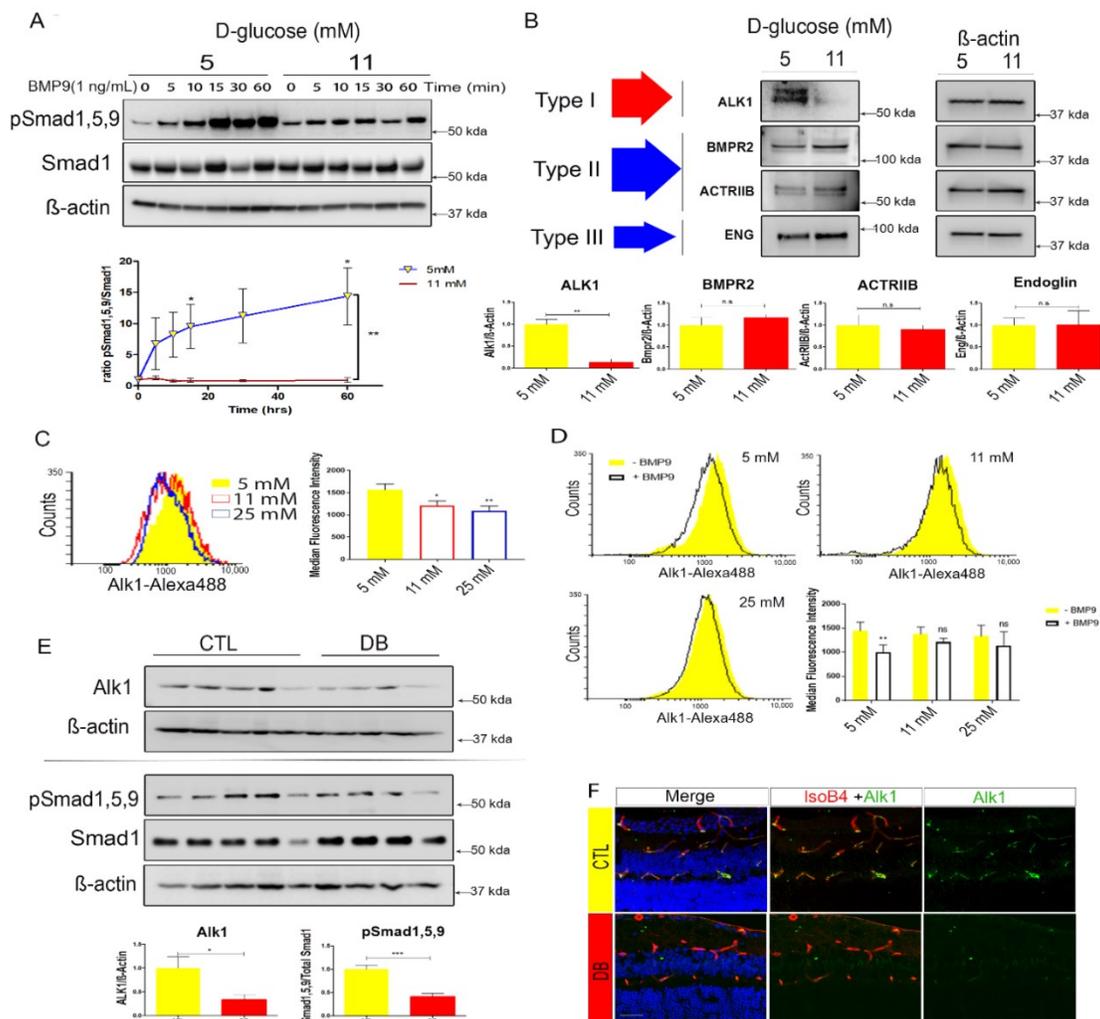


Figure 8.1. Hyperglycemia inhibits BMP9/Alk1/Smad1,5,9 signaling In vivo and In vitro in endothelial cells. **(A)** HUVECs were exposed to normoglycemia or hyperglycemia (5 and 11 mM D-glucose) for 18h before stimulation for up to 60 min with BMP9 followed by immunoblotting for pSmad1,5,9, Smad 1 or β-actin .

Representative blots are shown (upper panel) and bands were quantified by densitometry (lower panel). Total protein Smad1 and Internal β -actin reference antibody were used for normalizations and values are expressed as mean \pm SEM. Data represent the mean of three independent experiments. **(B)** HUVECs were exposed to 5 or 11mM D-glucose for 18 hours and processed for immunoblotting against ALK1, BMPR2, ActRIIb, Endoglin and β -actin. Representative blots are shown (upper panels) and bands were quantified by densitometry (lower panels). Internal β -actin reference antibody was used for normalizations and values are expressed as mean \pm SEM. Data represent the mean of four independent experiments. **(C)** Flow cytometry analysis of ALK1 cell surface expression. Data \pm SEM on graph represent the quantification of Mean Fluorescence Intensity (MFI) from four independent experiments. **(D)** Cell surface internalisation of ALK1 in HUVECs cultured in the presence of 5, 11 or 25 mM glucose with or without BMP9. Data \pm SEM on graphs represent the quantification of MFI from four independent experiments. **(E)** Six to eight weeks old C57/BL6 mice were injected i.p. with STZ. Eight weeks after onset of diabetes, pulmonary tissue was harvested and homogenates were analyzed with specific antibodies by immunoblotting. Blots were quantified by densitometry (lower panels). N=5 control mice, N=4 Diabetic mice. **(F)** Immunofluorescence on retinal cryosections revealed that Alk1 protein (green) show robust vascular expression in control retinas (upper panel) but is weakly expressed in blood vessels at 8 weeks after STZ injection (lower panel), as confirmed by colocalization with the vascular marker IsoB4. Representative images of three independent mice. Scale bar = 40 μ m. Differences between means were analyzed using unpaired t test. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

Alk1 haploinsufficiency exacerbates retinal vascular permeability in DB mice.

Alk1 plays an important role in the maintenance of vascular integrity and impaired BMP9/Alk1 signaling results in increased vascular permeability²⁶⁹. As our data show a significant reduction in BMP9/Alk1/Smad1,5,9 signaling in the hyperglycemic endothelium, we postulated that Alk1 signaling may prevent vascular permeability in the retina, and that its inhibition in diabetic conditions could exacerbate hyperglycemia-induced vascular leakage (**Figure 8.2.**). We first evaluated whether specific loss of endothelial Alk1 was implicated in retinal vascular permeability under physiological conditions using mice with conditional deletion of *acvr1* in the endothelium (Alk1 Δ EC). To detect vascular permeability, retinal Evans Blue-Albumin permeation was assessed as previously described^{262,263}. Deletion of endothelial Alk1 protein in Alk1 Δ EC mice following tamoxifen injections was confirmed by immunoblotting of lung tissue and immunofluorescent staining of retinas (**Figure S 8.2A,B**). While Evans blue permeability in non-diabetic Alk1 Δ EC heterozygoteous mice was not significantly different from control animals eight weeks after tamoxifen injections (**Figure 8.2A**), homozygous deletion of endothelial Alk1 in non-diabetic mice showed significantly higher retinal vascular albumin extravasation compared to control mice after

7 days (**Figure 8.2B**). Permeability experiments were performed after 7 days of deletion in Alk1 Δ EC homozygous mice, as opposed to 8 weeks in heterozygous animals, as Alk1 Δ EC homozygous mice display high lethality starting 10 days after tamoxifen injections. While homozygote Alk1 Δ EC mice display enhanced retinal vascular permeability, no morphological changes such as arteriovenous malformations or dilation of the retinal vasculature were observed in adult mice 7 days after tamoxifen injection (**Figure S8.2B**).

In light of our data suggesting that Alk1 levels are decreased in hyperglycemic mice, we evaluated whether Alk1 haploinsufficient mice would be more susceptible to hyperglycemia-induced vascular leakage. To address this, control and heterozygous Alk1 Δ EC mice were injected with STZ to induce diabetes and eight weeks after induction of diabetes, Evans blue permeation was evaluated in retinas (**Figure 8.2C**)^{262,263}. Histological assessment of the retinal vasculature revealed no significant difference in retinal capillaries between control and heterozygous Alk1 Δ EC diabetic mice (**Figure S8.2C**). However, as reported^{38,271,272,48,273} we observed an increase in Evans blue permeability in diabetic control mice compared to non-diabetic mice (**Figure 8.2D**). Furthermore, while we had previously observed that non-diabetic heterozygous Alk1 Δ EC mice did not show any differences in vascular permeability (**Figure 8.2A**), they displayed a significant increase in retinal vascular permeability compared to control mice in diabetic conditions (**Figure 8.2D**). These data suggest that Alk1 signaling contributes to the maintenance of vascular integrity, and that reduced Alk1 signaling can predispose to chronic hyperglycemia-induced vascular permeability.

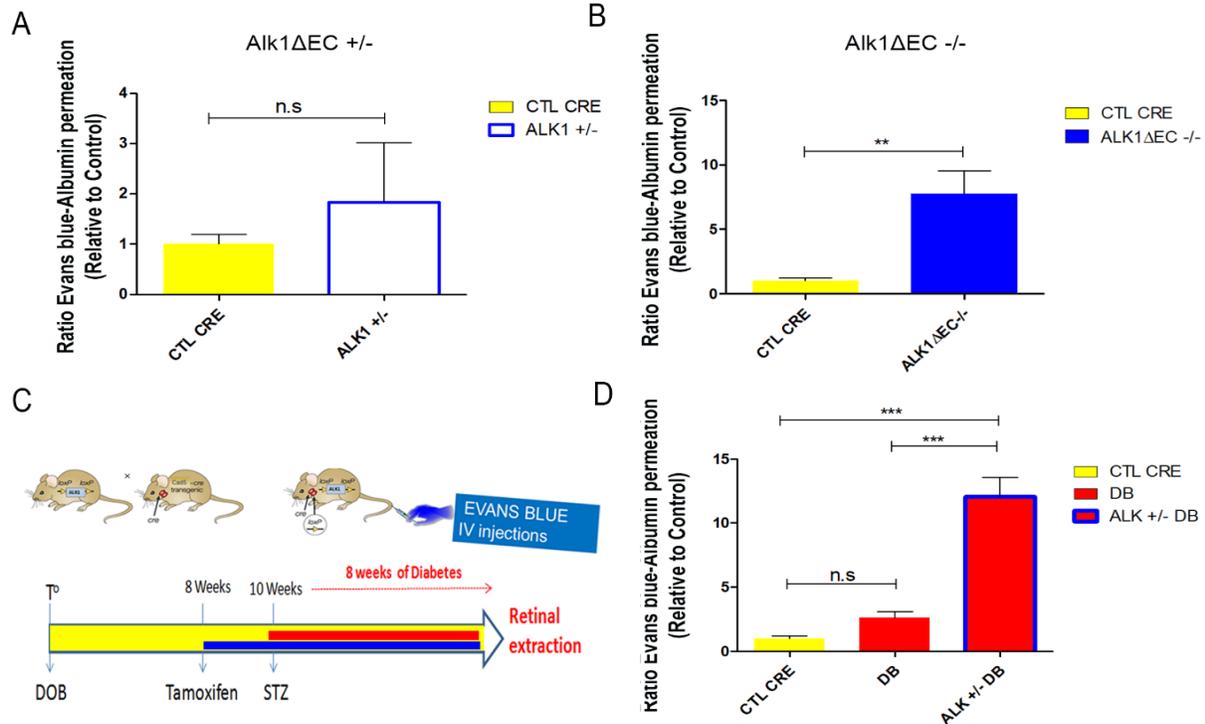


Figure 8.2. Endothelial-specific loss of Alk1 exacerbates retinal permeability. (A) Measurement of Evans blue leakage in heterozygous Alk1ΔEC (N=8 mice) vs CTL (N=7 mice) mice or (B) homozygous Alk1ΔEC normoglycemic mice (N=8 mice) vs CTL mice (N=6 mice). (C) Experimental time line for the generation of diabetic heterozygote Alk1ΔEC mice, in which CRE-Ert2 expression was placed under the control of the VE-Cadherin promoter (Cdh5-CRE). Male adult mice were injected with tamoxifen, followed two weeks later by STZ injections. Evans Blue permeability experiments were performed 8 weeks after STZ injections. (D) Measurement of Evans Blue leakage in control normoglycemic (N=8 mice), control diabetic (N=6 mice) and diabetic heterozygote Alk1ΔEC mice (N=8 mice) eight weeks after STZ injections. Cdh5-CRE tamoxifen-induced mice were used as control. Values expressed relative to control retinas \pm SEM are shown. Differences between means were analyzed using One-way ANOVA with Tukeys multiple comparison test (C) or an unpaired student t test (A and B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

BMP9 prevents vascular barrier permeability in DB retinas and hyperglycemic endothelial monolayer.

As loss of Alk1 signaling exacerbates hyperglycemia-induced vascular permeability, we evaluated whether activation of Alk1 signaling could prevent vascular permeability induced by hyperglycemia. As our data show that BMP9 signaling is impaired in hyperglycemic endothelial cells due to reduced Alk1 expression, we used higher concentrations of BMP9 (10 ng/ml) in order

to more readily activate Alk1 signaling (**Figure S8.1C**). HUVECs monolayers plated in transwells were treated with or without human recombinant BMP9 (rhBMP9) for 18 hrs in normoglycemic (5mM) and hyperglycemic (11mM and 25mM) conditions, and diffusion of Evans blue from the upper chamber to the lower chamber was measured after 90 minutes. Our results show that hyperglycemia induces a significant increase in endothelial permeability and that BMP9 pre-treatment prevented EB-albumin permeability across the EC monolayer under hyperglycemic conditions (25 mM) (**Figure 8.3A**). These data were also reproduced in retinal microvascular endothelial cells. HRMECs were subjected to high glucose and subjected to Evans blue permeability. Even though these ECs were less permeable than HUVECs when subjected to high glucose, BMP9 did reduce EB-albumin permeability at 25 mM glucose (**Figure S8.3A**).

Further evidence for the ability of BMP9 to preserve endothelial barrier function was obtained from real-time analysis of transendothelial electric resistance ²⁷³Treatment of an intact monolayer of HUVECs (**Figure 8.3B**) or HRMECs (**Figure S8.3B,C**) with 25 mM D-glucose reduced endothelial monolayer impedance and hence provoked a drop in barrier function in the first 6 hr following D-glucose treatment. However, both HUVECs and HRMECs pre-treated with BMP9 for 18 hours showed a markedly reduced drop in endothelial monolayer impedance (measured from an interval between 0 and 6 hr post glucose stimulation), confirming that BMP9 can help prevent hyperglycemia-induced permeability.

We then inquired whether overexpression of circulating BMP9 using adenoviral-gene delivery could prevent retinal vascular leakage in diabetic mice. STZ-treated mice received intraperitoneal injections of adenoviral-BMP9 (AdBMP9) for eight weeks, which resulted in consistently elevated levels of circulating BMP9 (~123 pg/mL after eight weeks; **Figure S8.3D**). No significant changes in mouse weight were observed throughout the length of the experiment (**Figure S8.3E**). Interestingly measurements of glycaemia after AdBMP9 injections showed a small but significant decrease in average blood glucose compared to baseline Ad-CTL levels (**Figure 8.3C**), which is consistent with a previous report showing that injections of recombinant BMP9 in mice reduces glycemia through the inhibition of gluconeogenesis ²⁷⁴. Sustained overexpression of BMP9 for eight weeks resulted in a significant decrease of vascular retinal Evans blue permeability in diabetic mice, compared to diabetic mice treated with control adenoviruses, with levels

comparable to non-diabetic baseline (**Figure 8.3D**). Visual appreciation of Evans blue permeability on retinal cross-sections showed Evans blue extravasation localization in the inner retinal blood barrier, which was not observed in BMP9-overexpressing diabetic mice (**Figure 8.3E**). It is noteworthy that no changes in perivascular cell coverage (SMA-positive smooth muscle cells or Desmin-positive pericytes) were observed in these retinas over the experimental time-frame (**Figure S8.3F,G**).

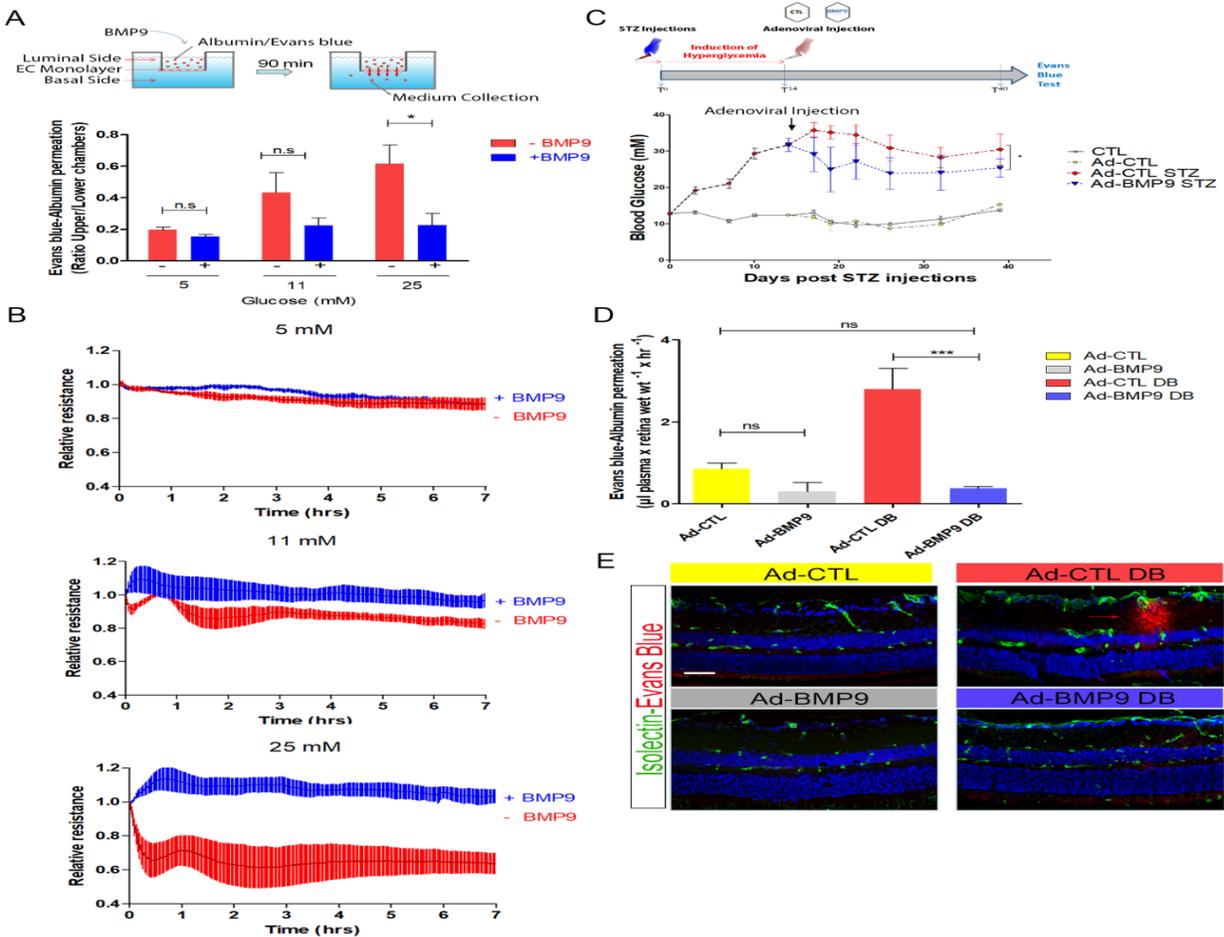


Figure 8.3. BMP9 prevents vascular permeability in the hyperglycemic endothelium. (A) HUVEC monolayers in transwell boyden chambers following 18 hrs exposition to hyperglycemia (11 and 25 mM) or normoglycemia (5 mM) with or w/o BMP9 (10 ng/mL) were tested for Evans-Blue bound Albumin permeability (deposited in the upper-chamber for 90 min) and quantification of the ratio lower/upper chambers was performed. Data were generated from 3 independent experiments. (B) Transendothelial resistance measured in real time in HUVECs by ECIS demonstrates that BMP9 prevents the reduction of endothelial barrier function triggered by hyperglycemia (11 and 25 mM D-glucose). Results represent the mean \pm SEM of 5 separate experiments. (C) In vivo

time line of retinal Miles assay; male C57/Bl6J mice were injected with STZ or vehicle buffer. Blood glucose levels were monitored twice per week. When peak average glycaemia was reached 2 weeks after STZ injection, Ad-control or Ad-BMP9 were injected intraperitoneally. CTL (N=7 mice), Ad-CTL (N=8 mice), Ad-CTL DB (N=8 mice), Ad-BMP9 DB (n=8 mice). (D) Miles assay was performed to quantify Evans blue-Albumin complex extravasation in mouse retinas eight weeks after adenoviral injections. Ad-CTL (N=7 mice), Ad-BMP9 (N=4 mice), Ad-CTL diabetic (DB) (N=8 mice), Ad-BMP9 diabetic (DB) (N=8 mice). Quantification was normalized using dry weight of retinas. Data are represented as mean \pm SEM. € Visualization of Evans Blue extravasation (red) by confocal microscopy on cross-sectional slices of retinas stained with IsoB4 (green) and DAPI (blue). Representative images of four mice. Scale bar = 40 μ m. Differences between means were analyzed using a t test (A) or One-way ANOVA with the tukeys multicomparison test (C and D). Values are expressed as Mean \pm SEM; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

BMP9 limits vascular permeability via inhibition of VEGF/VEGFR2 signaling.

VEGF signaling plays a pivotal role in vascular permeability leading to the development of DME^{275,276,277,278} Therefore, we investigated the underlying mechanisms behind BMP9-mediated inhibition of permeability and whether it can prevent vascular leakage through the modulation of VEGF-induced permeability. To address this, we first assessed whether BMP9 overexpression could suppress VEGF-induced permeability in a Miles assay. Mice were injected with Ad-BMP9 or Ad-CTL, and 72 hours later, after confirmation of BMP9 overexpression, we measured vascular permeability in response to VEGF by injecting recombinant VEGF subcutaneously and measuring Evans blue leakage. Our data demonstrate, as previously established, that VEGF significantly increases albumin-bound Evans blue permeability by \approx 2.5 fold relative to PBS injections^{279,280,281,282} (**Figure 8.4A,B**). However, BMP9-overexpressing mice displayed significantly decreased VEGF-induced EB-albumin permeability. We could show that the effect of BMP9 on VEGF-induced permeability was dependent on vascular Alk1 expression in this assay, as overexpression of Ad-BMP9 in Alk1 Δ EC homozygote mice did not prevent VEGF-induced permeability (**Figure 8.4A**).

VEGF loosens cell junctions by activating a molecular cascade which results in the phosphorylation and internalisation of VE-cadherin²⁸³ We therefore evaluated whether BMP9 affects the VEGF signaling cascade leading to the loss of adherens cell junctions. Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) is a key receptor in VEGF-mediated downstream signal transduction. Following VEGF stimulation, VEGFR2 is phosphorylated at position Tyr951 in the intracellular

domain, which leads to Src phosphorylation, resulting in the phosphorylation and internalization of VE-cadherin^{284,285}. To evaluate the effects of BMP9 and hyperglycemia on VEGF signaling, HUVECs were treated with D-glucose (5, 11 or 25mM) and/or BMP9 (10ng/ml) for 18 hours before VEGF stimulation. Protein extracts from stimulated cells were harvested and processed for immunoblotting. We found that regardless of glucose levels, VEGFR2 Tyr951 phosphorylation was inhibited when HUVEC were pretreated for 18 hours with rhBMP9 before VEGF stimulation (**Figure 8.4C**). Since Src activation plays an essential role in VEGF-mediated permeability^{279,286}, we investigated whether EC pre-treatment with BMP9 in the same conditions could prevent Src phosphorylation in normoglycemic and hyperglycemic conditions. Our data show that Src phosphorylation is increased in ECs exposed to VEGF and that BMP9 prevents Src phosphorylation in both hyperglycemic and normoglycemic conditions (**Figure 8.4C**). Downstream of Src phosphorylation, phosphorylation of VE-cadherin has been shown to regulate vascular permeability, as phosphorylation of VE-cadherin at Tyr685²⁸⁷ controls the opening of endothelial cell junctions^{288,289}. Hence, we analyzed whether BMP9 signal transduction alters the phosphorylation status of VE-cadherin in hyperglycemic conditions. Upon VEGF stimulation, phosphorylation of VE-cadherin was triggered. This increase in VEGF-dependent VE-cadherin phosphorylation was markedly increased at high glucose concentrations (25 mM). However, pre-stimulation of HUVECs with BMP9 abrogated VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin, both in normoglycemic and hyperglycemic conditions (**Figure 8.4C**). Interestingly, while high glucose concentrations did not alter levels of β -catenin, BMP9 stimulation resulted in higher levels of β -catenin. High levels of β -catenin in BMP9-stimulated cells may contribute to decreased VEGFR2 phosphorylation, as β -catenin has previously been demonstrated to inhibit VEGFR2 phosphorylation.²⁴⁴ Finally, VEGF-induced phosphorylation of eNOS and subsequent modulation of NO levels have also been shown to be mediators of vascular permeability in diabetes^{290 291} and are thought to be key factors in the occurrence and development of DME^{292,278}, decreasing the expression of cell junction proteins and leading to BRB breakdown. Our data show an increase in eNOS phosphorylation in ECs stimulated with 11 mM D-glucose upon VEGF stimulation, which was reduced by rhBMP9 pre-treatment (**Figure 8.4C**). Using HRMECs, we also observed that BMP9 prevented VEGF-induced phosphorylation of VEGFR2, Src, VE-cadherin and eNOS in both

normoglycemic and hyperglycemic microvascular endothelial cells (**Figure S8.4A**). Together, these data show that BMP9 can prevent key VEGF signaling events leading to the loss of endothelial adherens junctions. Conversely, we observed that Alk1 loss-of-function led to increased VEGF-induced phosphorylation of the same key pathways involved in vascular permeability. HUVECs transfected with *ACVRL1* siRNA displayed increased phosphorylation of VEGFR2 tyr951 following VEGF stimulation, which exacerbated downstream Src and VE-cadherin phosphorylation (**Figure 8.4D**). HRMECs transfected with *ACVRL1* siRNA also displayed exacerbated phosphorylation of VEGFR2, Src, VE-cadherin and eNOS (**Figure S8.4B**). These observations were also confirmed in vivo in lung tissue extracted from homozygous *Alk1* Δ EC mice (**Figure 8.4D**). Together, our data show that BMP9 could prevent vascular permeability in part by mitigating VEGF signaling in endothelial cells.

BMP9/Alk1 stabilizes occludin membrane localization in human ECs.

Chronic hyperglycemia leads to destabilization of adherens and tight junctions in the endothelium¹⁴. For example, reduced vascular expression of the tight junction protein occludin has been reported in diabetes¹⁴. Furthermore, it is proposed that VEGF signalling, through phosphorylation of Src, leads to the internalization of VE-cadherin and the subsequent disruption of adherens junctions²⁸³. We therefore assessed whether BMP9 could modulate the expression of *occludin* and *VE-cadherin* in ECs. Analysis by qPCR of HUVECs treated with BMP9 for 3 hours showed that BMP9 significantly induced the expression of *occludin*, but had no effect on *VE-cadherin* mRNA levels (**Figure 8.5A**). However, WB analysis revealed that VE-cadherin protein levels are reduced in HUVEC exposed to HG at 11 mM and 25 mM of D-Glucose but that BMP9 pre-treatment stabilizes *VE-cadherin* levels in hyperglycemic conditions (**Figure 8.4C; Figure 8.5B**), suggesting that high glucose lead to decreased VE-cadherin levels independently of gene transcription. We also evaluated the expression levels of claudin-5, an integral membrane protein and component of tight junctions, in response to hyperglycemia and BMP9 treatment but did not observe any significant changes (**Figure 8.4C**). However, we observed that the levels of the tight junction protein occludin, whose expression has been shown to correlate with an improved retinal vascular barrier function^{293,294(p8)}, were significantly increased by BMP9 in normoglycemic and hyperglycemic conditions (**Figure 8.5B**).

While BMP9 maintained high levels of occludin, its expression was decreased in HUVECs transduced with *acvr11* siRNA and in *Alk1* Δ EC mice (**Figure 8.5C**). Confocal 3D rendering and quantification of HUVEC's monolayers exposed to BMP9 and/or hyperglycemia show consistently that hyperglycemia reduces junctional co-localization of VE-cadherin and occludin at the junctional interface with a positive spearman correlation coefficient decreasing by almost half (11 mM; $r=0.11$ and 25 mM; $r=0.13$) relative to control (5 mM; $r=0.21$) (**Figure 8.5D**; unprocessed images shown in **Figure S285B**); (**Figure S8.5A**). Interestingly, BMP9 treatment preserved membrane co-localization of VE-cadherin and occludin in hyperglycemic conditions (11 mM; $r=0.21$ and 25 mM; $r=0.19$) (**Figure 2.5D**; **Figure S8.5A**). To evaluate the contribution of occludin to BMP9's anti-permeability properties, HUVECs were transfected with control or *occludin* siRNA (**Figure S8.5C**) and treated with BMP9 in normoglycemic or hyperglycemic conditions. As previously shown ²⁹⁵, we observed increased Evans blue leakage in the presence of elevated glucose concentrations (11mM), and an inhibition in the presence of rhBMP9 (**Figure 8.5E**). As expected, cells transfected with *occludin* siRNA displayed increased permeability compared to control cells. Furthermore, BMP9 did not significantly inhibit hyperglycemia-induced permeability in the absence of occludin (**Figure 8.5E**). Together, these data suggest that BMP9/*Alk1* signaling can participate in the maintenance of cellular junctions through its induction of occludin expression under hyperglycemic conditions.

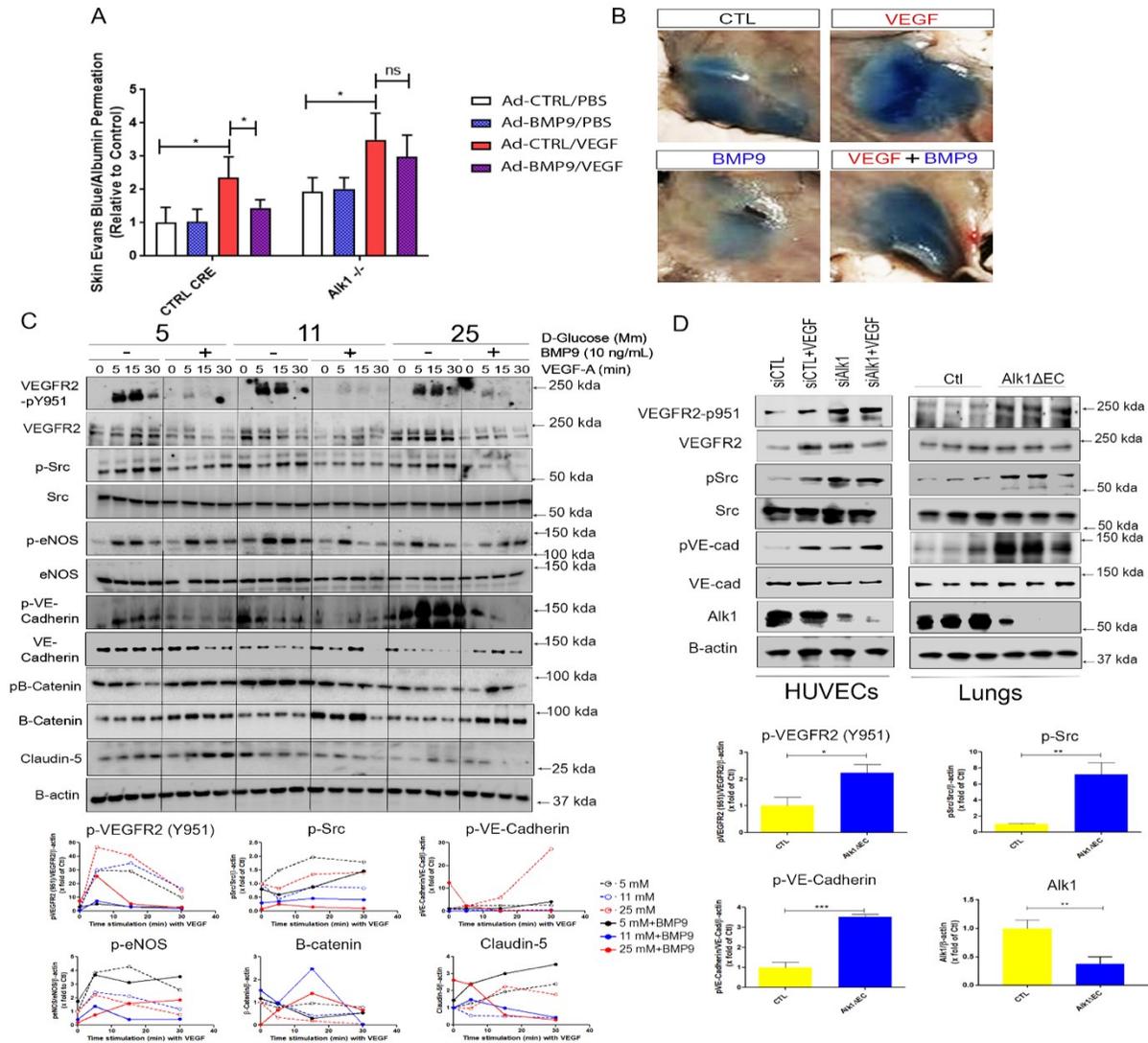


Figure 8.4. BMP9/ALK1 inhibits VEGF-induced permeability via inhibition of VEGF signalling in endothelial cells. (A,B) VEGF-induced vascular leakage (45 min) of serum albumin-bound Evans Blue in the back skin of control (Cdh5Cre) or homozygote Alk1 Δ EC mice (Alk1^{-/-}) mice adenovirally overexpressing BMP9 or empty vector (CTRL). (A) Spectrophotometric analysis of vascular leakiness by formamide-extracted Evans Blue dye content. Evans Blue dye quantification of mice skin injected with VEGF (50 ng) overexpressing BMP9 was significantly decreased compared with that of skin injected with VEGF alone in CTRL-CRE mice, but not in Alk1^{-/-} mice. The results are expressed number of folds relative to control and are presented by mean \pm SEM (N=7 mice/group (Control mice) or N=4 mice/group (Alk1^{-/-} mice)). (B) Representative images of Evans blue extravasation in dorsal skin of control mice. (C) Immunoblotting of HUVECs stimulated with VEGF following pre-treatment with D-glucose (5, 11, 25 mM) and or BMP9 with specific antibodies directed against VEGF pathway signaling or permeability proteins. Densitometry quantification of a representative experiment are shown (lower panels) (N=3 experiments). (D) HUVECs transfected

with control or ACVRL1 siRNA (25 pmol/well) (left panel) were stimulated with or w/o VEGF (20 ng/mL) (N= 3 experiments) and lung tissue extracted from homozygote *Alk1 Δ EC* mice (right panel) were processed for immunoblotting with antibodies of signaling molecules involved in vascular permeability. B-actin antibodies were used to control for total protein levels and/or with total protein normalization. Lower panels show quantification of immunoblots performed on lung tissues (N=3 mice/group). Data \pm SEM are shown and differences between means where analyzed using t test, * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001.

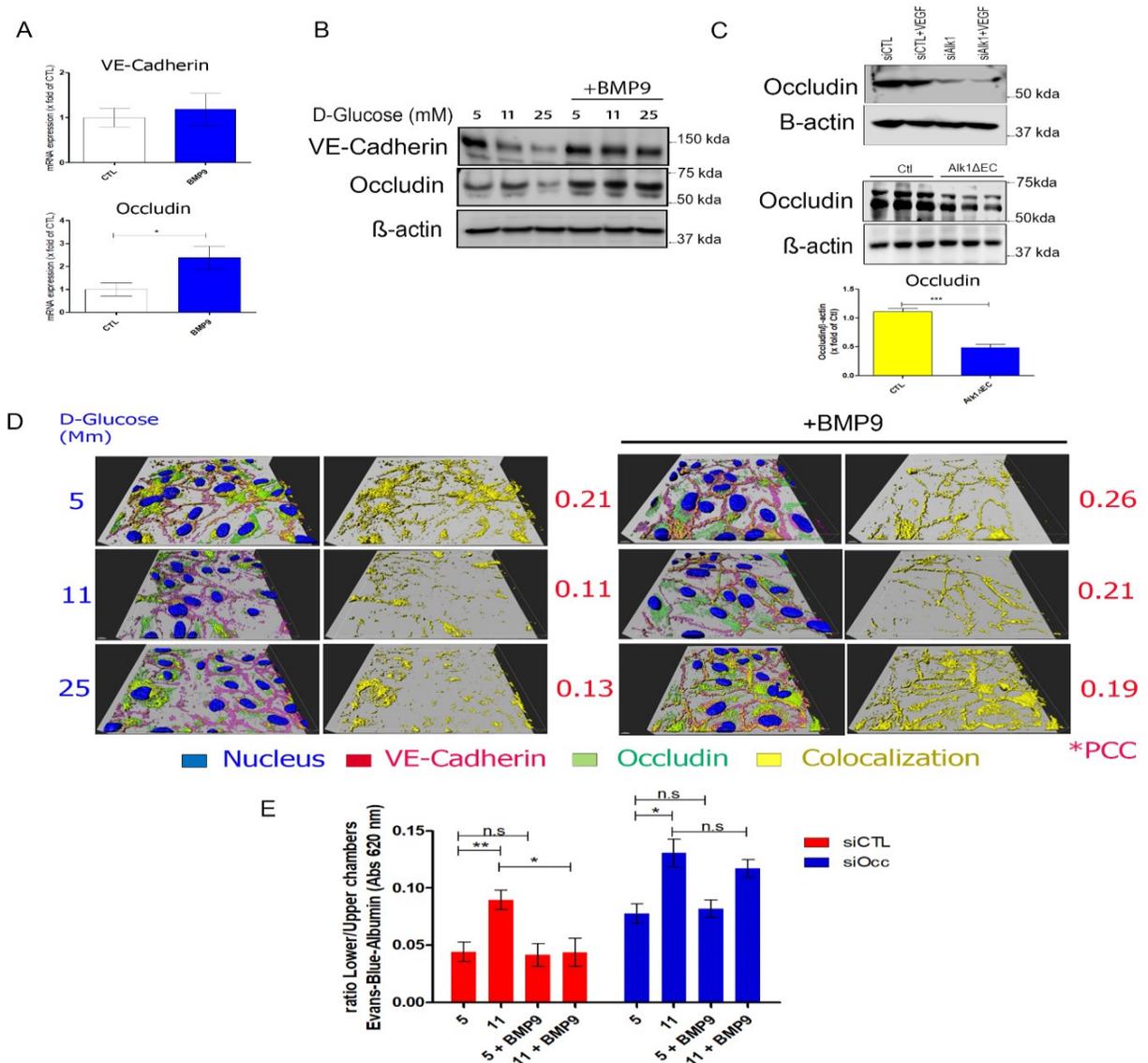


Figure 8.5. BMP9/ALK1 activation stabilizes levels and membrane colocalization of VE-cadherin and Occludin in hyperglycemic cultured Ecs. (A) qPCR analysis of HUVECs treated with 10ng/ml rhBMP9 for 3 hours. Occludin and VE-cadherin were quantified by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) (Average of 3 experiments). (B) HUVECs were treated for 18h in normoglycemia or hyperglycemia (5, 11,

25 mM of D-glucose) with or without BMP9 treatment, and Occludin and VE-Cadherin protein levels were quantified in cell lysates by immunoblotting. (C) Protein extracts from HUVEC transfected with nontargeting (CTL) siRNA or siRNA directed against ACVRL1, treated with or without VEGF (20 ng/mL) (upper 139cclu) or from mouse pulmonary tissues harvested from homozygote *Alk1 Δ EC* were analyzed by immunoblotting for 139ccluding expression. Lower panel: densitometric analysis of 139ccluding expression in lungs of control and *Alk1 Δ EC* homozygote mice (N=3 mice/group). (D) Immunofluorescence of HUVECs treated with D-glucose and/or BMP9, probed with specific antibodies for VE-cadherin and 139ccluding. A volumetric view of confocal Z-stack images of human transendothelial junctions with VE-Cadherin (Red channel) and 139ccluding tight junctions (green channels) was used for 3D representation. An additional yellow channel shows colocalization of VE-cadherin and 139ccluding at cell junctions with the ImarisColoc tool (Unprocessed images shown in Supplementary Figure VB). Running the software spot detection function in conjunction with the colocalization channel allowed for detection and quantification of colocalization events to calculate Pearson Correlation Coefficient (PCC) across the entire image field. Each representative images and quantification was pooled from an average of 20 Cells X4 fields ; untreated (5 mM, 0.21 ; 11 mM, 0.11 ; 25 mM, 0.13) vs BMP9-treated (5 mM, 0.26 ; 11 mM, 0.21 ; 25 mM, 0.19). € Boyden chambers permeability assay on HUVECs transfected with 139ccluding siRNA. Twenty-four hours post siRNA transfection, cells were treated with D-glucose with or without BMP9 (10 ng/mL) for 18 hrs, followed by Evans blue permeability test (N=3 independent experiments). Data \pm SEM is shown. Differences between means were analyzed using a student t test. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

8.5 Discussion

Chronic uncontrolled hyperglycemia can lead to increased retinal capillary permeability, resulting in the leakage of fluid into the surrounding tissue, causing macular edema and loss of visual acuity.^{275,297,247,298} While anti-VEGF therapies have shown significant promise in the treatment of proliferating vessels in proliferative diabetic retinopathies, patients with DME appear to be more resistant to these treatments, suggesting that other factors might contribute to the retinal vascular leakage.^{299,285,300}

Recent studies have indeed suggested that VEGF-independent mechanisms such as carbonic anhydrase³⁰¹, netrins³⁰², erythropoietin^{303,304} and Semaphorin 3A²⁰³ also play a role in vascular permeability in DME. The data we present here suggest that the endothelial specific receptor *Alk1* participates in the maintenance of endothelial junctions via 2 distinct mechanisms, 1) by blocking VEGF-induced phosphorylation of Src VE-cadherin and 2) in a VEGF-independent manner, by

solidifying occludin junctions. Disruption of Alk1 under hyperglycemic conditions thus contributes to the loss of vascular integrity in DME (**Figure S8.6**).

Alk1 signaling is critical for the development of mature, functional vessels, as is made evident by the phenotype of Alk1-deficient mice, which die by mid-gestation and display severe vascular developmental defects, including fusion of major arteries and veins, impaired placental vascular development and deficient perivascular cell coverage^{248,305}. While many studies have helped uncover the mechanisms by which Alk1 contributes to vascular remodelling^{152,306,307,308,309}

Its roles in the maintenance of endothelial junctions and vascular permeability are still unclear. A study by Rudini and colleagues showed that Alk1 co-immunoprecipitates with VE-cadherin, suggesting that it could play a role in the maintenance of stable endothelial junctions.³¹⁰ We show here that BMP9/Alk1 signaling prevents vascular leakage and that its loss leads to disrupted endothelial junctions and increased permeability. Our data suggest that this effect could originate at least in part by limiting VEGFR2 signaling, which results in reduced Src phosphorylation and internalization of VE-cadherin, and by promoting the expression of occludin, which is involved in the formation of tight junctions. Interestingly, a recent study by Ola and colleagues has shown that loss of Alk1 results in increased phosphorylation of VEGFR2 on tyrosine 1175³⁰⁶ which may be a consequence of decreased VEGFR1 levels. Our data show that Alk1 also limits the phosphorylation of tyrosine 951 of VEGFR2, which is critical for the recruitment and phosphorylation of Src and the downstream phosphorylation of VE-cadherin^{284,311}. Alternatively, decreased VEGFR2 phosphorylation and downstream VEGF signaling in BMP9-treated ECs may be a consequence of elevated levels of β -catenin, which has previously been shown to restrict VEGFR2 phosphorylation²⁴⁴ although the mechanisms by which BMP9 affects β -catenin levels are unclear. Alk1 also participates in vascular barrier functions by promoting the expression of occludin, an important transmembrane protein involved in the maintenance of tight junctions. Studies have shown that tight junction proteins are reduced during the first few weeks of STZ-induced diabetes in rats²⁴⁰ and correlate with increased vascular permeability³¹². Moreover, occludin levels drop in diabetic retinas;^{239,312,313} and the localization of the protein at endothelial junctions is altered³¹². Our data are consistent with these findings and we show that BMP9 prevents hyperglycemia-induced decrease of occludin expression and the delocalization of

occludin at cell junctions. Along with changes in occludin localization, VE-cadherin levels were also decreased in hyperglycemic ECs. These changes may reflect increased internalization of VE-cadherin observed in hyperglycemia, or may be a consequence of increased proteolytic degradation, which occur as a result of increased MMP activity³¹⁴. In hyperglycemic ECs, BMP9 contributed to the maintenance of VE-cadherin protein levels, which may be a consequence of its inhibition of Src and VE-cadherin phosphorylation, which have been associated with protein degradation. Together, our data show that BMP9 prevents permeability induced by high glucose concentrations by maintaining the expression and junctional localization of occludin and VE-cadherin in ECs. Studies have demonstrated that Sp1 is subject to dynamic O-GlcNAcylation in hyperglycemic conditions and that this modification results in decreased transcriptional activity of the protein. Given that the *ACVRL1* promoter contains multiple Sp1 binding sites that are important for adequate gene expression, hyperglycemia may down-regulate Alk1 expression at least in part by repressing Sp1 transcriptional activity.

8.6 Conclusion

In summary, we show here that hyperglycemia induces changes in endothelial cells leading to decreased Alk1 signaling, which in turn affect the junctional integrity of the endothelium and contribute to the pathological vascular leakage associated with DME. Taken together, these data suggest that Alk1 signaling plays important roles in maintaining vascular integrity and that BMP9 could help reverse heightened vascular permeability in DME.

Highlights

- Alk1 signaling is impaired in endothelial cells subjected to hyperglycemia
- BMP9 prevents hyperglycemia-induced vascular permeability
- BMP9 inhibits VEGF-induced signaling and permeability
- Alk1 signaling leads to increased expression and junctional localization of the tight junction protein occludin, which contributes to the stabilization of endothelial junctions

Acknowledgements

We thank Dr. Paul S. Oh for kindly providing the Alk1 floxed mice and Dr. Ralf Adams for providing the Cdh5Cre-ERT2 mice.

Sources of Funding

This work was supported by a grant-in-aid from the Heart and Stroke Foundation of Canada, an operating grant from the Foundation Fighting Blindness and from the Canadian Institutes of Health Research (363450). N.A was supported by the Department of Ophthalmology of Université de Montréal research fund Award (FROUM). N.A and N.P. were supported by a Suzanne-Veronneau-Troutmann Award (SVT) and a FRQS grant. B.L. was a recipient of a New Investigator Award from the Heart and Stroke Foundation of Canada. P.S. holds The Wolfe Professorship in Translational Vision Research and the Canada Research Chair in Retinal Cell Biology and is supported by the Canadian Institutes of Health Research (353770).

Disclosures: None.

Références bibliographiques

1. 25.3 Gross Anatomy of the Kidney – Anatomy and Physiology. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/25-3-gross-anatomy-of-the-kidney/>. Accessed March 22, 2019.
2. King J, Lowery DR. Physiology, Cardiac Output. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470455/>. Accessed April 9, 2019.
3. Kaufman DP, Knohl SJ. Physiology, Glomerular Filtration Rate (GFR). In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500032/>. Accessed April 9, 2019.
4. Lacombe C, Da Silva JL, Bruneval P, et al. Erythropoietin: sites of synthesis and regulation of secretion. *Am J Kidney Dis*. 1991;18(4 Suppl 1):14-19.
5. Jelkmann W. Regulation of erythropoietin production. *J Physiol*. 2011;589(Pt 6):1251-1258. doi:10.1113/jphysiol.2010.195057
6. Song R, Yosypiv IV. Development of the kidney medulla. *Organogenesis*. 2012;8(1):10-17. doi:10.4161/org.19308
7. Dantzler WH, Layton AT, Layton HE, Pannabecker TL. Urine-Concentrating Mechanism in the Inner Medulla: Function of the Thin Limbs of the Loops of Henle. *CJASN*. 2014;9(10):1781-1789. doi:10.2215/CJN.08750812
8. 25.2 Microscopic Anatomy of the Kidney: Anatomy of the Nephron | Anatomy & Physiology. <http://library.open.oregonstate.edu/aandp/chapter/25-2-microscopic-anatomy-of-the-kidney-anatomy-of-the-nephron/>. Accessed March 31, 2019.
9. Chmielewski C. Renal anatomy and overview of nephron function. *Nephrol Nurs J*. 2003;30(2):185-190; quiz 191-192.

10. Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The Glomerulus: The Sphere of Influence. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2014;9(8):1461-1469. doi:10.2215/CJN.09400913
11. Preuss HG. Basics of renal anatomy and physiology. *Clin Lab Med*. 1993;13(1):1-11.
12. Scott RP, Quaggin SE. The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol*. 2015;209(2):199-210. doi:10.1083/jcb.201410017
13. Kidneys. Structure of the Kidney. Nephron. http://encyclopedia.lubopitko-bg.com/The_Kidneys.html. Accessed June 17, 2019.
14. Barajas L. The juxtaglomerular apparatus: anatomical considerations in feedback control of glomerular filtration rate. *Fed Proc*. 1981;40(1):78-86.
15. Jourde-Chiche N, Fakhouri F, Dou L, et al. Endothelium structure and function in kidney health and disease. *Nature Reviews Nephrology*. 2019;15(2):87. doi:10.1038/s41581-018-0098-z
16. Gomez RA, Sequeira Lopez MLS. Who and where is the renal baroreceptor?: the connexin hypothesis. *Kidney Int*. 2009;75(5):460-462. doi:10.1038/ki.2008.536
17. Cheng H, Harris RC. Renal Endothelial Dysfunction in Diabetic Nephropathy. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2014;14(1):22-33. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4657140/>. Accessed April 5, 2019.
18. Leung WK, Gao L, Siu PM, Lai CW. Diabetic nephropathy and endothelial dysfunction: Current and future therapies, and emerging of vascular imaging for preclinical renal-kinetic study. *Life Sci*. 2016;166:121-130. doi:10.1016/j.lfs.2016.10.015
19. Garg P. A Review of Podocyte Biology. *Am J Nephrol*. 2018;47 Suppl 1:3-13. doi:10.1159/000481633
20. Abrahamson DR. Role of the Podocyte (and Glomerular Endothelium) in Building the GBM. *Semin Nephrol*. 2012;32(4):342-349. doi:10.1016/j.semnephrol.2012.06.005
21. Miner JH. The Glomerular Basement Membrane. *Exp Cell Res*. 2012;318(9):973-978. doi:10.1016/j.yexcr.2012.02.031

22. Miner JH. Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr Nephrol*. 2011;26(9):1413-1417. doi:10.1007/s00467-011-1785-1
23. Torban E, Braun F, Wanner N, et al. From Podocyte Biology to Novel Cures for Glomerular Disease. *Kidney International*. 2019;0(0). doi:10.1016/j.kint.2019.05.015
24. Müller-Deile J, Dannenberg J, Schroder P, et al. Podocytes regulate the glomerular basement membrane protein nephronectin by means of miR-378a-3p in glomerular diseases. *Kidney Int*. 2017;92(4):836-849. doi:10.1016/j.kint.2017.03.005
25. Saleem MA. One hundred ways to kill a podocyte. *Nephrol Dial Transplant*. 2015;30(8):1266-1271. doi:10.1093/ndt/gfu363
26. Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, Han GD, Orikasa M, Shimizu F. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton)*. 2006;11(4):274-281. doi:10.1111/j.1440-1797.2006.00583.x
27. Zhuo JL, Li XC. Proximal Nephron. *Compr Physiol*. 2013;3(3):1079-1123. doi:10.1002/cphy.c110061
28. Burg MB, Orloff J. Control of fluid absorption in the renal proximal tubule. *J Clin Invest*. 1968;47(9):2016-2024. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC297363/>. Accessed April 9, 2019.
29. Tubular reabsorption article. Khan Academy. <https://www.khanacademy.org/test-prep/mcat/organ-systems/the-renal-system/a/tubular-reabsorption-article>. Accessed April 12, 2019.
30. Memorang. Physiology II - Block IV (Renal physiology) Flashcards. Memorang. <https://www.memorangapp.com/flashcards/129263/Physiology+II+-+Block+IV/>. Accessed June 20, 2019.
31. Pannabecker TL. Structure and function of the thin limbs of the loop of Henle. *Compr Physiol*. 2012;2(3):2063-2086. doi:10.1002/cphy.c110019

32. Cha JH, Kim YH, Jung JY, Han KH, Madsen KM, Kim J. Cell proliferation in the loop of henle in the developing rat kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(7):1410-1421.
33. McCampbell KK, Springer KN, Wingert RA. Analysis of Nephron Composition and Function in the Adult Zebrafish Kidney. *J Vis Exp*. 2014;(90). doi:10.3791/51644
34. Opinions on Collecting duct system. <http://www.writeopinions.com/collecting-duct-system>. Accessed June 20, 2019.
35. Atherton JC. Regulation of fluid and electrolyte balance by the kidney. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2006;7(7):227-233. doi:10.1053/j.mpaic.2006.04.002
36. Fluid and Electrolyte Balance. <https://mcb.berkeley.edu/courses/mcb135e/kidneyfluid.html>. Accessed March 26, 2019.
37. De las Peñas R, Escobar Y, Henao F, Blasco A, Rodríguez CA. SEOM guidelines on hydroelectrolytic disorders. *Clin Transl Oncol*. 2014;16(12):1051-1059. doi:10.1007/s12094-014-1234-2
38. Ruster C, Wolf G. Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Progression of Renal Disease. *JASN*. 2006;17(11):2985-2991. doi:10.1681/ASN.2006040356
39. Fountain JH, Lappin SL. Physiology, Renin Angiotensin System. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470410/>. Accessed June 20, 2019.
40. Sparks MA, Crowley SD, Gurley SB, Mirosou M, Coffman TM. Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol*. 2014;4(3):1201-1228. doi:10.1002/cphy.c130040
41. Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Canadian Journal of Diabetes*. 2018;42:S10-S15. doi:10.1016/j.cjcd.2017.10.003
42. IDF diabetes atlas - Home. <https://diabetesatlas.org/>. Accessed April 15, 2019.

43. Hunter DJ, Reddy KS. Noncommunicable Diseases. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1109345>. doi:10.1056/NEJMra1109345
44. Fowler MJ. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. *Clinical Diabetes*. 2008;26(2):77-82. doi:10.2337/diaclin.26.2.77
45. Punthakee Z, Goldenberg R, Katz P. Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes, Prediabetes and Metabolic Syndrome. *Canadian Journal of Diabetes*. 2018;42:S10-S15. doi:10.1016/j.cjcd.2017.10.003
46. American Diabetes Association. *Standards of Medical Care in Diabetes—2019* Abridged for Primary Care Providers. *Clin Diabetes*. 2019;37(1):11-34. doi:10.2337/cd18-0105
47. 8. Pharmacologic Approaches to Glycemic Treatment: Standards of Medical Care in Diabetes—2018 | Diabetes Care. http://care.diabetesjournals.org/content/41/Supplement_1/S73. Accessed April 13, 2019.
48. King P, Peacock I, Donnelly R. The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48(5):643-648. doi:10.1046/j.1365-2125.1999.00092.x
49. Association AD. 6. Glycemic Targets: Standards of Medical Care in Diabetes—2019. *Diabetes Care*. 2019;42(Supplement 1):S61-S70. doi:10.2337/dc19-S006
50. Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Nathan DM, Genuth S, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1993;329(14):977-986. doi:10.1056/NEJM199309303291401
51. Little RR. Glycated hemoglobin standardization--National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) perspective. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41(9):1191-1198. doi:10.1515/CCLM.2003.183

52. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;359(15):1577-1589. doi:10.1056/NEJMoa0806470
53. XII. Treatment of Hypertension in Association With Diabetes Mellitus | Hypertension Canada Guidelines. <https://guidelines.hypertension.ca/prevention-treatment/hypertension-with-diabetes/>. Accessed April 14, 2019.
54. Kamari Y, Bitzur R, Cohen H, Shaish A, Harats D. Should All Diabetic Patients Be Treated With a Statin? *Diabetes Care*. 2009;32(Suppl 2):S378-S383. doi:10.2337/dc09-S344
55. Goals of Therapy for Patients with Diabetic Nephropathy | Kidney News. <https://www.kidneynews.org/kidney-news/special-sections/diabetic-nephropathy/goals-of-therapy-for-patients-with-diabetic-nephropathy>. Accessed March 19, 2019.
56. When Goals Are Not Met in Diabetes Care. AJMC. <https://www.ajmc.com/journals/ajac/2017/2017-vol5-n4/when-goals-are-not-met-in-diabetes-care>. Accessed April 15, 2019.
57. Menon AS, Ahluwalia AI. The ABC of diabetes. How many patients are able to achieve the goal laid down by American Diabetes Association? *Med J Armed Forces India*. 2015;71(2):132-134. doi:10.1016/j.mjafi.2014.10.008
58. Sena CM, Pereira AM, Seica R. Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2216-2231. doi:10.1016/j.bbadis.2013.08.006
59. Kitada M, Zhang Z, Mima A, King GL. Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *J Diabetes Investig*. 2010;1(3):77-89. doi:10.1111/j.2040-1124.2010.00018.x
60. Stratmann B, Tschoepe D. Heart in Diabetes: Not Only a Macrovascular Disease. *Diabetes Care*. 2011;34(Suppl 2):S138-S144. doi:10.2337/dc11-s208

61. Laing SP, Swerdlow AJ, Slater SD, et al. Mortality from heart disease in a cohort of 23,000 patients with insulin-treated diabetes. *Diabetologia*. 2003;46(6):760-765. doi:10.1007/s00125-003-1116-6
62. Mahmood SS, Levy D, Vasan RS, Wang TJ. The Framingham Heart Study and the Epidemiology of Cardiovascular Diseases: A Historical Perspective. *Lancet*. 2014;383(9921):999-1008. doi:10.1016/S0140-6736(13)61752-3
63. Tsao CW, Vasan RS. Cohort Profile: The Framingham Heart Study (FHS): overview of milestones in cardiovascular epidemiology. *Int J Epidemiol*. 2015;44(6):1800-1813. doi:10.1093/ije/dyv337
64. Orasanu G, Plutzky J. The Continuum of Diabetic Vascular Disease: From Macro- to Micro-. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53(5 Suppl):S35-S42. doi:10.1016/j.jacc.2008.09.055
65. Kempen JH, O'Colmain BJ, Leske MC, et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol*. 2004;122(4):552-563. doi:10.1001/archophth.122.4.552
66. King GL, Brownlee M. THE CELLULAR AND MOLECULAR MECHANISMS OF DIABETIC COMPLICATIONS. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 1996;25(2):255-270. doi:10.1016/S0889-8529(05)70324-8
67. Maji D. Prevention of microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus. *J Indian Med Assoc*. 2004;102(8):426, 428, 430 passim.
68. Diabetic Neuropathies | Diabetes Care. <http://care.diabetesjournals.org/content/28/4/956>. Accessed April 15, 2019.
69. Schreiber AK, Nones CF, Reis RC, Chichorro JG, Cunha JM. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J Diabetes*. 2015;6(3):432-444. doi:10.4239/wjd.v6.i3.432
70. Javed S, Petropoulos IN, Alam U, Malik RA. Treatment of painful diabetic neuropathy. *Ther Adv Chronic Dis*. 2015;6(1):15-28. doi:10.1177/2040622314552071

71. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic Kidney Disease: Challenges, Progress, and Possibilities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 2017;12(12):2032-2045. doi:10.2215/CJN.11491116
72. Campbell RC, Ruggenti P, Remuzzi G. Proteinuria in diabetic nephropathy: treatment and evolution. *Curr Diab Rep*. 2003;3(6):497-504.
73. Gheith O, Farouk N, Nampoory N, Halim MA, Al-Otaibi T. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors. *J Nephroarmacol*. 2015;5(1):49-56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297507/>. Accessed April 18, 2019.
74. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *J Clin Invest*. 2014;124(6):2333-2340. doi:10.1172/JCI72271
75. Nazar CMJ. Diabetic nephropathy; principles of diagnosis and treatment of diabetic kidney disease. *J Nephroarmacol*. 2014;3(1):15-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297588/>. Accessed April 16, 2019.
76. Kolset SO, Reinholt FP, Jenssen T. Diabetic Nephropathy and Extracellular Matrix. *J Histochem Cytochem*. 2012;60(12):976-986. doi:10.1369/0022155412465073
77. Taddei S, Ghiadoni L, Virdis A, Salvetti DV and A. Mechanisms of Endothelial Dysfunction: Clinical Significance and Preventive Non-Pharmacological Therapeutic Strategies. *Current Pharmaceutical Design*. <http://www.eurekaselect.com/63795/article>. Published October 31, 2003. Accessed April 22, 2019.
78. Lennon R, Randles MJ, Humphries MJ. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:160. doi:10.3389/fendo.2014.00160
79. Stehouwer CDA. Microvascular Dysfunction and Hyperglycemia: A Vicious Cycle With Widespread Consequences. *Diabetes*. 2018;67(9):1729-1741. doi:10.2337/dbi17-0044
80. Pagtalunan ME, Miller PL, Jumping-Eagle S, et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *J Clin Invest*. 1997;99(2):342-348. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC507802/>. Accessed April 17, 2019.

81. Dai H, Liu Q, Liu B. Research Progress on Mechanism of Podocyte Depletion in Diabetic Nephropathy. *Journal of Diabetes Research*. doi:10.1155/2017/2615286
82. Lin JS, Susztak K. Podocytes: The Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? *Curr Diab Rep*. 2016;16(5):45. doi:10.1007/s11892-016-0735-5
83. Chen HC, Chen CA, Guh JY, Chang JM, Shin SJ, Lai YH. Altering expression of alpha3beta1 integrin on podocytes of human and rats with diabetes. *Life Sci*. 2000;67(19):2345-2353.
84. Daehn IS. Glomerular Endothelial Cells Stress and Cross-Talk With Podocytes in the Development of Diabetic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5:76. doi:10.3389/fmed.2018.00076
85. Daehn IS. Glomerular Endothelial Cell Stress and Cross-Talk With Podocytes in Early Diabetic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2018;5. doi:10.3389/fmed.2018.00076
86. Campbell RC, Ruggenti P, Remuzzi G. Proteinuria in diabetic nephropathy: treatment and evolution. *Curr Diab Rep*. 2003;3(6):497-504.
87. Siddiqi FS, Advani A. Endothelial-podocyte crosstalk: the missing link between endothelial dysfunction and albuminuria in diabetes. *Diabetes*. 2013;62(11):3647-3655. doi:10.2337/db13-0795
88. Roshan B, Stanton RC. A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy. *J Nephropathol*. 2013;2(4):234-240. doi:10.12860/JNP.2013.37
89. Endothelial-Podocyte Crosstalk: The Missing Link Between Endothelial Dysfunction and Albuminuria in Diabetes | Diabetes. <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/62/11/3647.article-info>. Accessed April 9, 2019.
90. Maclsaac RJ, Ekinci EI, Jerums G. 'Progressive diabetic nephropathy. How useful is microalbuminuria?: contra.' *Kidney International*. 2014;86(1):50-57. doi:10.1038/ki.2014.98
91. Roshan B, Stanton RC. A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy. *J Nephropathol*. 2013;2(4):234-240. doi:10.12860/JNP.2013.37

92. Alpers CE, Hudkins KL. Mouse Models of Diabetic Nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(3):278-284. doi:10.1097/MNH.0b013e3283451901
93. Van Belle TL, Taylor P, von Herrath MG. Mouse Models for Type 1 Diabetes. *Drug Discov Today Dis Models*. 2009;6(2):41-45. doi:10.1016/j.ddmod.2009.03.008
94. Prabhakar SS. Role of nitric oxide in diabetic nephropathy. *Semin Nephrol*. 2004;24(4):333-344.
95. Breyer MD, Böttinger E, Brosius FC, et al. Mouse Models of Diabetic Nephropathy. *JASN*. 2005;16(1):27-45. doi:10.1681/ASN.2004080648
96. Chang J-H, Gurley SB. Assessment of diabetic nephropathy in the Akita mouse. *Methods Mol Biol*. 2012;933:17-29. doi:10.1007/978-1-62703-068-7_2
97. Gowda S, Desai PB, Kulkarni SS, Hull VV, Math AAK, Vernekar SN. Markers of renal function tests. *N Am J Med Sci*. 2010;2(4):170-173. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3354405/>. Accessed April 28, 2019.
98. Seegmiller JC, Miller WG, Bachmann LM. Moving Toward Standardization of Urine Albumin Measurements. *EJIFCC*. 2017;28(4):258-267. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5746835/>. Accessed April 28, 2019.
99. Keane WF, Eknoyan G. Proteinuria, albuminuria, risk, assessment, detection, elimination (PARADE): a position paper of the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis*. 1999;33(5):1004-1010.
100. Karar T, Alniwaider RAR, Fattah MA, Al Tamimi W, Alanazi A, Qureshi S. Assessment of microalbuminuria and albumin creatinine ratio in patients with type 2 diabetes mellitus. *J Nat Sci Biol Med*. 2015;6(Suppl 1):S89-S92. doi:10.4103/0976-9668.166095
101. McMahon AP. Development of the Mammalian Kidney. *Curr Top Dev Biol*. 2016;117:31-64. doi:10.1016/bs.ctdb.2015.10.010

102. Tobar A, Ori Y, Benchetrit S, et al. Proximal tubular hypertrophy and enlarged glomerular and proximal tubular urinary space in obese subjects with proteinuria. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e75547. doi:10.1371/journal.pone.0075547
103. Schaeffner E. Determining the Glomerular Filtration Rate—An Overview. *Journal of Renal Nutrition*. 2017;27(6):375-380. doi:10.1053/j.jrn.2017.07.005
104. Levey AS, Inker LA. GFR as the “Gold Standard”: Estimated, Measured, and True. *American Journal of Kidney Diseases*. 2016;67(1):9-12. doi:10.1053/j.ajkd.2015.09.014
105. Botev R, Mallié J-P, Wetzels JFM, Couchoud C, Schüick O. The Clinician and Estimation of Glomerular Filtration Rate by Creatinine-based Formulas: Current Limitations and Quo Vadis. *CJASN*. 2011;6(4):937-950. doi:10.2215/CJN.09241010
106. Diabetes and Chronic Kidney Disease: Prevention, Early Recognition, and Treatment. Consultant 360. <https://www.consultant360.com/articles/diabetes-and-chronic-kidney-disease-prevention-early-recognition-and-treatment>. Accessed April 12, 2019.
107. Haneda M, Utsunomiya K, Koya D, et al. A new Classification of Diabetic Nephropathy 2014: a report from Joint Committee on Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Investig*. 2015;6(2):242-246. doi:10.1111/jdi.12319
108. Gounden V, Jialal I. Renal Function Tests. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507821/>. Accessed July 1, 2019.
109. Ix JH, Wassel CL, Stevens LA, et al. Equations to estimate creatinine excretion rate: the CKD epidemiology collaboration. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(1):184-191. doi:10.2215/CJN.05030610
110. Wu T-E, Chen Y-H, Chen H-S. Effects of glucose and blood pressure control on diabetic kidney disease in old patients with type 2 diabetes. *Diabetol Metab Syndr*. 2014;6. doi:10.1186/1758-5996-6-81

111. Bidani AK, Polichnowski AJ, Loutzenhiser R, Griffin KA. Renal microvascular dysfunction, hypertension and CKD progression. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2013;22(1):1-9. doi:10.1097/MNH.0b013e32835b36c1
112. Titan SM, M Vieira J, Dominguez WV, Barros RT, Zatz R. ACEI and ARB combination therapy in patients with macroalbuminuric diabetic nephropathy and low socioeconomic level: a double-blind randomized clinical trial. *Clin Nephrol*. 2011;76(4):273-283.
113. Chen Y, Zhi Y, Li C, et al. HDL cholesterol and risk of diabetic nephropathy in patient with type 1 diabetes: A meta-analysis of cohort studies. *Diabetes Res Clin Pract*. 2016;122:84-91. doi:10.1016/j.diabres.2016.10.013
114. Onyenwenyi C, Ricardo AC. Impact of Lifestyle Modification on Diabetic Kidney Disease. *Curr Diab Rep*. 2015;15(9):60. doi:10.1007/s11892-015-0632-3
115. Cheung N, Wong IY, Wong TY. Ocular Anti-VEGF Therapy for Diabetic Retinopathy: Overview of Clinical Efficacy and Evolving Applications. *Diabetes Care*. 2014;37(4):900-905. doi:10.2337/dc13-1990
116. Guise E, Chade AR. VEGF therapy for the kidney: emerging strategies. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. September 2018. doi:10.1152/ajprenal.00617.2017
117. de Vriese AS, Tilton RG, Elger M, Stephan CC, Kriz W, Lameire NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2001;12(5):993-1000.
118. Meadows KL, Hurwitz HI. Anti-VEGF Therapies in the Clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10). doi:10.1101/cshperspect.a006577
119. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1129-1136. doi:10.1056/NEJMoa0707330
120. Nakagawa T, Kosugi T, Haneda M, Rivard CJ, Long DA. Abnormal Angiogenesis in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 2009;58(7):1471-1478. doi:10.2337/db09-0119

121. Chade AR. Vascular Endothelial Growth Factor Therapy for the Kidney: Are We There Yet? *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):1-3. doi:10.1681/ASN.2015050491
122. Tufro A, Veron D. VEGF AND PODOCYTES IN DIABETIC NEPHROPATHY. *Semin Nephrol*. 2012;32(4):385-393. doi:10.1016/j.semnephrol.2012.06.010
123. Nakagawa T, Sato W, Kosugi T, Johnson RJ. Uncoupling of VEGF with Endothelial NO as a Potential Mechanism for Abnormal Angiogenesis in the Diabetic Nephropathy. *Journal of Diabetes Research*. doi:10.1155/2013/184539
124. Baelde HJ, Eikmans M, Lappin DWP, et al. Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss. *Kidney Int*. 2007;71(7):637-645. doi:10.1038/sj.ki.5002101
125. Hohenstein B, Hausknecht B, Boehmer K, Riess R, Brekken RA, Hugo CPM. Local VEGF activity but not VEGF expression is tightly regulated during diabetic nephropathy in man. *Kidney International*. 2006;69(9):1654-1661. doi:10.1038/sj.ki.5000294
126. Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell*. 2007;130(4):691-703. doi:10.1016/j.cell.2007.06.054
127. Sison K, Eremina V, Baelde H, et al. Glomerular Structure and Function Require Paracrine, Not Autocrine, VEGF-VEGFR-2 Signaling. *J Am Soc Nephrol*. 2010;21(10):1691-1701. doi:10.1681/ASN.2010030295
128. Veron D, Villegas G, Aggarwal PK, et al. Acute Podocyte Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF-A) Knockdown Disrupts alphaVbeta3 Integrin Signaling in the Glomerulus. *PLoS One*. 2012;7(7). doi:10.1371/journal.pone.0040589
129. Signaling Receptors for TGF- β Family Members. <https://cshperspectives.cshlp.org/content/8/8/a022053.full>. Accessed May 29, 2019.
130. Goumenos DS, Tsakas S, El Nahas AM, et al. Transforming growth factor-beta(1) in the kidney and urine of patients with glomerular disease and proteinuria. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17(12):2145-2152. doi:10.1093/ndt/17.12.2145

131. Isaka Y. Targeting TGF- β Signaling in Kidney Fibrosis. *Int J Mol Sci.* 2018;19(9). doi:10.3390/ijms19092532
132. Walton KL, Johnson KE, Harrison CA. Targeting TGF- β Mediated SMAD Signaling for the Prevention of Fibrosis. *Front Pharmacol.* 2017;8. doi:10.3389/fphar.2017.00461
133. Wang S, Hirschberg R. BMP7 antagonizes TGF-beta -dependent fibrogenesis in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2003;284(5):F1006-1013. doi:10.1152/ajprenal.00382.2002
134. Seong H-A, Manoharan R, Ha H. Smad proteins differentially regulate obesity-induced glucose and lipid abnormalities and inflammation via class-specific control of AMPK-related kinase MPK38/MELK activity. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):1-13. doi:10.1038/s41419-018-0489-x
135. El-Gohary Y, Tulachan S, Wiersch J, et al. A Smad Signaling Network Regulates Islet Cell Proliferation. *Diabetes.* 2014;63(1):224-236. doi:10.2337/db13-0432
136. Braga Gomes K, Fontana Rodrigues K, Fernandes AP. The Role of Transforming Growth Factor-Beta in Diabetic Nephropathy. *International Journal of Medical Genetics.* doi:10.1155/2014/180270
137. Aird WC. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med.* 2004;32(5 Suppl):S271-279.
138. Sandoo A, van Zanten JJCSV, Metsios GS, Carroll D, Kitas GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:302-312. doi:10.2174/1874192401004010302
139. Versari D, Daghini E, Viridis A, Ghiadoni L, Taddei S. Endothelial Dysfunction as a Target for Prevention of Cardiovascular Disease. *Diabetes Care.* 2009;32(Suppl 2):S314-S321. doi:10.2337/dc09-S330
140. Graham H, Peng C. Activin receptor-like kinases: structure, function and clinical implications. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2006;6(1):45-58.
141. Roman BL, Hinck AP. ALK1 signaling in development and disease: new paradigms. *Cell Mol Life Sci.* 2017;74(24):4539-4560. doi:10.1007/s00018-017-2636-4

142. Cunha SI, Pietras K. ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. *Blood*. 2011;117(26):6999-7006. doi:10.1182/blood-2011-01-330142
143. Barbosa AB, Hans Filho G, Vicari CF dos S, Medeiros MZ, Couto DV, Takita LC. Rendu-Osler-Weber syndrome: dermatological approach. *An Bras Dermatol*. 2015;90(3 Suppl 1):226-228. doi:10.1590/abd1806-4841.20152563
144. Hellström M, Phng L-K, Hofmann JJ, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. 2007;445(7129):776-780. doi:10.1038/nature05571
145. Shovlin CL. Hereditary haemorrhagic telangiectasia: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Rev*. 2010;24(6):203-219. doi:10.1016/j.blre.2010.07.001
146. Choi E-J, Walker EJ, Shen F, et al. Minimal homozygous endothelial deletion of Eng with VEGF stimulation is sufficient to cause cerebrovascular dysplasia in the adult mouse. *Cerebrovasc Dis*. 2012;33(6):540-547. doi:10.1159/000337762
147. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige J-J, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*. 2007;109(5):1953-1961. doi:10.1182/blood-2006-07-034124
148. David L, Mallet C, Vailhé B, Lamouille S, Feige J-J, Bailly S. Activin receptor-like kinase 1 inhibits human microvascular endothelial cell migration: potential roles for JNK and ERK. *J Cell Physiol*. 2007;213(2):484-489. doi:10.1002/jcp.21126
149. Levet S, Ciais D, Merdzhanova G, et al. Bone morphogenetic protein 9 (BMP9) controls lymphatic vessel maturation and valve formation. *Blood*. 2013;122(4):598-607. doi:10.1182/blood-2012-12-472142
150. Hill CS. Transcriptional Control by the SMADs. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(10). doi:10.1101/cshperspect.a022079
151. Meeteren LA van, Thorikay M, Bergqvist S, et al. Anti-human Activin Receptor-like Kinase 1 (ALK1) Antibody Attenuates Bone Morphogenetic Protein 9 (BMP9)-induced ALK1 Signaling and

Interferes with Endothelial Cell Sprouting. *J Biol Chem.* 2012;287(22):18551-18561. doi:10.1074/jbc.M111.338103

152. Scharpfenecker M, Dinther M van, Liu Z, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *Journal of Cell Science.* 2007;120(6):964-972. doi:10.1242/jcs.002949

153. Persson U, Izumi H, Souchelnytskyi S, et al. The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett.* 1998;434(1-2):83-87.

154. Dennler S, Goumans M-J, ten Dijke P. Transforming growth factor beta signal transduction. *J Leukoc Biol.* 2002;71(5):731-740.

155. Li W, Salmon RM, Jiang H, Morrell NW. Regulation of the ALK1 ligands, BMP9 and BMP10. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(4):1135-1141. doi:10.1042/BST20160083

156. Tillet E, Bailly S. Emerging roles of BMP9 and BMP10 in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet.* 2015;5. doi:10.3389/fgene.2014.00456

157. Soubrier F, Chung WK, Machado R, et al. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2013;62(25 Suppl):D13-21. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.035

158. Wooderchak-Donahue WL, McDonald J, O'Fallon B, et al. BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet.* 2013;93(3):530-537. doi:10.1016/j.ajhg.2013.07.004

159. de Vinuesa AG, Bocci M, Pietras K, Ten Dijke P. Targeting tumour vasculature by inhibiting activin receptor-like kinase (ALK)1 function. *Biochem Soc Trans.* 2016;44(4):1142-1149. doi:10.1042/BST20160093

160. Akla Naoufal, Viallard Claire, Popovic Natalija, Lora Gil Cindy, Sapiha Przemyslaw, Larrivée Bruno. BMP9 (Bone Morphogenetic Protein-9)/Alk1 (Activin-Like Kinase Receptor Type I) Signaling Prevents Hyperglycemia-Induced Vascular Permeability. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2018;38(8):1821-1836. doi:10.1161/ATVBAHA.118.310733

161. Muñoz-Félix JM, López-Novoa JM, Martínez-Salgado C. Heterozygous disruption of activin receptor-like kinase 1 is associated with increased renal fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int.* 2014;85(2):319-332. doi:10.1038/ki.2013.292
162. Claesson-Welsh Lena. Alk1 (Activin Receptor-Like Kinase 1) and Vascular Hyperpermeability in Diabetic Retinopathy. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2018;38(8):1673-1675. doi:10.1161/ATVBAHA.118.311365
163. Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. *Lancet.* 2013;382(9888):260-272. doi:10.1016/S0140-6736(13)60687-X
164. Kang D-H, Kanellis J, Hugo C, et al. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13(3):806-816.
165. Daehn IS. Glomerular Endothelial Cells Stress and Cross-Talk With Podocytes in the Development of Diabetic Kidney Disease. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:76. doi:10.3389/fmed.2018.00076
166. Lin JS, Susztak K. Podocytes: the Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? *Curr Diab Rep.* 2016;16(5):45. doi:10.1007/s11892-016-0735-5
167. Reidy K, Kang HM, Hostetter T, Susztak K. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease. *J Clin Invest.* 2014;124(6):2333-2340. doi:10.1172/JCI72271
168. Toth-Manikowski S, Atta MG. Diabetic Kidney Disease: Pathophysiology and Therapeutic Targets. *J Diabetes Res.* 2015;2015:697010. doi:10.1155/2015/697010
169. Cheng H, Harris RC. Renal endothelial dysfunction in diabetic nephropathy. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2014;14(1):22-33.
170. Khamaisi M, Schrijvers BF, De Vriese AS, Raz I, Flyvbjerg A. The emerging role of VEGF in diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2003;18(8):1427-1430. doi:10.1093/ndt/gfg242
171. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney Int.* 2004;65(6):2003-2017. doi:10.1111/j.1523-1755.2004.00621.x

172. Tanabe K, Maeshima Y, Sato Y, Wada J. Antiangiogenic Therapy for Diabetic Nephropathy. *Biomed Res Int*. 2017;2017:5724069. doi:10.1155/2017/5724069
173. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med*. 2008;358(11):1129-1136. doi:10.1056/NEJMoa0707330
174. Benn A, Hiepen C, Osterland M, Schutte C, Zwijsen A, Knaus P. Role of bone morphogenetic proteins in sprouting angiogenesis: differential BMP receptor-dependent signaling pathways balance stalk vs. tip cell competence. *FASEB J*. 2017;31(11):4720-4733. doi:10.1096/fj.201700193RR
175. Larrivee B, Prahst C, Gordon E, et al. ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell*. 2012;22(3):489-500. doi:10.1016/j.devcel.2012.02.005
176. Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, et al. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*. 2007;120(Pt 6):964-972. doi:10.1242/jcs.002949
177. Urness LD, Sorensen LK, Li DY. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet*. 2000;26(3):328-331. doi:10.1038/81634
178. Munoz-Felix JM, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C. Heterozygous disruption of activin receptor-like kinase 1 is associated with increased renal fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy. *Kidney Int*. 2014;85(2):319-332. doi:10.1038/ki.2013.292
179. Akla N, Viallard C, Popovic N, Lora Gil C, Sapiuha P, Larrivee B. BMP (Bone Morphogenetic Protein) 9/Alk1 (Activin-Like Kinase Receptor Type I) Signaling Prevents Hyperglycemia-Induced Vascular Permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. June 2018. doi:10.1161/ATVBAHA.118.310733
180. Baeyens N, Larrivee B, Ola R, et al. Defective fluid shear stress mechanotransduction mediates hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Cell Biol*. 2016;214(7):807-816. doi:10.1083/jcb.201603106

181. Sorensen I, Adams RH, Gossler A. DLL1-mediated Notch activation regulates endothelial identity in mouse fetal arteries. *Blood*. 2009;113(22):5680-5688. doi:10.1182/blood-2008-08-174508
182. Park SO, Wankhede M, Lee YJ, et al. Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest*. 2009;119(11):3487-3496. doi:10.1172/JCI39482
183. Keppler A, Gretz N, Schmidt R, et al. Plasma creatinine determination in mice and rats: an enzymatic method compares favorably with a high-performance liquid chromatography assay. *Kidney Int*. 2007;71(1):74-78. doi:10.1038/sj.ki.5001988
184. Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2016;9:279-290. doi:10.2147/IJNRD.S103784
185. Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, et al. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(2):539-550. doi:10.1681/ASN.2006050459
186. Jerkic M, Sotov V, Letarte M. Oxidative stress contributes to endothelial dysfunction in mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Oxid Med Cell Longev*. 2012;2012:686972. doi:10.1155/2012/686972
187. Ola R, Dubrac A, Han J, et al. PI3 kinase inhibition improves vascular malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nat Commun*. 2016;7:13650. doi:10.1038/ncomms13650
188. Akla N, Viallard C, Popovic N, Lora Gil C, Sapieha P, Larrivee B. BMP (Bone Morphogenetic Protein) 9/Alk1 (Activin-Like Kinase Receptor Type I) Signaling Prevents Hyperglycemia-Induced Vascular Permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. June 2018. doi:10.1161/ATVBAHA.118.310733
189. Tonneijck L, Muskiet MHA, Smits MM, et al. Glomerular Hyperfiltration in Diabetes: Mechanisms, Clinical Significance, and Treatment. *J Am Soc Nephrol*. 2017;28(4):1023-1039. doi:10.1681/ASN.2016060666

190. Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus. *J Pathol.* 2003;200(4):537-546. doi:10.1002/path.1439
191. Munoz-Felix JM, Perretta-Tejedor N, Eleno N, Lopez-Novoa JM, Martinez-Salgado C. ALK1 heterozygosity increases extracellular matrix protein expression, proliferation and migration in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(6):1111-1122. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.02.017
192. Morine KJ, Qiao X, Paruchuri V, et al. Reduced activin receptor-like kinase 1 activity promotes cardiac fibrosis in heart failure. *Cardiovasc Pathol.* 2017;31:26-33. doi:10.1016/j.carpath.2017.07.004
193. Morine KJ, Qiao X, Paruchuri V, et al. Conditional knockout of activin like kinase-1 (ALK-1) leads to heart failure without maladaptive remodeling. *Heart Vessels.* 2017;32(5):628-636. doi:10.1007/s00380-017-0955-x
194. Abou-Alfa GK, Miksad RA, Tejani MA, et al. A Phase Ib, Open-Label Study of Dalantercept, an Activin Receptor-Like Kinase 1 Ligand Trap, plus Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Oncologist.* 2019;24(2):161-e70. doi:10.1634/theoncologist.2018-0654
195. Schnaper HW, Jandeska S, Runyan CE, et al. TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:2448-2465.
196. Murakami K, Takemura T, Hino S, Yoshioka K. Urinary transforming growth factor-beta in patients with glomerular diseases. *Pediatr Nephrol.* 1997;11(3):334-336.
197. Lam S, van der Geest RN, Verhagen NAM, Daha MR, van Kooten C. Secretion of collagen type IV by human renal fibroblasts is increased by high glucose via a TGF-beta-independent pathway. *Nephrol Dial Transplant.* 2004;19(7):1694-1701. doi:10.1093/ndt/gfh235
198. Fan Y, Li X, Xiao W, et al. BAMBI elimination enhances alternative TGF-beta signaling and glomerular dysfunction in diabetic mice. *Diabetes.* 2015;64(6):2220-2233. doi:10.2337/db14-1397

199. Ewens KG, George RA, Sharma K, Ziyadeh FN, Spielman RS. Assessment of 115 candidate genes for diabetic nephropathy by transmission/disequilibrium test. *Diabetes*. 2005;54(11):3305-3318. doi:10.2337/diabetes.54.11.3305
200. David L, Mallet C, Keramidas M, et al. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res*. 2008;102(8):914-922. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.165530
201. David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige J-J, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*. 2007;109(5):1953-1961. doi:10.1182/blood-2006-07-034124
202. Adler SG, Feld S, Striker L, et al. Glomerular type IV collagen in patients with diabetic nephropathy with and without additional glomerular disease. *Kidney Int*. 2000;57(5):2084-2092. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00058.x
203. Fu J, Lee K, Chuang PY, Liu Z, He JC. Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2015;308(4):F287-297. doi:10.1152/ajprenal.00533.2014
204. Fogo AB. Talking back: the podocytes and endothelial cells duke it out. *Kidney Int*. 2016;90(6):1157-1159. doi:10.1016/j.kint.2016.08.031
205. Hillege HL, Janssen WM, Bak AA, et al. Microalbuminuria is common, also in a nondiabetic, nonhypertensive population, and an independent indicator of cardiovascular risk factors and cardiovascular morbidity. *J Intern Med*. 2001;249(6):519-526.
206. Hull RP, Goldsmith DJA. Nephrotic syndrome in adults. *BMJ*. 2008;336(7654):1185-1189. doi:10.1136/bmj.39576.709711.80
207. Dyer LA, Pi X, Patterson C. The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(9):472-480. doi:10.1016/j.tem.2014.05.003
208. Farquhar MG. The glomerular basement membrane: not gone, just forgotten. doi:10.1172/JCI29488

209. Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing. *International Journal of Vascular Medicine*. doi:10.1155/2012/918267
210. Chawla A, Chawla R, Jaggi S. Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab*. 2016;20(4):546-551. doi:10.4103/2230-8210.183480
211. Duh EJ, Sun JK, Stitt AW. Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight*. 2017;2(14). doi:10.1172/jci.insight.93751
212. Lee R, Wong TY, Sabanayagam C. Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye Vis (Lond)*. 2015;2:17. doi:10.1186/s40662-015-0026-2
213. Romero-Aroca P. Managing diabetic macular edema: The leading cause of diabetes blindness. *World J Diabetes*. 2011;2(6):98-104. doi:10.4239/wjd.v2.i6.98
214. Romero-Aroca P. Targeting the Pathophysiology of Diabetic Macular Edema. *Diabetes Care*. 2010;33(11):2484-2485. doi:10.2337/dc10-1580
215. Shin ES, Sorenson CM, Sheibani N. Diabetes and retinal vascular dysfunction. *J Ophthalmic Vis Res*. 2014;9(3):362-373. doi:10.4103/2008-322X.143378
216. Romero-Aroca P, Baget-Bernaldiz M, Pareja-Rios A, Lopez-Galvez M, Navarro-Gil R, Verges R. Diabetic Macular Edema Pathophysiology: Vasogenic versus Inflammatory. *J Diabetes Res*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/2156273
217. Miller JW, Adamis AP, Shima DT, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol*. 1994;145(3):574-584.
218. Antonetti DA, Barber AJ, Hollinger LA, Wolpert EB, Gardner TW. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. *J Biol Chem*. 1999;274(33):23463-23467. doi:10.1074/jbc.274.33.23463

219. Klaassen I, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res.* 2013;34:19-48. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.02.001
220. Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(6):a002899. doi:10.1101/cshperspect.a002899
221. Zhang X, Zeng H, Bao S, Wang N, Gillies MC. Diabetic macular edema: new concepts in patho-physiology and treatment. *Cell Biosci.* 2014;4:27. doi:10.1186/2045-3701-4-27
222. Hammes HP, Lin J, Bretzel RG, Brownlee M, Breier G. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes.* 1998;47(3):401-406. doi:10.2337/diabetes.47.3.401
223. Lampugnani MG, Zanetti A, Corada M, et al. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, β -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J Cell Biol.* 2003;161(4):793-804. doi:10.1083/jcb.200209019
224. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev.* 2006;86(1):279-367. doi:10.1152/physrev.00012.2005
225. Falavarjani KG, Nguyen QD. Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye (Lond).* 2013;27(7):787-794. doi:10.1038/eye.2013.107
226. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* 2013;17(1):20-33. doi:10.1016/j.cmet.2012.11.012
227. Niessen K, Zhang G, Ridgway JB, Chen H, Yan M. ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development. *Blood.* 2010;115(8):1654-1661. doi:10.1182/blood-2009-07-235655

228. Oh SP, Seki T, Goss KA, et al. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- β 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *PNAS*. 2000;97(6):2626-2631. doi:10.1073/pnas.97.6.2626
229. Urness LD, Sorensen LK, Li DY. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet*. 2000;26(3):328-331. doi:10.1038/81634
230. Chen YG, Massagué J. Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem*. 1999;274(6):3672-3677. doi:10.1074/jbc.274.6.3672
231. Kim M, Choe S. BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep*. 2011;44(10):619-634. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.10.619
232. Lamplot JD, Qin J, Nan G, et al. BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. *Am J Stem Cells*. 2013;2(1):1-21.
233. Larrivée B, Prahst C, Gordon E, et al. ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell*. 2012;22(3):489-500. doi:10.1016/j.devcel.2012.02.005
234. Bidart M, Ricard N, Levet S, et al. BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(2):313-324. doi:10.1007/s00018-011-0751-1
235. Brown MA, Zhao Q, Baker KA, et al. Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem*. 2005;280(26):25111-25118. doi:10.1074/jbc.M503328200
236. David L, Feige J-J, Bailly S. Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(3):203-212. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.05.001
237. David L, Mallet C, Keramidas M, et al. Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res*. 2008;102(8):914-922. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.165530

238. Townson SA, Martinez-Hackert E, Greppi C, et al. Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J Biol Chem*. 2012;287(33):27313-27325. doi:10.1074/jbc.M112.377960
239. Kloc M, Kubiak JZ, Li XC, Ghobrial RM. Pericytes, microvascular dysfunction, and chronic rejection. *Transplantation*. 2015;99(4):658-667. doi:10.1097/TP.0000000000000648
240. Park SO, Lee YJ, Seki T, et al. ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood*. 2008;111(2):633-642. doi:10.1182/blood-2007-08-107359
241. Park SO, Wankhede M, Lee YJ, et al. Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest*. 2009;119(11):3487-3496. doi:10.1172/JCI39482
242. Bell RC, Khurana M, Ryan EA, Finegood DT. Gender differences in the metabolic response to graded numbers of transplanted islets of Langerhans. *Endocrinology*. 1994;135(6):2681-2687. doi:10.1210/endo.135.6.7988458
243. Cerani A, Tetreault N, Menard C, et al. Neuron-derived semaphorin 3A is an early inducer of vascular permeability in diabetic retinopathy via neuropilin-1. *Cell Metab*. 2013;18(4):505-518. doi:10.1016/j.cmet.2013.09.003
244. Xu Q, Qaum T, Adamis AP. Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(3):789-794.
245. Radu M, Chernoff J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*. 2013;(73):e50062. doi:10.3791/50062
246. Friedl J, Puhlmann M, Bartlett DL, et al. Induction of permeability across endothelial cell monolayers by tumor necrosis factor (TNF) occurs via a tissue factor-dependent mechanism: relationship between the procoagulant and permeability effects of TNF. *Blood*. 2002;100(4):1334-1339.

247. Dunn KW, Kamocka MM, McDonald JH. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *Am J Physiol, Cell Physiol.* 2011;300(4):C723-742. doi:10.1152/ajpcell.00462.2010
248. Warren CM, Ziyad S, Briot A, Der A, Iruela-Arispe ML. A ligand-independent VEGFR2 signaling pathway limits angiogenic responses in diabetes. *Sci Signal.* 2014;7(307):ra1. doi:10.1126/scisignal.2004235
249. Wu KK, Huan Y. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol.* 2008;Chapter 5:Unit 5.47. doi:10.1002/0471141755.ph0547s40
250. Long L, Ormiston ML, Yang X, et al. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat Med.* 2015;21(7):777-785. doi:10.1038/nm.3877
251. Kim LA, D'Amore PA. A Brief History of Anti-VEGF for the Treatment of Ocular Angiogenesis. *Am J Pathol.* 2012;181(2):376-379. doi:10.1016/j.ajpath.2012.06.006
252. Anand-Apte B, Ebrahim Q, Cutler A, et al. Betacellulin induces increased retinal vascular permeability in mice. *PLoS ONE.* 2010;5(10):e13444. doi:10.1371/journal.pone.0013444
253. Hossain A, Heron D, Davenport I, et al. Protective effects of bestatin in the retina of streptozotocin-induced diabetic mice. *Exp Eye Res.* 2016;149:100-106. doi:10.1016/j.exer.2016.06.016
254. Murakami M, Simons M. Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr Opin Hematol.* 2008;15(3):215-220. doi:10.1097/MOH.0b013e3282f97d98
255. Chen C, Grzegorzewski KJ, Barash S, et al. An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotechnol.* 2003;21(3):294-301. doi:10.1038/nbt795
256. Boyer DS, Hopkins JJ, Sorof J, Ehrlich JS. Anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2013;4(6):151-169. doi:10.1177/2042018813512360

257. Campochiaro PA, Aiello LP, Rosenfeld PJ. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Agents in the Treatment of Retinal Disease: From Bench to Bedside. *Ophthalmology*. 2016;123(10S):S78-S88. doi:10.1016/j.ophtha.2016.04.056
258. Singer MA, Kermany DS, Waters J, Jansen ME, Tyler L. Diabetic macular edema: it is more than just VEGF. *F1000Res*. 2016;5. doi:10.12688/f1000research.8265.1
259. Zhang X, Zeng H, Bao S, Wang N, Gillies MC. Diabetic macular edema: new concepts in patho-physiology and treatment. *Cell Biosci*. 2014;4:27. doi:10.1186/2045-3701-4-27
260. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*. 1999;4(6):915-924.
261. Ito Y, Oike Y, Yasunaga K, et al. Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiopoietin-related protein 4. *Cancer Res*. 2003;63(20):6651-6657.
262. Sano H, Hosokawa K, Kidoya H, Takakura N. Negative regulation of VEGF-induced vascular leakage by blockade of angiotensin II type 1 receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(12):2673-2680. doi:10.1161/01.ATV.0000245821.77155.c3
263. Berrone E, Beltramo E, Solimine C, Ape AU, Porta M. Regulation of Intracellular Glucose and Polyol Pathway by Thiamine and Benfotiamine in Vascular Cells Cultured in High Glucose. *J Biol Chem*. 2006;281(14):9307-9313. doi:10.1074/jbc.M600418200
264. Giannotta M, Trani M, Dejana E. VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*. 2013;26(5):441-454. doi:10.1016/j.devcel.2013.08.020
265. Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*. 2011;437(2):169-183. doi:10.1042/BJ20110301
266. Das T, Aurora A, Chhablani J, et al. Evidence-based review of diabetic macular edema management: Consensus statement on Indian treatment guidelines. *Indian J Ophthalmol*. 2016;64(1):14-25. doi:10.4103/0301-4738.178142

267. Eliceiri BP, Puente XS, Hood JD, et al. Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin $\alpha\beta 5$ in vascular endothelial growth factor signaling. *J Cell Biol.* 2002;157(1):149-160. doi:10.1083/jcb.200109079
268. Gavard J. Endothelial permeability and VE-cadherin. *Cell Adh Migr.* 2014;8(2):158-164. doi:10.4161/cam.29026
269. Wessel F, Winderlich M, Holm M, et al. Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol.* 2014;15(3):223-230. doi:10.1038/ni.2824
270. Wu Z, Wang Z, Dai F, et al. Dephosphorylation of Y685-VE-Cadherin Involved in Pulmonary Microvascular Endothelial Barrier Injury Induced by Angiotensin II. *Mediators Inflamm.* 2016;2016:8696481. doi:10.1155/2016/8696481
271. Claesson-Welsh L. Vascular permeability—the essentials. *Upsala Journal of Medical Sciences.* 2015;120(3):135-143. doi:10.3109/03009734.2015.1064501
272. Takeda M, Mori F, Yoshida A, et al. Constitutive nitric oxide synthase is associated with retinal vascular permeability in early diabetic rats. *Diabetologia.* 2001;44(8):1043-1050. doi:10.1007/s001250100588
273. Todorich B, Thanos A, Yonekawa Y, et al. Simultaneous dexamethasone intravitreal implant and anti-VEGF therapy for neovascular age-related macular degeneration resistant to anti-VEGF monotherapy. *J Vitreoretin Dis.* 2017;1(1):65-74. doi:10.1177/2474126416683299
274. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews.* 2005;57(2):173-185. doi:10.1124/pr.57.2.4
275. Wang YL, Hui YN, Guo B, Ma JX. Strengthening tight junctions of retinal microvascular endothelial cells by pericytes under normoxia and hypoxia involving angiopoietin-1 signal way. *Eye (Lond).* 2007;21(12):1501-1510. doi:10.1038/sj.eye.6702716
276. Dang L, Seale JP, Qu X. High glucose-induced human umbilical vein endothelial cell hyperpermeability is dependent on protein kinase C activation and independent of the Ca^{2+} -nitric

oxide signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005;32(9):771-776. doi:10.1111/j.1440-1681.2005.04266.x

277. Hempel A, Maasch C, Heintze U, et al. High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ Res*. 1997;81(3):363-371.

278. Creager Mark A., Lüscher Thomas F., null null, Cosentino Francesco, Beckman Joshua A. Diabetes and Vascular Disease. *Circulation*. 2003;108(12):1527-1532. doi:10.1161/01.CIR.0000091257.27563.32

279. Rechtman E, Harris A, Garzosi HJ, Ciulla TA. Pharmacologic therapies for diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol*. 2007;1(4):383-391.

280. Bhagat N, Grigorian RA, Tutela A, Zarbin MA. Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment. *Surv Ophthalmol*. 2009;54(1):1-32. doi:10.1016/j.survophthal.2008.10.001

281. Updates in the Management of Diabetic Macular Edema. <https://www.hindawi.com/journals/jdr/2015/794036/>. Accessed June 18, 2019.

282. Gao B-B, Clermont A, Rook S, et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med*. 2007;13(2):181-188. doi:10.1038/nm1534

283. Miloudi K, Binet F, Wilson A, et al. Truncated netrin-1 contributes to pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. *J Clin Invest*. 126(8):3006-3022. doi:10.1172/JCI84767

284. Garcia-Ramírez M, Hernández C, Ruiz-Meana M, et al. Erythropoietin protects retinal pigment epithelial cells against the increase of permeability induced by diabetic conditions: essential role of JAK2/ PI3K signaling. *Cell Signal*. 2011;23(10):1596-1602. doi:10.1016/j.cellsig.2011.05.011

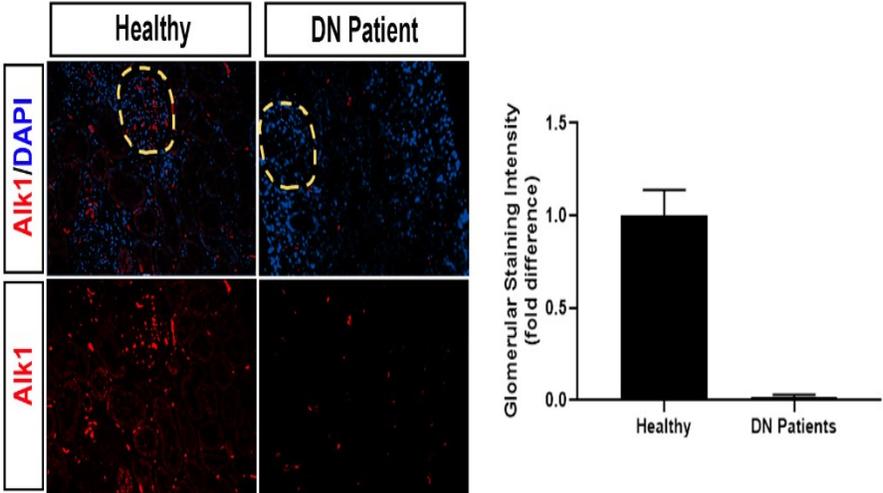
285. Erythropoietin Is Expressed in the Human Retina and It Is Highly Elevated in the Vitreous Fluid of Patients With Diabetic Macular Edema | Diabetes Care. <https://care.diabetesjournals.org/content/29/9/2028>. Accessed June 18, 2019.

286. Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest*. 2005;128(6 Suppl):585S-590S. doi:10.1378/chest.128.6_suppl.585S
287. Ola R, Dubrac A, Han J, et al. PI3 kinase inhibition improves vascular malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nat Commun*. 2016;7:13650. doi:10.1038/ncomms13650
288. Ricard N, Ciais D, Levet S, et al. BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*. 2012;119(25):6162-6171. doi:10.1182/blood-2012-01-407593
289. Shao ES, Lin L, Yao Y, Bostrom KI. Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. *Blood*. 2009;114(10):2197-2206. doi:10.1182/blood-2009-01-199166
290. Toporsian Mourad, Gros Robert, Kabir Mohammed G., et al. A Role for Endoglin in Coupling eNOS Activity and Regulating Vascular Tone Revealed in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Circulation Research*. 2005;96(6):684-692. doi:10.1161/01.RES.0000159936.38601.22
291. Rudini N, Felici A, Giampietro C, et al. VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J*. 2008;27(7):993-1004. doi:10.1038/emboj.2008.46
292. Satirtav G, Oltulu R, Kerimoglu H. Current evidence of pathophysiology of diabetic macular edema: A review. *World Journal of Ophthalmology*. 2014;4(4):147-151. doi:10.5318/wjo.v4.i4.147
293. Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, Lieth E, Tarbell JM, Gardner TW. 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*. 1998;47(12):1953-1959. doi:10.2337/diabetes.47.12.1953
294. Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW. Altered Expression of Retinal Occludin and Glial Fibrillary Acidic Protein in Experimental Diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(11):3561-3568. <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2123137>. Accessed June 18, 2019.

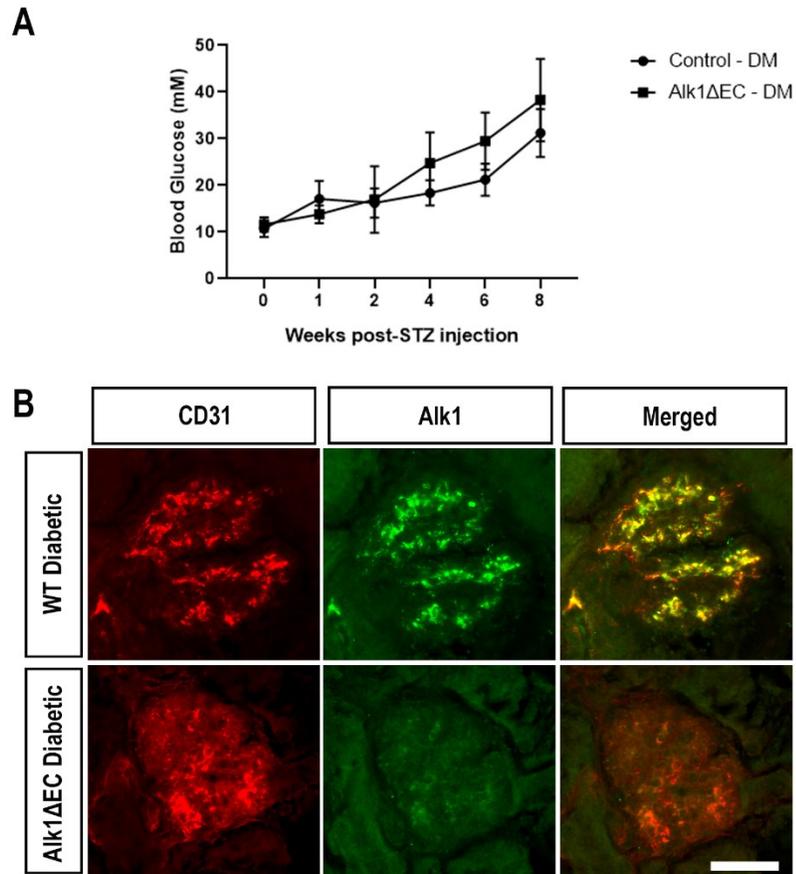
295. Navaratna D, McGuire PG, Menicucci G, Das A. Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes*. 2007;56(9):2380-2387. doi:10.2337/db06-1694
296. Weis S, Shintani S, Weber A, et al. Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2004;113(6):885-894. doi:10.1172/JCI200420702
297. Riehl A, Németh J, Angel P, Hess J. The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell Commun Signal*. 2009;7:12. doi:10.1186/1478-811X-7-12
298. Portero-Otín M, Pamplona R, Bellmunt MJ, et al. Advanced glycation end product precursors impair epidermal growth factor receptor signaling. *Diabetes*. 2002;51(5):1535-1542. doi:10.2337/diabetes.51.5.1535
299. Garrido-Martin EM, Blanco FJ, Fernandez-L A, et al. Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. *BMC Molecular Biology*. 2010;11(1):51. doi:10.1186/1471-2199-11-51
300. Clark RJ, McDonough PM, Swanson E, et al. Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem*. 2003;278(45):44230-44237. doi:10.1074/jbc.M303810200

Annexes

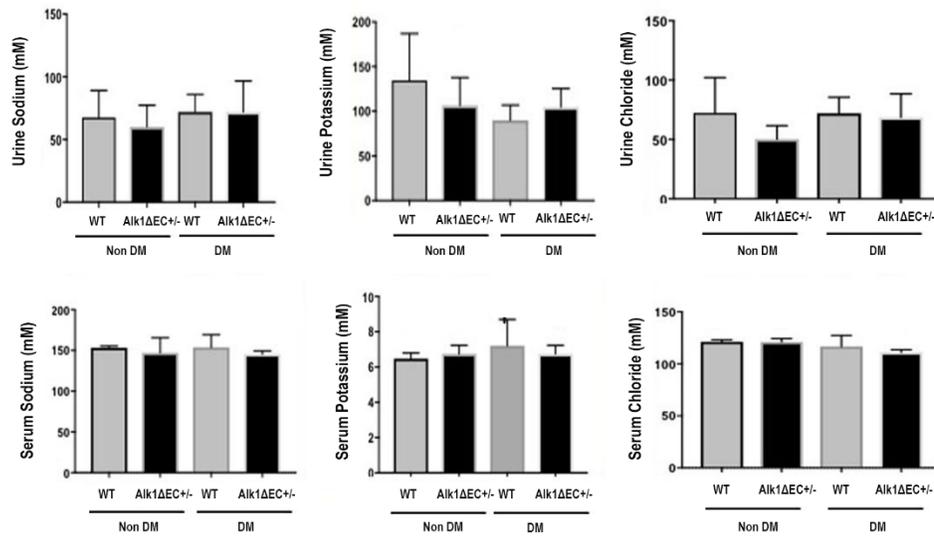
Donnes supplémentaires 1er article



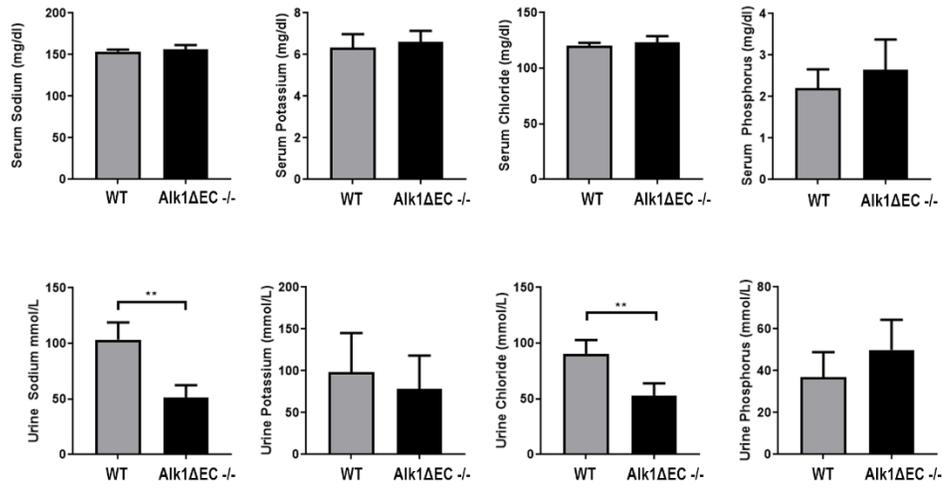
Supplementary Figure 6.1. Glomerular expression of Alk1 in control and diabetic nephropathy patients. Quantification was performed by assessing glomerular staining intensity for Alk1 of tissue samples from 2 healthy and 7 diabetic nephropathy patients.



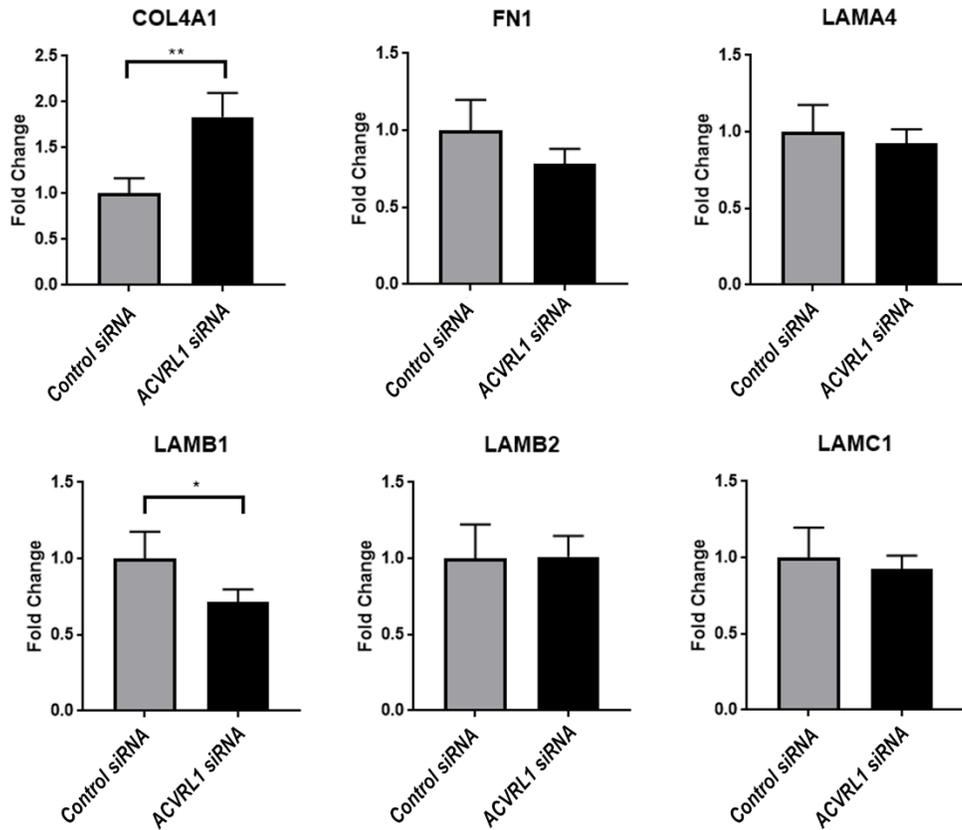
Supplementary Figure 6. 2. Characterization of Alk1ΔEC^{+/-} diabetic mice. A) Monitoring of blood glucose levels in wild type and Alk1ΔEC^{+/-} mice following STZ injections. B) Expression of Alk1 in diabetic wild type or Alk1ΔEC^{+/-} mice eight weeks following STZ injections. (n=8 mice/group). Scale bar: 25μm.



Supplementary Figure 6. 3. Analysis of electrolytes in non-diabetic and diabetic wild type and Alk1ΔEC+/- mice eight weeks following STZ injections. (n=8 mice/group).

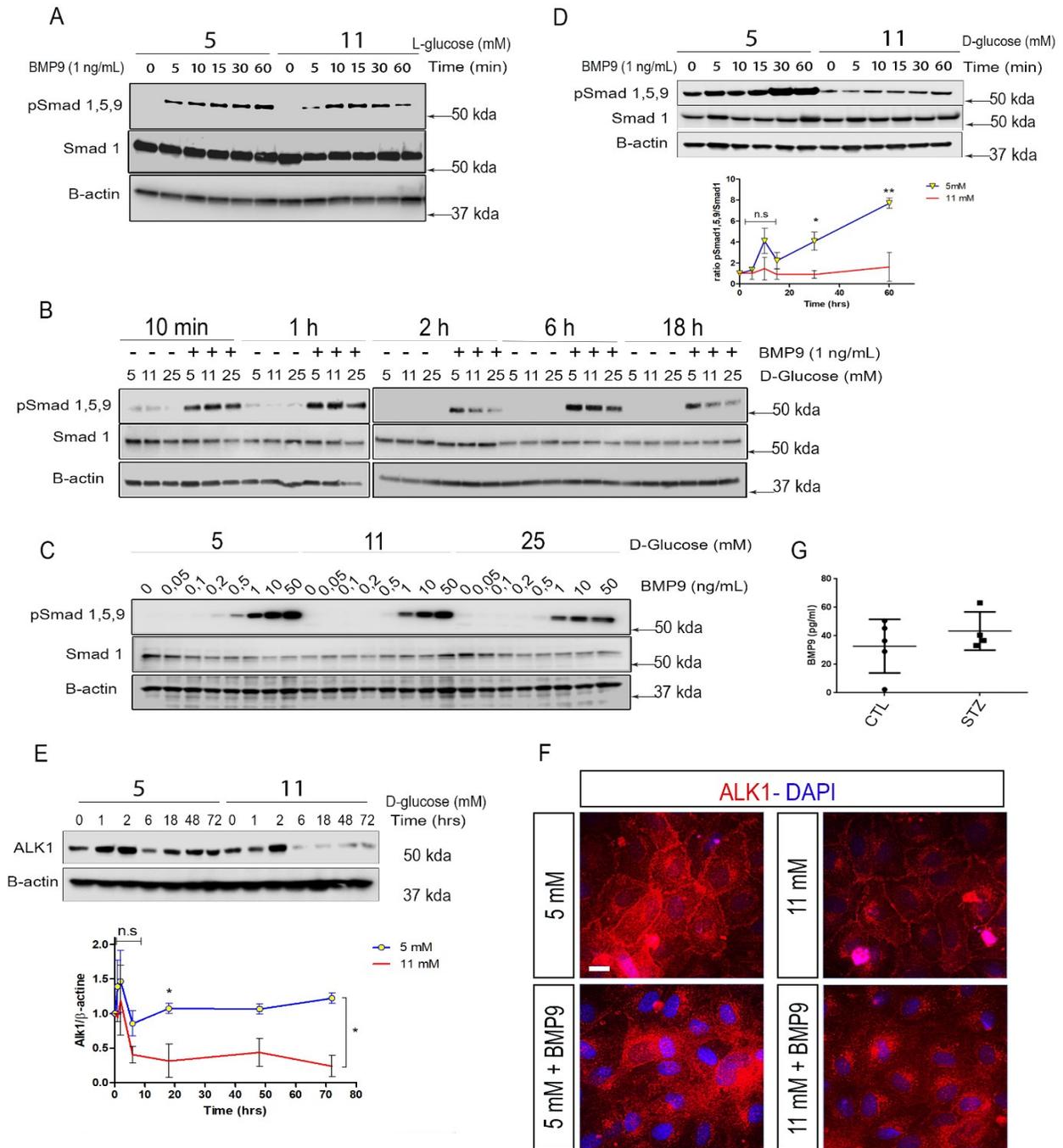


Supplementary Figure 6.4. Analysis of electrolytes in wild type and Alk1ΔEC-/- seven days after tamoxifen delivery. (n=6 mice/group). **p<0.01.



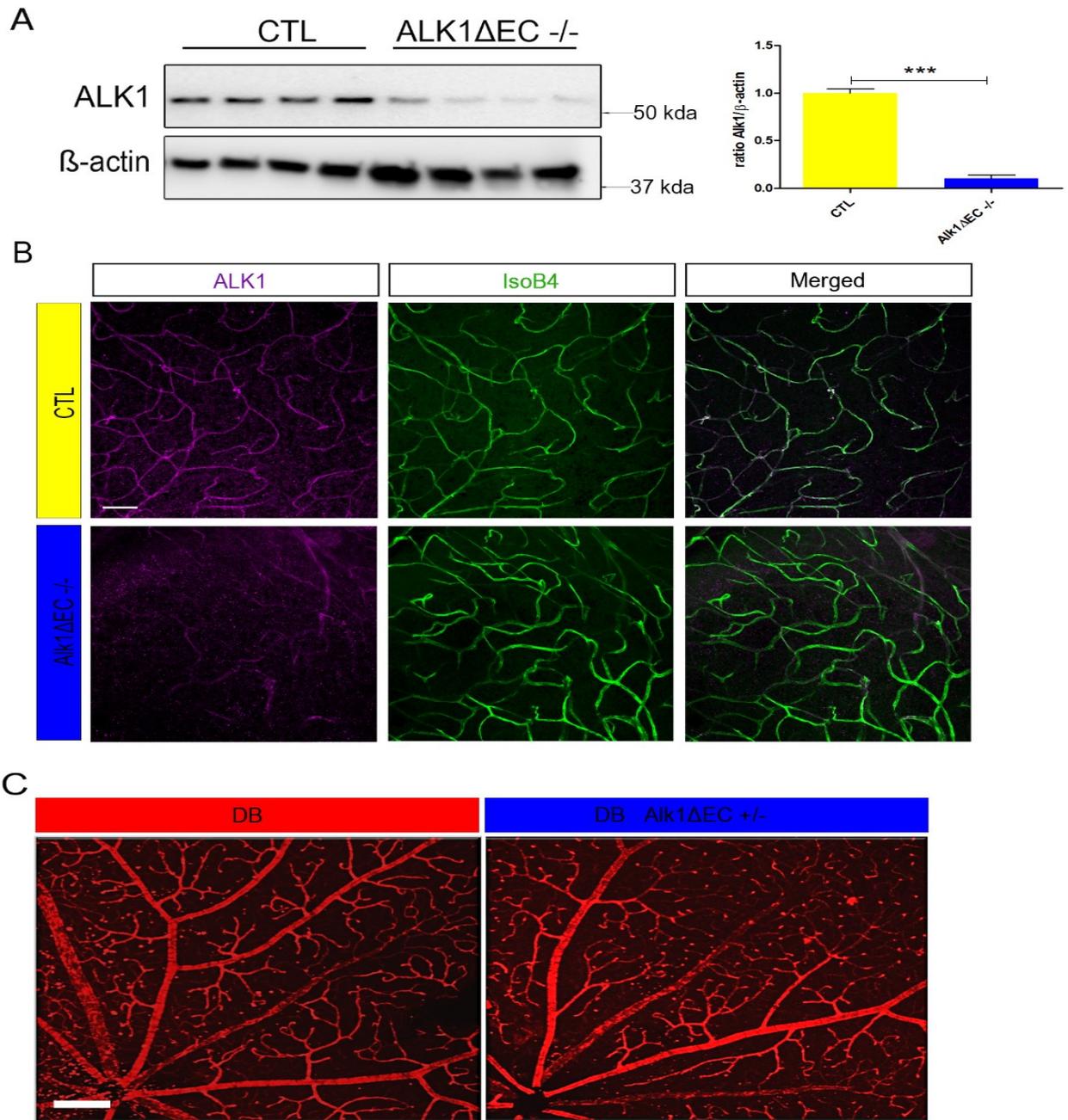
Supplementary Figure 6. 5. Effect of Alk1 suppression on the expression of basement membrane genes. Human Umbilical Endothelial Cells (HUVEC) were transfected with scrambled or acvrl1 siRNA. mRNA was harvested 48 hours after transfection and processed for quantitative PCR analysis for type IV collagen, fibronectin, laminin alpha4, laminin beta1, laminin beta2 and laminin gamma1. n=4 experiments done in triplicates. *p<0.05, ** p<0.01.

Donnes supplémentaires 2eme article

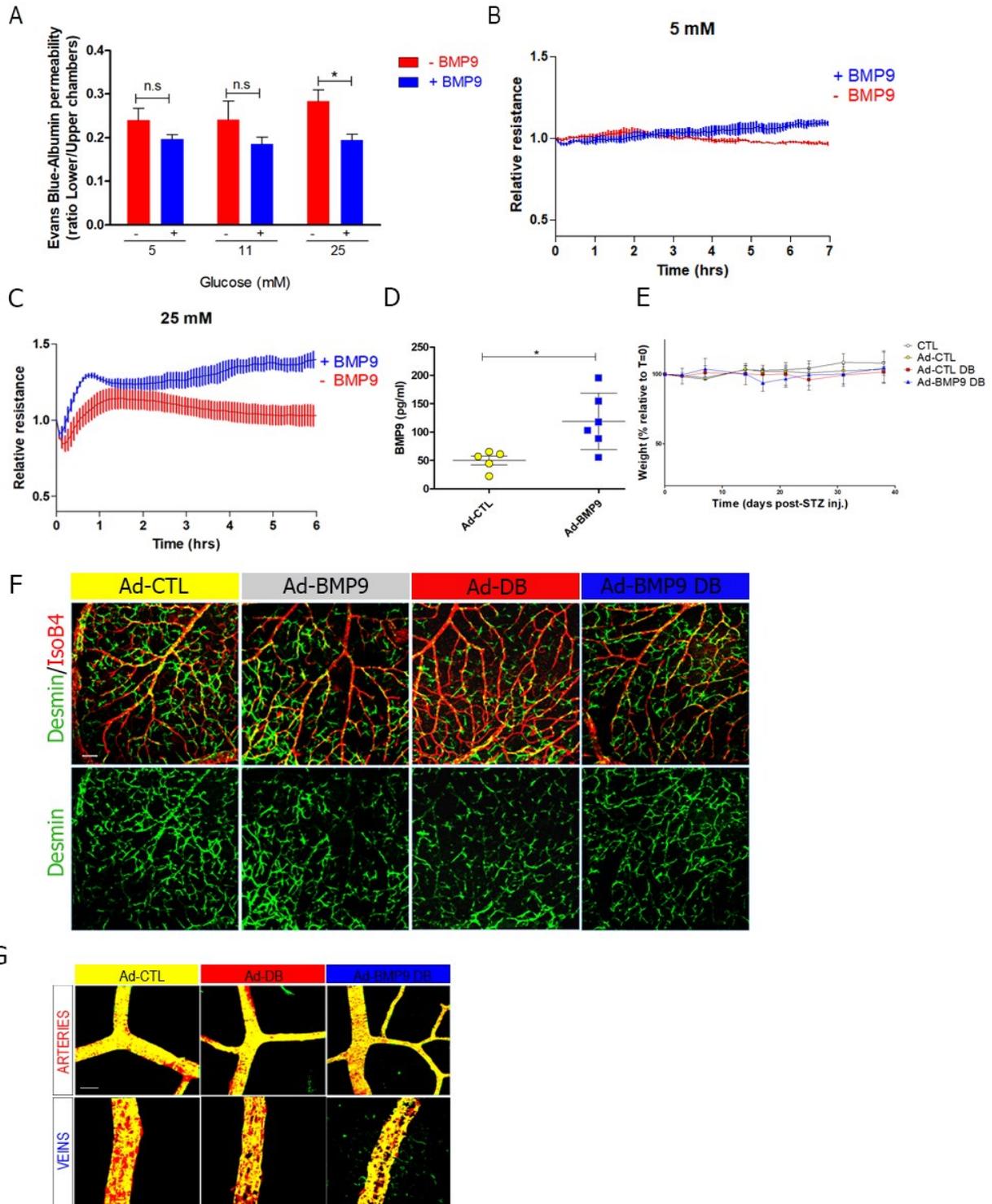


Supplementary Figure 8.1. BMP9 signaling in hyperglycemic conditions. (A) Time course of Smad1,5,9 phosphorylation in response to BMP9 (1 ng/mL for up to 60 min) in HUVECs after being conditioned to different doses of non-metabolizable L-Glucose for 18hrs. (B) Immunoblotting analysis of Smad1,5,9 phosphorylation in response to BMP9 (1 ng/mL) stimulation in HUVECs pre-treated with D-Glucose (5, 11, 25 mM) for different times (1

to 18 hours) in basal media containing 0,5% FBS. (C) BMP9 dose-response in HUVECs pre-treated with 5, 11 or 25 mM D-glucose. Phosphorylated Smad1,5,9, total Smad1 antibody and β -actin levels were detected by immunoblotting. (D) HRMECs were exposed to normoglycemia or hyperglycemia (5 and 11 mM D-glucose) for 18h before stimulation for up to 60min with BMP9 followed by immunoblotting for pSmad1,5,9, Smad 1 or β -actin. Representative blots are shown (upper panel) and bands were quantified by densitometry (lower panel). Total protein Smad1 and Internal β -actin reference antibody were used for normalizations and values are expressed as mean \pm SEM. Data represent the mean of three independent experiments. (E) Representative Western blot (upper panel) and densitometric analysis (lower panel) of Alk1 protein in HRMECs stimulated for up to 72 hours with 5 mM or 11 mM Dglucose. Quantification data was pooled from 3 independent analysis. (F) Alk1 immunofluorence staining (red) of HUVECs treated for 18 hours with 5 or 11mM glucose before stimulation with or without 1ng/ml BMP9, visualized by confocal microscopy. Cells were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 20 μ m. (G) BMP9 expression levels in control and diabetic STZ mouse plasma. BMP9 plasma levels were quantified with DuoSet ELISA mouse-BMP9 kit after 8 weeks of diabetes in STZ-injected mice (n=4) or from vehicleinjected control mice (n=5). Error bars show SEM. Differences between means where analyzed using unpaired t test. * p<0.05 **p<0.01 ***p<0.001.

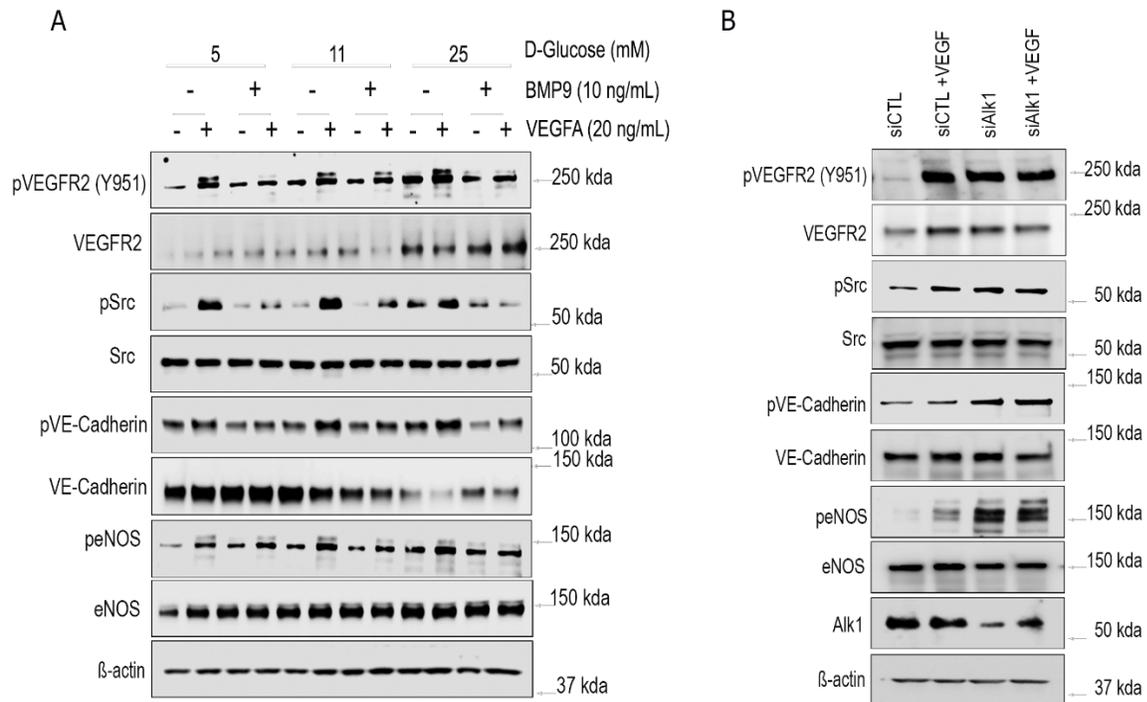


Supplementary Figure 8.2. Deletion of Alk1 in Alk1ΔEC mice. (A) Lungs were harvested from 8-week-old Alk1ΔEC mice injected for 5 consecutive days with tamoxifen. Protein extracts were subjected to Alk1 and β-actin immunoblotting and quantified by densitometry. Values are shown as mean±SEM. Control mice (N=4) and Alk1ΔEC (N=4). Differences between means were analyzed using unpaired t test. ***p<0.001. (B) Representative confocal images of Alk1 and IsoB4 immunofluorescent staining of retinas from control and Alk1ΔEC homozygote mice. Scale Bar: 50 μm. (C) IsoB4 staining of retinas from diabetic control or diabetic heterozygote Alk1ΔEC mice. Scale Bar: 100 μm. Representative of at least four individual mice.

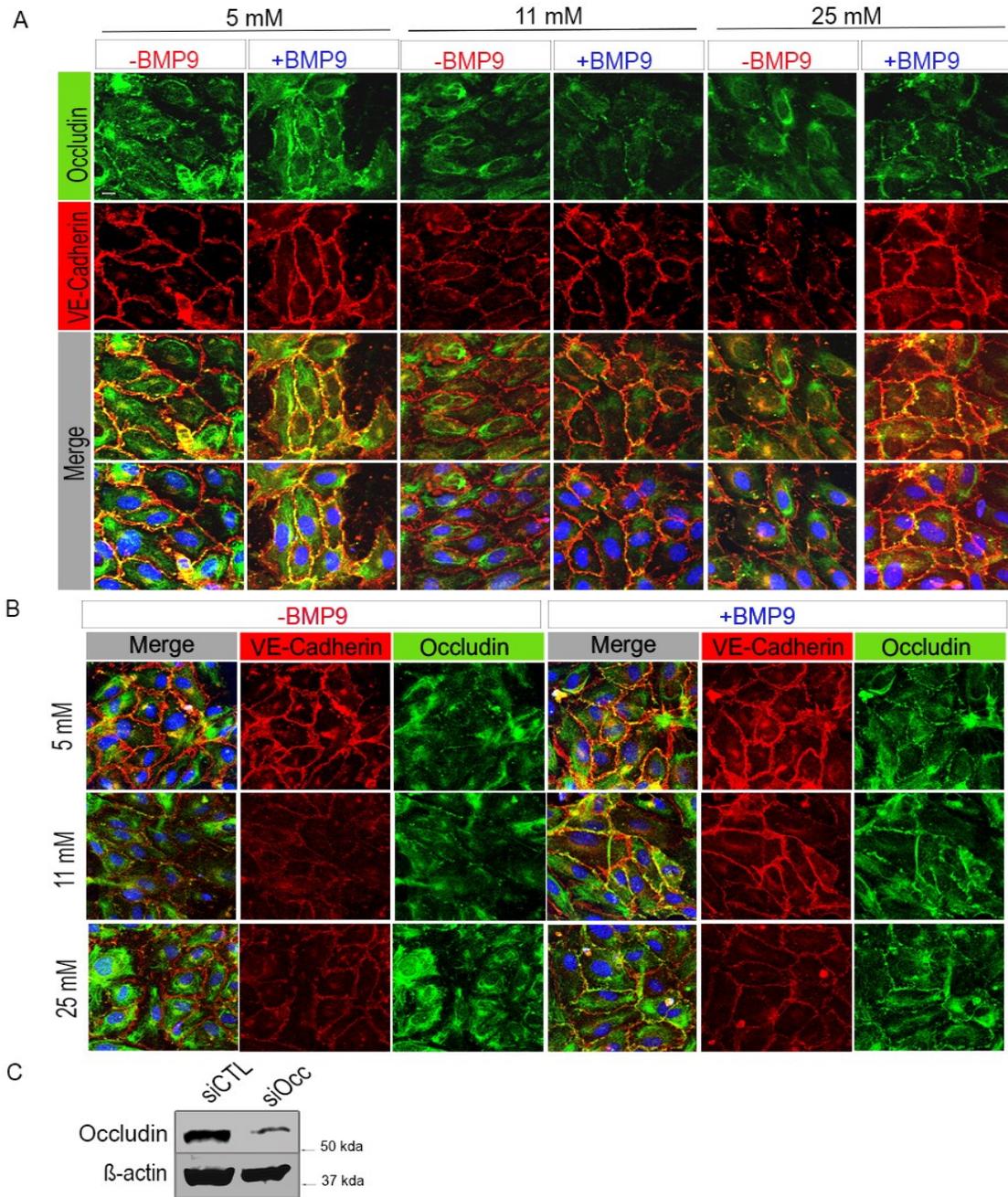


Supplementary Figure 8.3. Effects of BMP9 on vascular permeability. (A) HRMECs in transwell boyden chambers following 18 hrs exposition to hyperglycemia (11 and 25 mM) or normoglycemia (5 mM) with or w/o BMP9 (10 ng/mL) were tested for Evans-Blue bound Albumin permeability (deposited in the upperchamber for 90 min) and

quantification of the ratio lower/upper chambers was performed. Data were generated from 3 independent experiments. (B,C) Transendothelial resistance measured in real time in HRMECs treated with 5mM (B) or 25 mM (C) D-glucose by ECIS demonstrates that BMP9 prevents the reduction of endothelial barrier function triggered by hyperglycemia (C). Results represent the mean±SEM of 5 separate experiments. (D) ELISA of plasma concentrations levels of adeno-delivered BMP9 (or empty vector (control) in mice 8 weeks post STZ injections. Values are expressed as mean±SEM. (E) Mice weight measurement throughout 40 days period shown as percent variation from initial weights before STZ injections. Values are expressed as mean±SEM. (F) Retinal flatmounts stained with IsoB4 (ECs; Red) or Desmin (pericytes; green). Scale bar 60 µm. (G) Retinal flatmounts stained with IsoB4 (ECs; Red) or smooth muscle actin (SMA) (smooth muscle cells; green). Scale bar 30 µm. Differences between means were analyzed using a t test (A, D), *p<0.05 and One-Way ANOVA with Tukeys MCT (E).

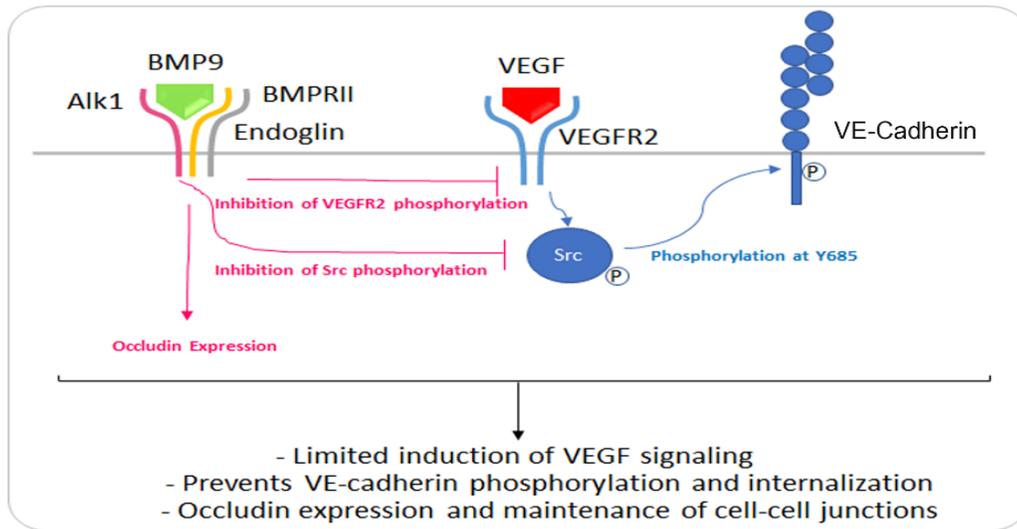


Supplementary Figure 8.4. BMP9 inhibits VEGF signaling in HRMECs. (A) Immunoblotting of HRMECs stimulated with VEGF following pre-treatment with D-glucose (5, 11, 25 mM) and or BMP9 with specific antibodies directed against VEGF pathway signaling or permeability proteins. (Representative of 2 experiments). (B) HRMECs transfected with control or Alk1 siRNA (25 pmol/well) (left panel) were stimulated with or w/o VEGF (20 ng/mL) (N= 2 experiments) and were processed for immunoblotting with antibodies of signaling molecules involved in vascular permeability.

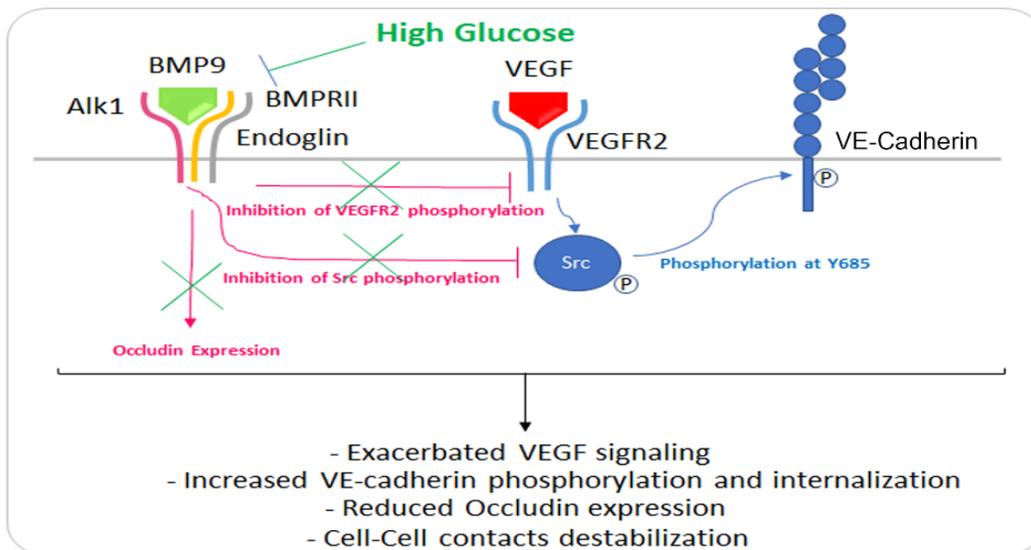


Supplementary Figure 8.5. Effect of BMP9 on endothelial junctions. (A) HUVECs were exposed to 5, 11 or 25 mM D-glucose before being treated with or without BMP9 (10 ng/mL) for 18hrs, processed for immunofluorescence and imaged by confocal microscopy using antibodies against VE-cadherin (red) and Occludin (green). (B) Unprocessed images of the panels shown in fig. 5D. Scale bars 10 μ m. (C) HUVECs transfected with SiRNA control or occludin siRNA were processed for Occludin immunoblotting (48 hrs post-transfection).

Normoglycemia



Hyperglycemia



Supplementary Figure 8.6. Graphic description of the main findings of the study. In a healthy mature retina, Alk1 is expressed in the endothelium, where it contributes to vascular integrity by restricting VEGF signaling and maintaining occludin expression. In hyperglycemic retinal endothelial cells, Alk1 signaling is impaired, leading to reduced occludin expression and exacerbated VEGF signaling, loosening endothelial cell junctions and vascular permeability.