

Université de Montréal

**La signalisation BMP9 maintient l'intégrité endothéliale et  
prévient la perméabilité vasculaire rétinienne  
hyperglycémique**

Par

Naoufal Akla

Département de Biochimie et médecine moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine  
en vue de l'obtention du grade de Philosophia Doctor (Ph.D.) en Biochimie

Avril, 2019

© Naoufal Akla, 2019

Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

**La signalisation BMP9 maintient l'intégrité endothéliale  
et prévient la perméabilité vasculaire rétinienne hyperglycémique**

Présentée par :  
Naoufal Akla

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Luis Rokeach, Président-rapporteur  
Dr Bruno Larrivée, Directeur de recherche  
Dr Przemyslaw Sapieha, Co-directeur  
Dr Alain Rivard, Membre du jury  
Dr Patrick Rochette, Examineur externe  
Dr Eric Milot, Représentant de la doyenne de la FES

## Résumé

Un endothélium vasculaire rétinien quiescent est essentiel dans l'approvisionnement et le maintien de l'homéostasie tissulaire afin d'assurer la fonction visuelle. L'hyperglycémie chronique dans le diabète peut mener à des complications reliées à plusieurs changements structuraux et fonctionnels de l'endothélium. Ces changements se manifestent souvent par des vaisseaux instables et hyperperméables, résultant en un tissu rétinien inadéquatement perfusé. Ces altérations sont rencontrées dans la pathophysiologie de l'œdème maculaire diabétique (OMD) qui affecte plus du quart des diabétiques. L'inhibition du facteur de perméabilité vasculaire VEGF-A a révolutionné le traitement de l'OMD, mais est aussi associée à des effets secondaires non négligeables reliés à leur non-spécificité et à une compréhension incomplète des mécanismes régulant la perméabilité vasculaire. Un ciblage spécifique de l'endothélium permettant la récupération de la quiescence et la stabilité physiologique réduisant l'hyperperméabilité pourrait fournir un nouvel outil thérapeutique. La BMP9 (*Bone morphogenetic protein 9*), qui est mise en circulation par le foie, est connue comme facteur de quiescence et de stabilité vasculaire ainsi que pour son effet sur l'homéostasie du glucose. Ces aspects étant peu documentés dans un contexte diabétique, nous avons évalué les capacités de la BMP9 sur la stabilisation de l'endothélium rétinien et ses effets paracrines/autocrines sur la gluconéogenèse hépatique. Nous avons démontré que la signalisation canonique de la BMP9/Smad1,5,9 via son récepteur spécifique à l'endothélium Alk1, était déficiente dans un modèle murin de diabète, ce qui exacerbe l'hyperperméabilité endothéliale rétinienne. À l'inverse, la surexpression de la BMP9 par un modèle murin de livraison adénovirale récupère la perméabilité physiologique, associée principalement à un renforcement des jonctions interendothéliales en limitant l'action du VEGF. De plus, nous avons trouvé que la BMP9 améliore le contrôle glycémique chez les souris diabétiques par l'inhibition de la gluconéogenèse hépatique, via la voie non-canonique Alk3/FOXO1. Fondamentalement, ce travail met en évidence les mécanismes régissant la perméabilité endothéliale dans un contexte diabétique, fournissant une alternative thérapeutique contre l'OMD. La régulation de la perméabilité rétinienne par la BMP9 s'effectue à plusieurs niveaux, indirectement par le contrôle glycémique, et directement par la solidification jonctionnelle de la barrière endothéliale rétinienne, réhabilitant ainsi la quiescence et la stabilité de l'endothélium physiologique.

**Mots-clés :** Diabète, hyperglycémie, perméabilité vasculaire, jonctions, œdème maculaire, BMP9, VEGF

## Abstract

A quiescent retinal vascular endothelium is essential for the supply and maintenance of tissue homeostasis to ensure proper visual function. Chronic hyperglycemia in diabetes can lead to multiple complications related to several structural and functional changes in the endothelium, characterized by unstable and hyperpermeable vessels resulting in an inadequately perfused retinal tissue. These alterations are encountered in the pathophysiology of diabetic macular edema (DME), which affects more than a quarter of diabetics. Inhibition of the vascular permeability factor VEGF-A has revolutionized the treatments of DME but is associated with non-negligible side effects related to their non-specific action combined with an incomplete understanding of the mechanisms regulating vascular permeability. Specific endothelial targeting aiming to recover quiescence and reducing hyperpermeability could provide new therapeutic tools for the treatment or prevention of DME. BMP9 (Bone morphogenetic protein 9), which is produced by the liver, is known as a vascular quiescence and stability factor as well as for its effects on glucose homeostasis. Since these aspects are poorly documented in a diabetic context, we investigated BMP9's capabilities on endothelium stabilization and its paracrine/autocrine effects on hepatic gluconeogenesis. In our studies, we found that the canonical BMP9/Smad1,5,9 signaling, via its physiological Alk1 endothelium-specific receptor, was deficient in a murine model of diabetes, which exacerbates retinal endothelial hyperpermeability. In contrast, adenoviral overexpression of BMP9 recovers physiological permeability, which was primarily associated with the enhancement of interendothelial junctions by limiting the action of VEGF. In addition, we found that BMP9 improves glycemic control in diabetic mice by inhibition of hepatic gluconeogenesis via the non-canonical ALK3/FOXO1 pathway. Fundamentally, this work highlights new insights of the mechanisms governing endothelial permeability in a diabetic context, providing a therapeutic alternative against DME. Regulation of retinal permeability by BMP9 occurs on several levels, indirectly, through glycemic control, and directly through the junctional solidification of the hyperglycemic retinal endothelial barrier, thus rehabilitating the quiescence and stability of the physiological endothelium.

**Keywords:** Diabetes, hyperglycemia, vascular permeability, junctions, macular edema, BMP9, VEGF



# Table des matières

Résumé.....	i
Abstract .....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des figures.. .....	vii
Liste des abréviation .....	viii
Remerciements .....	xiii
<b>Chapitre I : Introduction .....</b>	<b>14</b>
1.1 L'œil comme organe sensible.....	15
1.1.1 Circulation sanguine oculaire.....	17
1.1.2 Les barrières oculaires et hémato-rétiniennes.....	19
1.2 Le diabète.....	20
1.2.1 Types de diabète.....	21
1.2.2 Un désordre métabolique hétérogène affectant les vaisseaux sanguins.....	21
1.2.3 Régulation physiologique du glucose.....	22
1.2.4 Rôle de la gluconéogenèse hépatique dans l'hyperglycémie.....	24
1.2.4.1 Les enzymes gluconéogéniques.....	24
1.2.4.2 Régulation hormonale des enzymes gluconéogéniques.....	26
1.2.5 Régulation thérapeutique de l'hyperglycémie chronique.....	27
1.2.6 Hyperglycémie et dysfonctions de l'endothélium vasculaire.....	28
1.2.7 La rétinopathie diabétique.....	30
1.2.7.1 Stade non prolifératif des vaisseaux.....	30
1.2.7.2 Stade prolifératif et néovascularisation rétinienne.....	32
1.2.8 L'œdème maculaire diabétique (OMD).....	32
1.2.8.1 Épidémiologie de l'OMD.....	32
1.2.8.2 Types d'œdèmes maculaires diabétiques.....	33
1.3 Pathophysiologie de l'OMD.....	34
1.3.1 Types d'accumulations de fluides rétiniens.....	34
1.3.2 L'œdème cytotoxique intracellulaire.....	34
1.3.3 L'œdème vasogénique extracellulaire.....	35

1.4 Fonctions de la barrière hémato-rétinienne interne iBHR.....	36
1.4.1 Composantes et fonctions de l'unité neurovasculaire de l'iBHR.....	36
1.4.2 Les cellules endothéliales de l'iBHR.....	37
1.4.3 La perméabilité de l'endothélium de l'iBHR.....	37
1.4.3.1 Structure et fonctions des jonctions étanches.....	39
1.4.3.2 Structure et fonctions des jonctions d'ancrage.....	42
1.4.4 Les membranes basales.....	44
1.4.5 Les cellules murales.....	44
1.4.6 Les cellules gliales et autres cellules de l'unité neurovasculaire.....	45
1.5 Dégradation de l'iBHR et l'hyperperméabilité.....	46
1.5.1 Altérations biochimiques causées par l'hyperglycémie contribuant à l'OMD.....	46
1.5.2 Médiateurs de l'hyperperméabilité de l'iBHR hyperglycémique.....	47
1.5.3 Mécanismes majeurs menant à l'hyperperméabilité.....	49
1.5.4 Altérations des jonctions dans l'hyperperméabilité de l'iBHR.....	49
1.5.4.1 Altérations des jonctions étanches occludines.....	49
1.5.4.2 Altérations des jonctions d'ancrage VE-cadhérines.....	51
1.5.4.3 Altérations des composantes vasculaires.....	54
1.6 Facteurs protecteurs et traitements de l'OMD.....	56
1.6.1 Facteurs protecteurs endogènes.....	56
1.6.2 Facteurs protecteurs thérapeutique : les anti-VEGF.....	56
1.7 La signalisation BMP9/Alk1 protectrice des vaisseaux.....	59
1.7.1 Structure et fonction du ligand BMP9.....	61
1.7.2 Structure du récepteur de type I Alk1.....	62
1.7.3 Structures des récepteurs de type II et III.....	63
1.7.4 Expression physiopathologique d'Alk1 dans l'endothélium.....	64
1.7.5 Spécificité d'action de la voie BMP9/Alk1 dans l'endothélium.....	64
1.7.6 Intégration fonctionnelle du signal BMP9/Alk1 dans l'endothélium.....	65
1.7.6.1 Signalisation canonique de quiescence Smad1,5,9.....	65
1.7.6.2 Perte de fonction de la signalisation Alk1 dans l'endothélium.....	66

1.8 Potentiel de l'activation de la signalisation BMP9/Alk1 .....	69
1.8.1 Effets cellulaires endothéliaux de l'activation BMP9/Alk1 .....	69
1.8.1.1 Effet vasculaire de l'activation TGF $\beta$ /Alk1 et Alk5 .....	70
1.8.2 Potentiel thérapeutique de la voie Alk1/BMP9 .....	72
1.8.3 Signalisation BMP9/Alk1 non canonique .....	73
1.8.3.1 Communication de la voie Alk1 avec la voie de quiescence Notch .....	73
1.8.3.2 Intercommunication avec la voie PI3K/AKT dans le foie .....	74
1.8.3.2.1 La BMP9 dans l'homéostasie du glucose .....	76
1.9 Hypothèses et objectifs de la recherche .....	78
1.9.1 Premier article .....	80
1.9.2 Deuxième article .....	81
<b>Chapitre II : Premier article .....</b>	<b>82</b>
2.1 Abstract .....	84
2.2 Introduction .....	85
2.3 Materials and methods .....	87
2.4 Results .....	92
2.5 Discussion .....	101
2.6 Conclusion .....	104
2.7 Figures Article 1 .....	106
2.8 Supplementary Data Article 1 .....	115
2.9 References .....	124
<b>Chapitre III : Deuxième article .....</b>	<b>132</b>
3.1 Abstract .....	134
3.2 Introduction .....	135
3.3 Materials and methods .....	137
3.4 Results .....	141
3.5 Discussion .....	148
3.6 Conclusion .....	151
3.7 Figures Article 2 .....	152
3.8 Supplementary Data Article 2 .....	161
3.9 References .....	163

<b>Chapitre IV : Discussion .....</b>	<b>168</b>
4.1 Sommaire des résultats.....	169
4.1.1 Effet de l'hyperglycémie sur les jonctions et la perméabilité endothéliale.....	169
4.1.2 Perte de fonction de la voie Alk1 en hyperglycémie.....	171
4.1.3 Effet restaurateur sur l'endothélium par l'activation de la voie BMP9/Alk1.....	175
4.1.4 Effet restaurateur de la glycémie par l'activation de la voie BMP9/Alk3.....	177
4.1.5 Principales limitations expérimentales.....	185
4.2 Perspectives.....	187
<b>Conclusion.....</b>	<b>192</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>193</b>

## Liste des figures

Figure 1.1 : Parcours de la lumière dans les structures de l'œil.....	17
Figure 1.2 : Circulation sanguine oculaire et rétinienne.....	18
Figure 1.3 : Barrières hémato-rétiniennes.....	19
Figure 1.4 : Régulation du glucose plasmatique dans un système bi-hormonales.....	23
Figure 1.5 : Illustration schématisée des voies métaboliques hépatiques.....	25
Figure 1.6 : Les altérations métaboliques associées aux altérations des fonctions vasculaires diabétiques.....	29
Figure 1.7. Schéma simplifié des bases moléculaires du processus angiogénique par bourgeonnement.....	31
Figure 1.8 : L'unité neurovasculaire de la iBHR.....	36
Figure 1.9 : Principaux complexes de jonction contrôlant la perméabilité de la BHR.....	39
Figure 1.10 : Altérations biochimiques en hyperglycémie altérant la iBHR menant à l'hyperperméabilité dans l'OMD.....	47
Figure 1.11 : Principales voies modulant le désassemblage des VE-cadhérines aux jonctions interendothéliales.....	54
Figure 1.12 : Mécanismes d'action de la protéine morphogénétique osseuse 9 (BMP9).....	60
Figure 2.1 : Hyperglycemia inhibits BMP9/Alk1/Smad1,5,9 signaling In vivo and In vitro in endothelial cells.....	106
Figure 2.2 : Endothelial-specific loss of Alk1 exacerbates retinal permeability.....	106
Figure 2.3 : BMP9 prevents vascular permeability in the hyperglycemic endothelium.....	109
Figure 2.4 : BMP9/ALK1 inhibits VEGF-induced permeability via inhibition of VEGF signalling in endothelial cells.....	111
Figure 2.5 : BMP9/ALK1 activation stabilizes levels and membrane colocalization of VE-cadherin and Occludin in hyperglycemic cultured ECs.....	113
Figure S2.1 : BMP9 signaling in hyperglycemic conditions.....	115
Figure S2.2: Deletion of Alk1 in Alk1 $\Delta$ EC mice.....	117
Figure S2.3: Effects of BMP9 on vascular permeability.....	118
Figure S2.4: BMP9 inhibits VEGF signaling in HRMECs.....	120
Figure S2.5: Effect of BMP9 on endothelial junctions.....	121
Figure S2.6: Graphic depiction of the main findings of the study.....	123
Figure 3.1 : BMP9 overexpression improves glucose tolerance in fasted mice.....	152
Figure 3.2 : BMP9 regulates liver gluconeogenesis in mice.....	154
Figure 3.3 : BMP9 overexpression decreases hepatic glycogen content and is associated with increased glucagon productions.....	155
Figure 3.4 : BMP9 expression improves glycemic control in diabetic mice.....	156
Figure 3.5 : BMP9 regulates expression of gluconeogenic enzymes and FOXO1 protein levels in vivo.....	157
Figure 3.6 : BMP9 expression affects key regulatory hormones and metabolites in diabetic mice.....	158
Figure 3.7 : BMP9 signaling and inhibition of gluconeogenic enzymes in hepatic cells is mediated by Alk3.....	159
Figure S3.1: Supplementary Data Article 2.....	161
Figure 4.1 : La perte de la signalisation Alk1 dans le diabète exacerbe la signalisation VEGFR2/Src et l'hyperperméabilité rétinienne.....	172
Figure 4.2 : Signalisation BMP9/Alk1 limitant la signalisation VEGF/VEGFR2 dans l'endothélium.....	176
Figure 4.3 : Signalisation BMP9/Alk3 inhibant la gluconéogenèse hépatique.....	181

## Liste des abréviations

ActRIIA	Activin Receptor type II A
ActRIIB	Activin Receptor type II B
AGE	Advanced glycation end products
AKT	Protein kinase B
Alk	Activin receptor-like kinase
Alk1	Activin receptor-like kinase 1
Alk1 $\Delta$ EC	Alk1 endothelial cells specific deletion
Alk3	Activin receptor-like kinase 2
Alk1-fc	Extracellular Alk1-linked to Fc IgG1
Ang-2	Angiopoietin 2
ATP	Adenosine triphosphate
B1R	B1 bradykinin (BK) receptor
B2R	B2 bradykinin (BK) recteptor
BBB	Blood brain barrier
BHE	Barrière hématoencéphalique
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BHR	Barrière hémato-rétinienne
BK	Bradykinin
BMP	Bone morphogenetic protein
BMP9	Bone morphogenetic protein -1
BMP10	Bone morphogenetic protein -10
BMPRII	BMP Receptor type II
BRE	BMP response element
C3a	C3 activator fragment
C5a	C5 activator fragment
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CE	Cellule endothéliale
CERH	Cellules endotheliales rétiniennes humaines
CFN	Couche de fibres neuronales
CGL	Couche de cellules ganglionnaires
CNI	Couche nucléaire interne
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
Cox-2	Cyclo-oxygénase 2
CREB	cAMP response element-binding protein

CVML	Cellules vasculaires de muscle lisses
DCCT	Diabetes control and complications trials
Dll4	Delta-like 4 protein
eBHR	BHR externe
EC	Endothelial cell
Eng	Endogline
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
FAK	Focal adhesion kinase
FBPase	Fructose-1,6-biphosphatase
FLT-1	FMS-like tyrosine kinase
FLK-1	Fetal liver kinase 1
FOXO1	Forkhead box protein 01
G6Pase	Glucose-6-Phosphatase
GDF2	Growth and differentiation factor 2
GLUT	Glucose transporter
GLUT1	Glucose transporter 1
GS box	Glycine-Serine rich domain
HEY	Hairy/Enhancer of YRPW motif
HES	Hairy/Enhancer of Split motif
HG	Hyperglycémie
HIF-1	Hypoxia inducible factor-1
HMVEC	Human microvascular endothelial cells
HREC	Human retinal endothelial cells
HRMEC	Human retinal microvascular endothelial cells
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
iBHR	BHR interne
ICAM-1	Intracellular adhesion molecule 1
Id	Inhibitor of differentiation
IL-1	Interleukine 1
IL-12	Interleukine 12
IL-1 $\beta$	Interleukine 1 beta
IL-6	Interleukine 6
IL-8	Interleukine 8
MAPk	Mitogen-activated protein kinase

MAV	Malformations arterio-veineuses
MB	Membranes basales
MCP-1	Monocyte chemo-attracting protein 1
MMP	Matrix metalloproteinase
NFkB	Nuclear factor kappa Beta
NO	Nitric oxyde
ON	Over night
OMD	eodème maculaire diabétique
p38	P38 mitogen-activated protein kinase
PAK	p21 activated kinase
PCI	Plexus capillaires intermédiaire
PCP	Plexus capillaires profond
PCPR	Plexus capillaires péripapillaires
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
PDGFβ	Platelet derived growth factor beta
PEDF	Pigment epithelium-derived factor
PEPCK	Phosphoenol carboxykinase
PGF	Placenta growth factor
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PIGF	Placental growth factor
PVS	Plexus vasculaires supérieures
RAGE	Receptor for advanced glycation end products
RD	Rétinopathie diabétique
RDNP	Rétinopathie diabétique non proliférative
RDP	Rétinopathie diabétique proliférative
RPE	Retinal pigment epithelium
ROS	Espèces réactives d'oxygènes
RTE	Résistance transendotheliale électrique
Smad1,5,9	Small body size/mothers against decapentaplegic -1,5,9
SNC	Système nerveux centrale
Src	Src proto-oncogene tyrosine-protein kinase
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STZ	Streptozotocin
TGFβ	Transforming growth factor beta
TGFβR	Transforming growth factor beta receptor
THH	Télangiectasie héréditaire hémorragique
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
UKPDS	The UK prospective Diabetes Study



UNV	Unité neurovasculaire
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VE-cadhérine	Vascular endothelial cadhérine
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
VEGFR	VEGF receptor
VEGFR1	VEGF receptor 1
VEGFR2	VEGF receptor 2

*À ma femme Luisa*

## Remerciements

Peine à réaliser encore la complétion de mes études au doctorat, me viens à l'esprit ce que cela représente, une transformation, un changement profond qui nous pousse continuellement à s'améliorer tout au long d'une aventure qui passe très vite. Ultimement, cela nous mène à se dire qu'il y a place à beaucoup d'amélioration. Soutenant cette métamorphose, je tiens à remercier ;

Tout d'abord, les membres du jury qui ont accepté avec gentillesse ce travail d'évaluation qui demande temps et énergies.

Les membres de mon comité de thèse qui ont fait un travail remarquable par leur précieux conseils durant mon cheminement au doctorat.

Le département de biochimie et nos professeurs chevronnés. Je vous assure que vos cours ont été une grande source de motivation et d'équilibre essentiels dans la poursuite de nos études. Grand merci à nos TGDE Elaine, Kathy et Sylvie, ainsi qu'à l'administration du département qui ont fait un travail exceptionnel facilitant notre parcours. Le département d'ophtalmologie, dont l'appui financier Suzanne véronneaux-troutman/FROUM et académique ont ajouté à l'excellence du soutien institutionnel des études supérieures de l'Université de Montréal. Le FRQS, qui a assuré la relève du soutien financier indispensable à la poursuite de mes études. Et toute l'équipe du RRSV qui ont ajoutée à cette aventure une dimension académique inoubliable.

Mes collègues et amis du laboratoire qui m'ont aidé et contribué à un environnement agréable et productif de travail. Je tiens à remercier spécialement Lucie Grisé, technicienne en documentation, qui a fait la correction linguistique de mon manuscrit. Merci à tous mes amis, étudiants ou employés du HMR, ils sont trop nombreux pour les nommer tous de peur d'en oublier, je vous remercie infiniment !

Mon directeur de recherche Bruno, qui a donné un sens à ce PhD. Par son exemple de leader, incorporant son rôle de professeur et de chercheur scientifique accompli, il nous inspire à constamment s'améliorer et apprendre. Bruno, tu es un modèle pour les étudiants! Un grand merci à mon codirecteur Mike qui m'a chaleureusement accueilli et qui avait à cœur la poursuite de mes études. Grand merci particulier à Agnieszka qui a renforcée mon sens de la rigueur scientifique. Que vos conseils et aides puissent continuer longtemps dans le futur!

Plus personnellement, je remercie ma mère qui a toujours eu confiance en mes capacités et à mon père, dont mon éducation lui était si chère. J'ai dédié cette thèse à mon amie et partenaire, ma femme Luisa qui me surpassera toujours par ses qualités. Tu as été mon exemple de courage, de bonté, d'amour et mon moteur durant cette aventure!

Finalement, je remercie Dieu, qui par sa grâce, m'a permis de voir par les sciences la beauté de sa création.

*fide splendet et sciencia*

## **Chapitre I : Introduction**

## 1.1 L'œil comme organe sensible

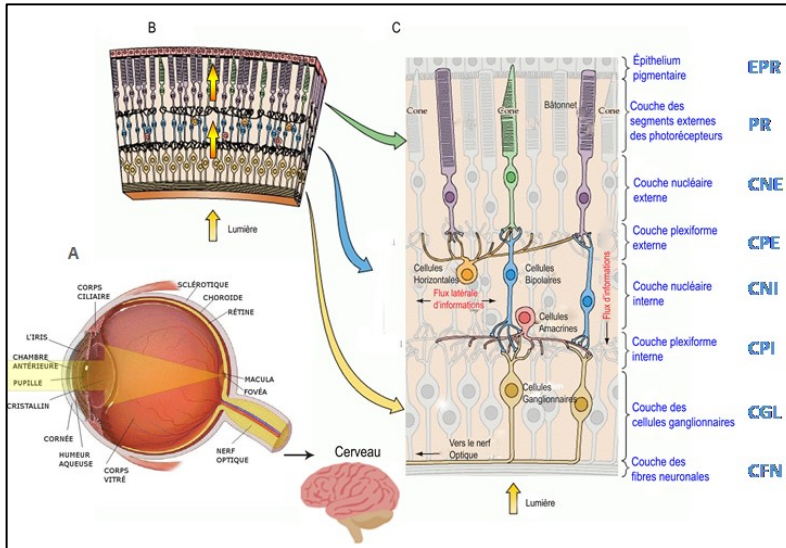
L'œil est l'un des organes sensitifs les plus complexes qui nous permet des réflexions tant scientifiques que métaphysiques. Cicéron (106 av. J.-C.-43 av.J.-C) voyait l'œil comme le miroir de l'âme. Puisque la fonction de l'œil est de permettre de percevoir le monde extérieur à distance, il n'est pas surprenant de constater que la lumière doive parcourir non seulement de longues distances entre nous et les objets observés, mais aussi plusieurs structures optiquement transparentes de l'œil y compris presque toutes les couches rétiniennes pour former l'image (**Figure 1.1**) (Abràmoff et al., 2010; Purves et al., 2001).

Les premières transformations et l'amplification du signal lumineux en signal électrochimique s'effectuent dans les disques des segments externes des photorécepteurs près de l'épithélium pigmentaire (Arshavsky et al., 2014; Palczewski, 2014). La rétine contient plus de 120 millions de photorécepteurs, qui sont subdivisés en 4 types, 3 types en formes de cônes pour la vision en couleurs (rouge, vert et bleu) et les bâtonnets pour la vision en noir et blanc. Les cônes sont plus denses au centre de la rétine dans une région d'approximativement 4,5 à 6 mm de diamètre appelée la macula, plus spécifiquement dans la fovéa là où la lumière se focalise. Cette partie de la rétine nous permet de voir de façon claire et nette lorsque la luminosité est élevée (Hildebrand et al., 2011; Mannu, 2014), tandis que les bâtonnets sont plutôt situés à la circonférence et participent à la vision périphérique (Mannu, 2014). La macula est unique à l'humain et aux primates supérieures. Désignée aussi par macula lutea en raison de son apparence jaunâtre, cette région regorge de caroténoïdes ayant un rôle d'antioxydants et la protégeant contre les longueurs d'ondes courtes. Histologiquement elle est définie aussi par la présence de plusieurs couches

ganglionnaires et contient concentriquement la fovéola, la fovéa et les régions péri et parafovéolaires. Plus on se rapproche du centre de la macula, plusieurs éléments rétiniens sont déplacés latéralement formant une petite dépression à son centre de  $\sim 1.5$  mm de diamètre appelé fovéa. Celle-ci permet à la lumière d'atteindre les photorécepteurs directement sans obstruction permettant ainsi une acuité visuelle maximale. Cette spécialisation s'optimise dans le creux le plus profond au centre de la fovéa, la fovéola, ne contenant que des cônes avec une densité pouvant atteindre jusqu'à 300 000/ mm<sup>2</sup> (Frank et al., 2017; Remington, 2012).

L'information électrochimique générée par les photorécepteurs doit être intégrée et réacheminée par l'intermédiaire des interneurons (cellules horizontales, bipolaires, amacrines et interplexiformes) vers les couches les plus antérieures de la rétine pour être convertie par les cellules ganglionnaires en potentiels d'actions (Hildebrand et al., 2011; Purves et al., 2001). Ultiment, les cellules ganglionnaires transmettent l'information visuelle avec un début d'intégration qui est relayée vers le cerveau par les axones du nerf optique (Hildebrand et al., 2011). L'importance de préserver la fonction rétinienne nous permettant d'interagir avec notre milieu extérieur est d'autant plus cruciale considérant que près de 80% de toutes les informations sensorielles chez les humains sont d'origine visuelle (Kaufman et al., 2003). Ce traitement de l'information vient à un coût énergétique considérable (Niven et al., 2008; Wong-Riley, 2010). Dans le système nerveux centrale (SNC), le cerveau avec seulement 2% du poids corporel consomme près de 20% de l'oxygène et 25% du glucose total pour ses besoins énergétiques (Riley-Wong et al., 2010). En effet, le maintien et l'utilisation du tissu neural est très coûteux, même dans la noirceur (Niven et al., 2008) et considérant le système visuel comme faisant partie

intégrante du SNC, la rétine en est le tissu le plus actif métaboliquement (Anderson et al., 1964; Country, 2017; Kumagai, 1999; Wong-Riley, 2010; Yu et al., 2001).

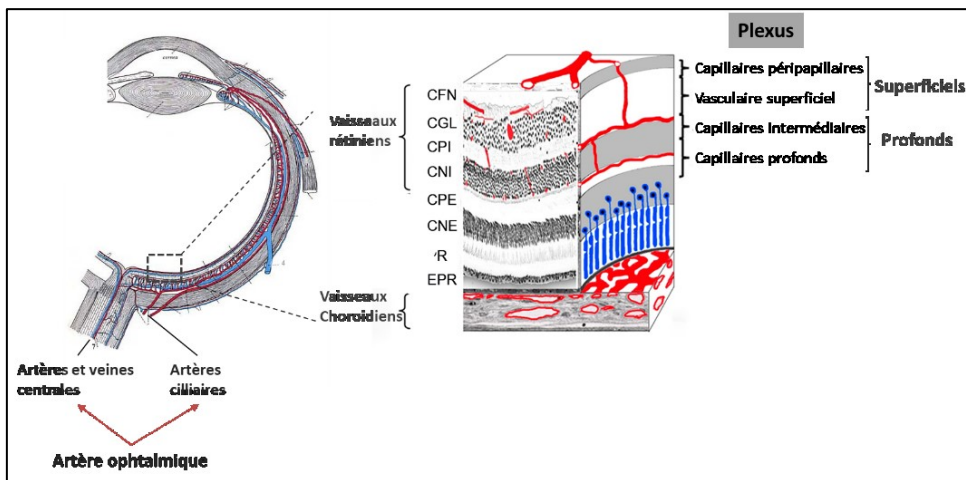


**Figure 1.1. Parcours de la lumière dans les structures de l'œil.** (A) De la partie antérieure à la partie postérieure de l'œil avant d'atteindre la rétine. La lumière doit passer par plusieurs structures de l'œil : la cornée, l'humeur aqueuse, l'ouverture au centre de l'iris, la pupille, avant de passer par le cristallin qui permet d'adapter le focus de l'image sur la rétine. (B) La lumière doit aussi traverser presque toutes les couches rétinienne incluant les vaisseaux sanguins rétinien dans les couches internes avant d'atteindre les photorécepteurs situés dans la partie externe de la rétine. (C) La rétine est composée d'une chaîne à trois neurones-photorécepteurs, cellules bipolaires et cellules ganglionnaires qui constituent un chemin direct transmettant l'information visuelle au cerveau. Les cellules horizontales et amacrines médient l'interaction latérale dans les couches internes et externes des couches plexiformes. Le terme interne et externe désigne la distance relative au centre de l'œil. (Schéma adaptée de : Purves D et al., 2001)

### 1.1.1 Circulation sanguine oculaire

Chez l'humain, l'approvisionnement en sang permettant l'apport en nutriments et en oxygène de la rétine est assuré par deux réseaux de vaisseaux sanguins distincts provenant de l'artère ophtalmique. L'artère centrale rétinienne est la branche irriguant le réseau de la partie interne de la rétine et les artères ciliaires qui aboutissent aux réseaux capillaires choroïdiens pour la partie

externe de la rétine (Pournaras et al., 2008; Wong-Riley, 2010). Ces derniers ne faisant pas partie de la rétine, ils l’approvisionnent par diffusion à travers les cellules de l’épithélium pigmentaire rétinien (EPR) (Country, 2017). Le réseau vasculaire rétinien interne peut se subdiviser en quatre plexus souvent catégorisés de superficiels aux plus profonds (**Figure 1.2**) (Campbell et al., 2017; Liu et al., 2017; Sim et al., 2013).



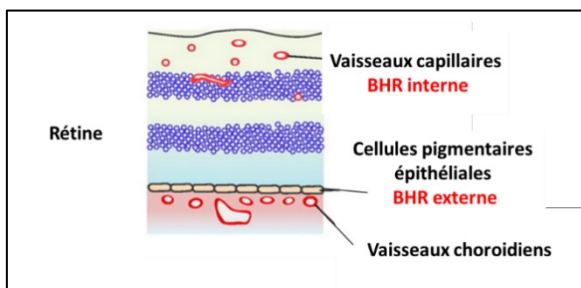
**Figure 1.2. Circulation sanguine oculaire et rétinienne.** Le plexus vasculaire superficiel est composé d’artères plus larges, d’artéioles, de capillaires, de veinules et de veines autour de la couche ganglionnaire (CGL). Les plexus capillaires intermédiaires et profonds sont situés dans la rétine au-dessus et en-dessous de la couche nucléaire interne respectivement qui sont approvisionnés par le plexus vasculaire superficiel. Finalement, le plexus capillaire péripapillaire radial se situe dans la partie la plus antérieure de la rétine et approvisionne la couche des fibres neuronales (CFN). (Figure adaptée de Campbell 2017; Sim D 2013)

Bien que ces plexus soient présents au niveau maculaire, ils convergent à mesure que l’on se rapproche de la fovéa, et fusionnent en un plexus à la périphérie de la fovéola (Hildebrand et al., 2011; Romero-Aroca et al., 2016). Cette zone amincie de 0,35 mm devient relativement avasculaire et dépend des capillaires choroïdiens situés dans la partie postérieure de l’œil en arrière de la EPR pour son approvisionnement en oxygène et nutriments.



## 1.1.2 Les barrières oculaire et hémato-rétiniennes

Une des caractéristiques uniques du métabolisme rétinien est une utilisation élevée du glucose, qui doit traverser les barrières hémato-rétiniennes (BHR) avant d'atteindre les neurones rétiniens (Country, 2017; Kumagai, 1999). Bien qu'il existe plusieurs barrières oculaires telles les barrières hémato-aqueuses des procès ciliaires ou de l'iris, structurellement la BHR est composée de la couche EPR qui forme la BHR externe (eBHR) et les plexus vasculaires rétiniens de la BHR interne (iBHR), qui constituent les barrières du segment postérieur oculaire qui influencent la composition du liquide interstitiel rétinien (**Figure 1.3**) (Romero-Aroca et al., 2016).



**Figure 1.3. Barrières hémato-rétiniennes (BHR).**

Adapté de (Choi et al., 2008)

La eBHR est formée par les jonctions entre les cellules de la EPR, qui sont interposées entre le réseau des choriocapillaires et la partie externe avasculaire de la rétine (Romero-Aroca et al., 2016; Wong-Riley, 2010). La iBHR est composée des jonctions entre les cellules endothéliales du réseau vasculaire interne de la rétine. Ces barrières ont des transporteurs de glucose, principalement GLUT1, qui permettent le transport passif du glucose à travers la membrane plasmique (Kumagai et al., 1994; Wong-Riley, 2010). Lorsque le glucose traverse l'iBHR ou l'eBHR, il peut approvisionner d'autres types de cellules rétiniennes et être absorbé via GLUT1 ou GLUT3 (Hsu et al., 1991; Wong-Riley, 2010). Lorsque la production énergétique n'est pas

satisfaite par cause d'un défaut d'apport en oxygène ou d'une mauvaise circulation (i.e. ischémie), cela laisse place à plusieurs pathologies rétiniennes incluant le glaucome, la rétinopathie du prématuré, l'occlusion rétinienne artérielle ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Country, 2017). L'apport en métabolites (e.g. glucose, O<sub>2</sub>) et la demande en énergie (i.e. ATP) doivent être en équilibre pour prévenir les pathologies visuelles telles que la rétinopathie diabétique (RD) dont l'œdème maculaire diabétique (OMD) est la principale conséquence et qui débute par un surapprovisionnement de glucose (Caldwell et al., 2003; Country, 2017). Ainsi, l'hyperglycémie chronique rencontrée chez les diabétiques mène à des changements biochimiques et cellulaires dans les vaisseaux rétiniens dont l'intégrité est essentielle pour la sensibilité à la lumière.

## **1.2 Le diabète**

Au moment des premières observations documentées sur le diabète, datant de plus de 5 500 ans, nul ne pouvait prévoir que cette maladie deviendrait une pandémie à l'échelle mondiale (Loriaux, 2006; Watkins, 2003; Whiting et al., 2011; Zimmet et al., 2016). Les perspectives futures ne sont pas plus rassurantes car on estime que d'ici 2030 le nombre de diabétiques risque d'atteindre plus d'un demi-milliard de personnes (Whiting et al., 2011). L'augmentation de la prévalence de cette maladie laisse présager en parallèle l'augmentation des complications macrovasculaires (e.g. athérosclérose, maladies cardiovasculaires) et microvasculaires (e.g. RD, OMD) (Kolluru et al., 2012; Luscher et al., 2003).

### **1.2.1 Types de diabète**

Le syndrome du diabète sucré (i.e. Diabetes mellitus) est un désordre métabolique qui est caractérisé principalement par des niveaux élevés anormaux de glucose (hyperglycémie) (Lin, Y. et al., 2010; Masharani, 2019). Bien qu'il y ait plusieurs types de diabète incluant une multitude de sous-types, on peut classer simplement sous deux catégories les personnes diabétiques représentant 95% des cas (Norris, 2008). Causé par une réaction autoimmune, le diabète de type 1 survient lorsqu'il y a une déficience en insuline. Le diabète de type 2, comprend une hétérogénéité de désordres qui inclut une dysfonction des cellules  $\beta$ , la résistance à l'insuline et une augmentation de la libération du glucose hépatique (Lin, Yi et al., 2010; Norris, 2008; Watkins, 2003).

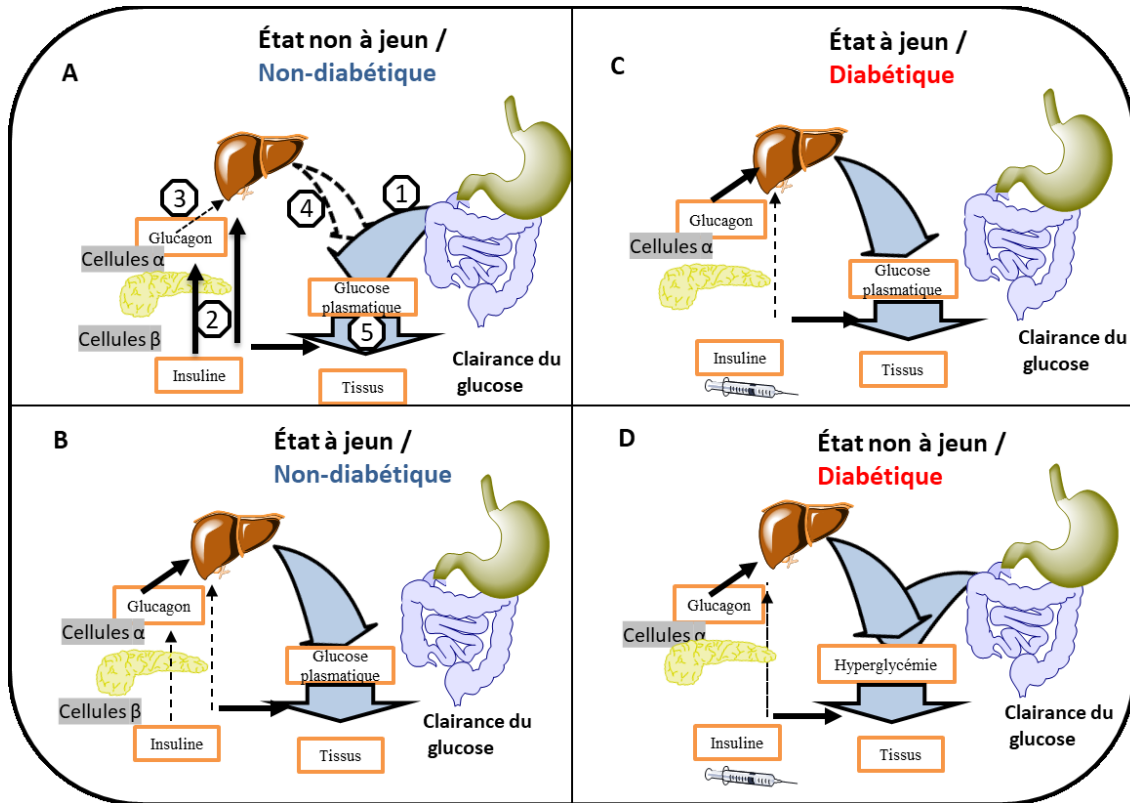
### **1.2.2 Un désordre métabolique hétérogène affectant les vaisseaux sanguins**

Dans une approche générale, plusieurs voies dans la pathophysiologie du diabète sont à considérer pour leurs contributions dans la dysfonction de l'endothélium vasculaire menant aux complications cardiovasculaires. Déjà, parmi les facteurs qui causent le diabète, on en retrouve plusieurs qui ont aussi un effet sur les vaisseaux et sont impliqués dans la RD et l'OMD tels la résistance à l'insuline, l'hypertension, les défauts dans les régulations hormonales intestinales, les défauts des îlots des cellules  $\beta$  du pancréas, la dyslipidémie, la dysfonction des adipocytes et l'inflammation sous-clinique. Parmi ces caractéristiques, l'hyperglycémie a un impact majeur sur la dysfonction des cellules endothéliales (CE) (Creager et al., 2003; Hammes, 2013; Leslie, 1993; Rubsam et al., 2018; Saad et al., 2015; Willard et al., 2012).

### 1.2.3 Régulation physiologique du glucose

En physiologie normale, plusieurs hormones permettent de réguler les niveaux de glucose sanguin. Parmi les hormones glucorégulatrices primaires d'importance, on retrouve celles sécrétées par les cellules  $\beta$  du pancréas, telles que l'insuline et l'amyline, le glucagon provenant des cellules  $\alpha$ , les incrétines sécrétées par les cellules L intestinales et enfin les hormones produites par les glandes surrénales incluant le cortisol (corticostérone chez la souris) (Aronoff et al., 2004; Röder et al., 2016).

Les réponses hormonales (i.e. insuline-glucagon) maintiennent l'homéostasie du glucose plasmatique (**Figure 1.4**) (Aronoff et al., 2004; Röder et al., 2016). La concentration du glucose plasmatique est fonction du taux entrant dans la circulation qui est équilibré par son taux sortant. Le glucose de la circulation sanguine provient de trois sources principales : l'absorption intestinale, la glycogénolyse et la gluconéogenèse (hépatique et rénale) (Alsahli et al., 2017). Ces sources de glucose sanguin dépendent respectivement du taux d'évacuation gastrique (Horowitz et al., 1996), du catabolisme du glycogène hépatique et finalement de la formation de glucose dérivé principalement de métabolites glycolytiques tels le pyruvate, le lactate ou les acides aminés (à jeun) (Aronoff et al., 2004; Ruderman, 1975).



**Figure 1.4. Régulation du glucose plasmatique dans un système bi-hormonal** **A)** Après un repas, les niveaux de glucose plasmatique augmentent (1) ce qui stimule la libération de l'insuline (2), inhibe la sécrétion du glucagon (3), inhibe la glycogénolyse et gluconéogenèse hépatique (4) et augmente l'absorption du glucose dans le tissu périphérique (5). **B)** Si le jeûne persiste, la glycogénolyse hépatique est le mécanisme répondant le plus rapidement pour le maintien de la glycémie, suivie de la gluconéogenèse, qui prend la relève sous le contrôle du glucagon. La diminution de la sécrétion de l'insuline à jeun gardée à des niveaux de base permet un approvisionnement minimal des tissus et son rôle comme suppresseur de la glycogénolyse et gluconéogenèse est négligeable. **C)** Chez les diabétiques à jeun le glucose est fourni par la glycogénolyse et la gluconéogenèse sous le contrôle du glucagon. Dans le diabète, l'action de l'insuline est diminuée et elle ne peut réguler adéquatement la glycogénolyse et la gluconéogenèse. **D)** Chez les diabétiques non à jeun, l'apparition du glucose est en excès comparativement à son taux de disparition de la circulation sanguine, puisque l'inhibition du glucagon par l'action de l'insuline perd en efficacité et mène à une suractivation de la gluconéogenèse et glycogénolyse. (Schéma modifié d'Aranoff 2004)

Après un bolus de glucose ou un repas (i.e. postprandial ou phase absorptive), le glucose exogène absorbé dans le sang atteint un pic entre 1h et 2h et retourne au niveau basal 3 à 4h

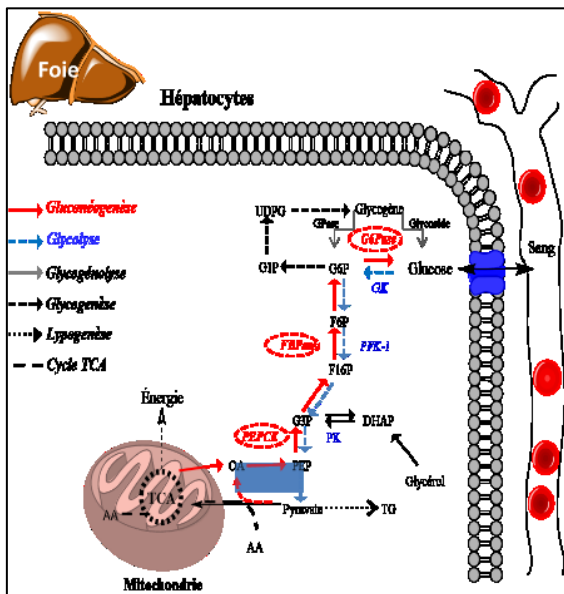
après absorption (Gerich, 2010; Service, J., 1991). Il a été démontré qu'un jeûne durant la nuit épuisait les réserves de glycogène chez la souris (Ayala et al., 2010; Service, J. F., 1991) et que pendant les 60 à 90 premières minutes d'hypoglycémie, 90% du glucose produit provenait de la glycogénolyse hépatique (Winnick et al., 2016; Yoon et al., 2001). La gluconéogenèse hépatique, bien qu'elle chevauche avec le processus de la glycogénolyse, assure graduellement la relève avec 50-65% de la production du glucose entre 12 to 24 heures après le début du jeûne (Ekberg et al., 1999; Landau et al., 1996; Ruderman, 1975; Sharabi et al., 2015). Après 42 heures de jeûne, plus de 90% du glucose circulant provient de la gluconéogenèse hépatique et rénale (Landau et al., 1996). Le rein étant un site majeur de l'activité enzymatique de gluconéogenèse, il contribue plus significativement à la gluconéogenèse que sur des temps de jeûne plus longs (plusieurs jours) (~40%) (Ekberg et al., 1999; Gerich et al., 2001). À jeun ou non, les mécanismes régulateurs hormonaux permettent de maintenir dans un étroit intervalle la concentration plasmatique du glucose, gérant l'équilibre entre l'absorption intestinale, la production de glucose hépatique et l'utilisation du glucose par les tissus périphériques. Dans les deux types de diabète de type 1 et 2, la production excessive de glucose hépatique contribue à l'hyperglycémie à jeun et postprandiale (Barthel et al., 2003; Yoon et al., 2001).

## **1.2.4 Rôle de la gluconéogenèse hépatique dans l'hyperglycémie**

### **1.2.4.1 Les enzymes gluconéogéniques**

Le foie est un site majeur pour l'absorption, la mise en réserve, la production du glucose et des lipides (Lin, Yi et al., 2010). La production excessive de glucose par gluconéogenèse hépatique est la signature d'une hyperglycémie chronique (Opherk et al., 2004). Trois enzymes unidirectionnelles assurent la libération de glucose en circulation à partir de substrats de produits

de la glycolyse dont le lactate et le pyruvate, qui comptent pour 60% de cette conversion (**Figure 1.5**) (Dietze et al., 1976; Pilkis et al., 1992; Service, J., 1991). La gluconéogenèse est assurée par plusieurs enzymes, dont la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose-1,6-biphosphatase (FBPase) et la glucose-6-phosphatase (G6Pase) qui catalyse la dernière réaction limitante de la gluconéogenèse. Cette dernière enzyme n'est présente que dans le foie et le rein, et est donc cruciale pour l'hydrolyse du glucose-6-phosphate (G6P) intracellulaire afin de le libérer sous forme de glucose dans la circulation. Ainsi, la G6Pase contrôle non seulement la gluconéogenèse, mais aussi la glycogénolyse (Barthel et al., 2003; de Guia et al., 2014; Gerich et al., 2001; Service, J., 1991). Bien que le muscle ait une quantité appréciable de glycogène, il n'a pas la G6Pase pour hydrolyser le G6P en glucose libre (Ruderman, 1975). La transcription de ces enzymes est régulée principalement par les hormones glucorégulatrices dont l'insuline, le glucagon et les glucocorticoïdes (Barthel et al., 2003).



**Figure 1.5. Illustration schématisée des voies métaboliques hépatiques.** La gluconéogenèse (en rouge), la glycolyse (en bleu) et la glycogénolyse (en gris) constituent des voies primordiales pour l'homéostasie du glucose. Schéma modifié de (Viegas et al., 2012).

#### **1.2.4.2 Régulation hormonale des enzymes gluconéogéniques**

Un des chefs d'orchestre régulant négativement les enzymes gluconéogéniques est l'insuline par l'activation de la voie PI3K/AKT via son récepteur InR (Aronoff et al., 2004; Smith et al., 2017). Cette activation mène en conséquence à la phosphorylation et inactivation du facteur de transcription Forkhead Box O1 (FOXO1) chez la souris (Sakai et al., 2017). La phosphorylation de FOXO1 l'empêche d'accéder au noyau, menant à sa dégradation, ce qui réduit la transcription des gènes d'enzymes gluconéogéniques. Des études ont montré que dans le foie, lorsqu'AKT était spécifiquement phosphorylé à la sérine S473, la gluconéogenèse était inhibée par la phosphorylation subséquente de FOXO1 à la sérine S256 (Matsuzaki et al., 2003; Nakae et al., 2001; OSullivan et al., 2015; Smith et al., 2017). Bien que cette voie soit majoritairement associée à l'insuline, elle est non spécifique et peut être activée par d'autres facteurs tels les facteurs de croissances des membres de la famille TGF- $\beta$ , incluant les protéines morphogénétiques osseuses (BMP) (Kurebayashi et al., 2016; Lauzon et al., 2016; Zhang et al., 2010).

À l'inverse, le glucagon et les corticostéroïdes, qui sont des hormones cataboliques majeures augmentent le niveau de ces enzymes. Bien que l'insuline puisse inhiber ces deux voies (Vidal-Puig et al., 2001), les récepteurs au glucagon, une fois activés, induisent la signalisation de la voie cAMP/PKA et phosphorylent et activent le facteur de transcription CREB dans le foie et augmente l'expression des enzymes gluconéogéniques (Han et al., 2016; Hanson et al., 1997; Oh et al., 2013; Yabaluri et al., 2010). Les récepteurs nucléaires aux glucocorticoïdes, une fois activés par les corticostéroïdes dont le cortisol, activent directement de façon prédominante la transcription de ces enzymes gluconéogéniques en se liant directement aux promoteurs de ces



dernières (de Guia et al., 2014; Vidal-Puig et al., 2001; Yabaluri et al., 2010). L'activité des glucocorticoïdes a été démontrée chez les souris dont le récepteur à corticoïdes hépatique était inactivé, ces dernières exhibant une hypoglycémie grave (de Guia et al., 2014; Opherk et al., 2004). De façon similaire, de faibles concentrations de glucocorticoïdes entraînent une hypoglycémie, une diminution des réserves de glycogène et une hypersensibilité à l'insuline, alors qu'une exposition prolongée aux glucocorticoïdes conduit à un état semblable à celui du diabète en raison de l'augmentation de la glycémie (McKay, 2003).

### **1.2.5 Régulation thérapeutique de l'hyperglycémie chronique**

Mis à part les traitements systémiques contre l'hypertension ou la dyslipidémie, deux études déterminantes dans les années 90 (DCCT et l'UKPDS) ont suggéré que le contrôle intense de l'hyperglycémie chez les diabétiques de type I et II diminue la fréquence de l'apparition de plusieurs complications vasculaires (BMJ, 1995; Nathan et al., 1993; Willard et al., 2012). Pour réguler les niveaux glycémiques comme dans le cas de la déficience presque absolue en insuline pour le diabète de type 1, l'administration d'insuline est prescrite pour compenser ce manque. Il y a peu de médicaments qui sont approuvés ciblant la voie AKT ou d'autres composantes de la signalisation à l'insuline (Osherovich, 2011). Pour le diabète de type 2, il y a une panoplie de médicaments hypoglycémisants ayant différents mécanismes d'action, permettant de diminuer l'absorption intestinale du glucose, d'augmenter la libération d'insuline et diminuer la libération du glucose hépatique, d'accroître la sécrétion d'insuline des cellules  $\beta$ , d'augmenter la sensibilité à l'action de l'insuline et l'absorption du glucose dans le tissu et finalement, de diminuer la réabsorption du glucose glomérulaire rénal (Coelho, 2013; Norris, 2008; Watkins, 2003). Malgré l'arrivée de plusieurs de ces agents anti-diabétiques, il est essentiel de découvrir de nouveaux

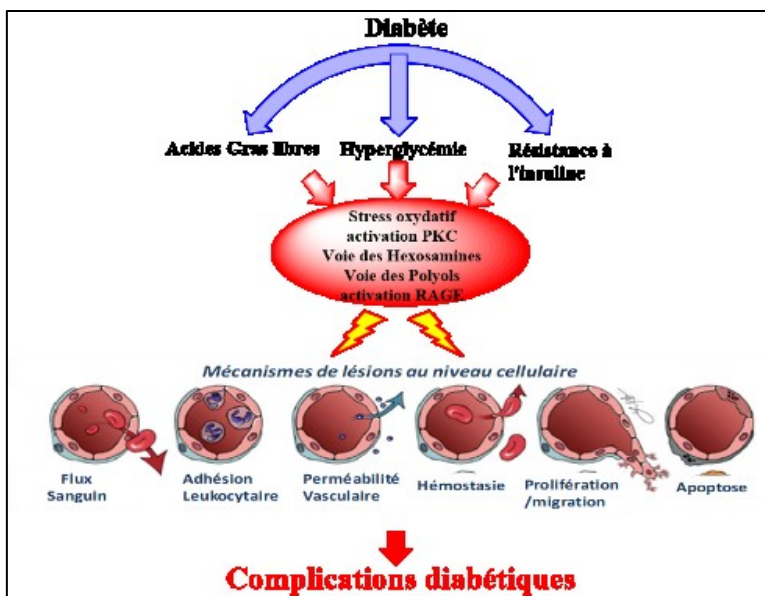
traitements à actions spécifiques pour réduire les effets secondaires associés aux traitements actuels (Chen et al., 2003; Kim et al., 2011).

### **1.2.6 Hyperglycémie et dysfonctions de l'endothélium vasculaire**

Nos connaissances actuelles suggèrent qu'il y a un équilibre entre les mécanismes biochimiques menant aux complications vasculaires diabétiques et les facteurs protecteurs endogènes tels les facteurs hormonaux comme l'insuline, les facteurs anti-inflammatoires et les enzymes anti-oxydantes. Le problème est que le diabète va inhiber les facteurs protecteurs tout en favorisant les mécanismes menant aux dysfonctions vasculaires (Rask-Madsen, Christian et al., 2013). Une approche globale met en lumière les altérations métaboliques dans le diabète, qui sont connues pour induire différentes dysfonctions vasculaires menant à leur tour à de nombreuses complications macrovasculaires et microvasculaires (**Figure 1.6**). Parmi les altérations jouant un rôle d'importance, l'hyperglycémie chronique en est généralement reconnue comme cause principale (Kitada et al., 2010; Leslie, 1993; Schalkwijk, C. G. et al., 2005; Willard et al., 2012).

En conditions physiologiques, les cellules endothéliales en monocouche recouvrant la paroi vasculaire sont normalement quiescentes lorsqu'exposées à des niveaux de glucose entre 3.6 et 5.8 mM (Popov, 2010). Une exposition à des niveaux hyperglycémiques (10 mM et plus) perturbe l'homéostasie vasculaire. Les complications les plus fréquentes de l'hyperglycémie sont celles d'origines microvasculaires (Chawla et al., 2016; Rask-Madsen, Christian et al., 2013). Le glucose extracellulaire qui se retrouve en excès reflète les niveaux intracellulaires, ce qui surcharge la voie glycolytique. L'accumulation de glucose intracellulaire provoque ainsi l'activation des voies alternatives métaboliques tels que la voie des polyols/sorbitol, la voie des hexosamines, d'espèces

réactives d'oxygène (ROS), des protéines kinases C (PKC) et des produits de glycations finaux avancés (AGE) et de leurs récepteurs (RAGE) (Giacco et al., 2010). Ces voies altérées biochimiques mènent à des altérations fonctionnelles et structurales des vaisseaux sanguins telles l'augmentation de la perméabilité, la perturbation du flux sanguin, l'augmentation de l'adhésion leucocytaire (leukostase), la perte de cellules murales, la perturbation de la prolifération des CE et leur apoptose, ainsi qu'un dérèglement de plusieurs étapes dans le processus angiogénique menant aux complications vasculaires diabétiques en lien avec l'OMD et la RD (**figure 1.6 et 1.7**) (Biswas et al., 2017; Das et al., 2015; Madamanchi et al., 2007; Rask-Madsen, Christian et al., 2013; Urias et al., 2017).



**Figure 1.6. Les altérations métaboliques associées aux altérations des fonctions vasculaires diabétiques.** (Modifiée de Creager M A et al. 2003; Rask-Madsen 2013; Madamanchi NR and Runge 2007)

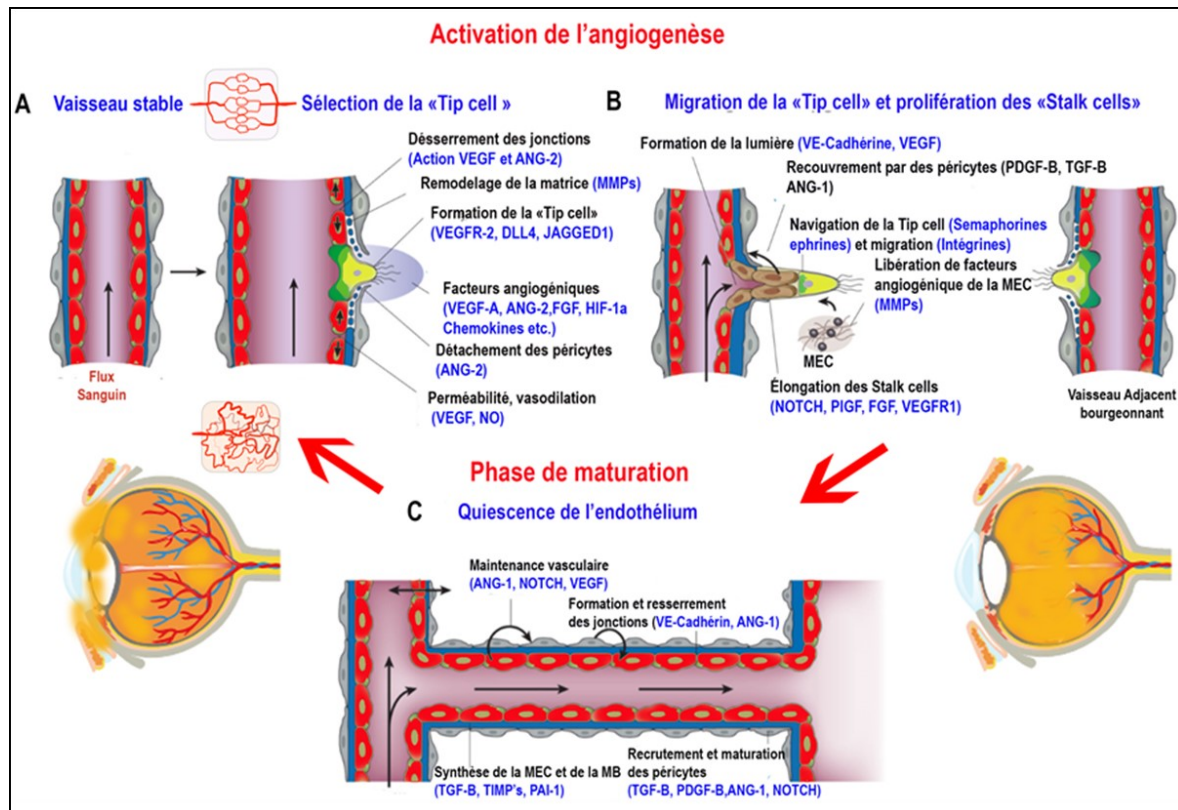
### **1.2.7 La rétinopathie diabétique**

La rétinopathie diabétique (RD) est la complication microvasculaire la plus commune causée par le diabète et affecte présentement plus de 100 millions de personnes à l'échelle mondiale. L'augmentation du nombre de cas de personnes présentant des handicaps visuels est donc aussi à prévoir puisque la RD est reconnue comme la principale cause de perte de vision chez la population adulte âgée entre 20 et 64 ans (Nentwich et al., 2015; Zhao et al., 2018). Cette maladie est souvent perçue comme un syndrome pathologique suivant les observations cliniques qui sont catégorisées de non proliférative (RDNP) à proliférative (RDP) et classifiées respectivement de légère à sévère selon le degré d'avancement de la maladie. Les critères de classification se basent sur les lésions microvasculaires affectant la rétine. D'autres types cellulaires sont aussi affectés par le diabète telles les cellules neuronales, gliales et immunitaires et ont un rôle d'importance dans la progression et le développement de la RD (Duh et al., 2017).

#### **1.2.7.1 Stade non prolifératif des vaisseaux**

Durant la RDNP chez l'humain, le stade le plus précoce de cette pathologie est la dysfonction/perte des péricytes, qui sont les cellules murales recouvrant les microvaisseaux rétiniens, ce qui peut entraîner une déstabilisation et une perméabilité vasculaire (**figure 1.7A**) (Arden et al., 2015). Ces changements mécaniques comprennent des microanévrismes (i.e. dilatations focales), situés dans la couche nucléaire interne (CNI) des capillaires rétiniens de la iBHR. Ces dilatations des capillaires rétiniens déjà affaiblies peuvent se rompre et progresser vers des anévrismes ou des hémorragies dans la rétine selon leurs tailles. Plus graves encore sont les anévrismes dans la partie superficielle de la rétine, d'où l'hémorragie peut couler le long des fibres nerveuses. La dégradation de la BHR mène à l'extravasation des microvaisseaux sanguins de

lipoprotéines et d'autres protéines qui forment des précipités durs (exudats) qui se manifestant par des petits points jaunâtres (Arden et al., 2015; Wu et al., 2008). Finalement, une perfusion compromise (ischémie) mène à l'occlusions des capillaires sanguins et peut entraîner la nécrose des tissus rétiens qui est observables par des taches ressemblant à des flocons de ouate.



**Figure 1.7. Schéma simplifié des bases moléculaires du processus angiogénique par bourgeonnement.** (A et B) Phase d'activation de la néovascularisation à partir d'un vaisseau perfusé, stable et quiescent. (A) Cette phase débute par un stimulus pro-angiogénique, tel que l'hypoxie rétinienne ou la surproduction du VEGF, ce qui déstabilise les vaisseaux et active les CE par la sélection de la « Tip cell » (A). (B) La libération et la stimulation continue des facteurs de guidances et facteurs pro-angiogéniques déstabilisent d'avantage les vaisseaux par la croissance du bourgeon naissant qui est soutenue par la migration guidée de la « Tip cell » et la prolifération des « Stalk cells ». (C) La phase de maturation ou « résolution » du néovaisseau s'effectue suite à l'anastomose avec un vaisseaux adjacent et le rétablissement de la perfusion sanguine ce qui favorise la rehabilitation d'un phénotype d'un endothélium quiescent. Cet état de stabilité est caractérisé principalement par un niveau basal de VEGF et d'oxygène, un resserrement jonctionnel entre les CE, une stabilisation par les cellules murales et une MEC mature permettant un contact stable avec les intégrines (Modifiée de Carmaliet 2011 et Ricard 2013).

### **1.2.7.2 Stade prolifératif et néovascularisation rétinienne**

La transition vers le stade RDP est souvent appelée rétinopathie diabétique pré-proliférative où l'ischémie s'aggrave et peut mener ultimement à une néovascularisation rétinienne (**figure 1.7**). Plusieurs signes avant-coureurs de la RDP peuvent être notés, tels l'augmentation de la taille des hémorragies, l'augmentation du calibre veineux et le remodelage artériel de vaisseaux préexistants. Cette étape intermédiaire nécessite un suivi plus rigoureux car la moitié des rétines observées à ce stade progressent vers la RDP en moins de deux ans (**figure 1.7B**). Des études cliniques ont montré que déjà à ce stade, les anti-facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF) pouvaient en retarder la progression (Arden et al., 2015; Osaadon et al., 2014). La rétine ischémique tente de restaurer les zones non-perfusées par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Cette néovascularisation rétinienne, qui est la signature de l'avancement vers la RDP, non seulement entrave le passage de la lumière, mais est souvent peu efficace dans la restauration fonctionnelle de la vision (Arden et al., 2015). L'angiogenèse peut aussi se former autant à la surface de la rétine que pénétrer et croître dans l'humeur vitrée (**Figure 1.7**). De plus, ces néovaisseaux sont fragiles et perméables, causant des hémorragies autant intravitréales qu'intrarétiniennes. Ainsi le risque de la perte de la vision est significativement augmenté durant la RDP (Zhao et al., 2018).

## **1.2.8 L'œdème maculaire diabétique (OMD)**

### **1.2.8.1 Épidémiologie de l'OMD**

Une des causes principales de la perte de vision et la plus sérieuse manifestation de la RD est l'œdème maculaire diabétique (OMD) (Parodi Battaglia et al., 2018). Pouvant se présenter à n'importe quel stade de la RD (Calvo et al., 2015), près du tiers des personnes atteintes de la RD

risquent la perte de la vision impliquant l'OMD (Lee et al., 2015). Dans le diabète de type 1, plus de 27% des patients développeront l'œdème de la macula 9 ans après le diagnostic et 28% dans le diabète de type 2 après 20 ans (Romero-Aroca, 2011). Plus de 5 % des diabétiques de type 2 ont déjà l'OMD au moment du diagnostic (Gundogan et al., 2016). Cette pathologie est définie par l'épaississement de la macula dû aux fuites des vaisseaux sanguins par l'extravasation et l'accumulation de fluides plasmatiques et de protéines dans le tissu rétinien au niveau de la macula (Arden et al., 2015). Le diagnostic repose sur plusieurs techniques dont la biomicroscopie et angiographie de fluorescence, permettant la détection et la localisation de l'épaississement rétinien, ainsi que les régions de fuite vasculaire avec le degré de sévérité selon la distance de l'œdème relativement à la fovéa. L'arrivée de la tomographie par cohérence optique ajoute un aspect qualitatif et quantitatif structural au diagnostic (Gundogan et al., 2016; Wilkinson et al., 2003).

#### **1.2.8.2 Types d'œdèmes maculaires diabétiques**

L'OMD peut être subdivisé en différents types selon que son apparence soit diffuse, focale ou ischémique s'accompagnant ou non d'exsudats (Gundogan et al., 2016). La OMD focale est caractérisée cliniquement par la fuite de fluorescéine souvent entourée d'exsudats durs provenant de lipoprotéines résiduelles plasmatiques ayant extravasé des microanévrismes. La forme diffuse est la conséquence d'une BHR compromise et d'un dysfonctionnement des capillaires rétiens, qui est souvent observé par tomographie par cohérence optique. L'occlusion microvasculaire dans la région maculaire est observée par des régions d'hypo-fluorescence à la fluorescéine. Plusieurs spécialistes ont souligné aussi l'importance de tenir compte de l'aspect pathogénique pour orienter les choix thérapeutiques (Bandello et al., 2017; Parodi Battaglia et al., 2018).

## **1.3 Pathophysiologie de l'OMD**

### **1.3.1 Types d'accumulations de fluides rétiens**

L'espace interstitiel de la rétine est normalement relativement sec puisque le passage libre de fluides contenant eau, plasma, métabolites et protéines des vaisseaux sanguins rétiens est strictement contrôlé par la BHR, tout comme pour la barrière hémato-encéphalique du cerveau (Coscas et al., 2017; Cunha-Vaz et al., 1975). Comme pour l'œdème du cerveau, l'enflément durant l'OMD est associé à une accumulation de fluides plasmatiques (e.g. eau, solutés, macromolécules) dans l'espace extracellulaire du tissu rétinien, qui peut exercer une force mécanique sur le tissu adjacent, son déplacement et ainsi l'augmentation de la pression intratissulaire pouvant l'endommager (Simard et al., 2007). La rétine diffère du reste du SNC puisqu'elle est dépourvue de vaisseaux lymphatiques pour drainer l'excès de fluide (Karpanen et al., 2008; Nakao et al., 2012). Généralement l'accumulation de fluides dans l'œdème rétinien peut être vasogénique, ou cytotoxique (ou mixte) (Chen et al., 2012; Coscas et al., 2010; Coscas et al., 2017; Marmor, 1999; Wolfensberger, 2012).

### **1.3.2 L'œdème cytotoxique intracellulaire**

L'œdème cytotoxique est la conséquence d'un désordre métabolique qui cause le gonflement volumétrique cellulaire où les lésions primaires sont initiées dans les cellules tels que les neurones, les cellules gliales ou des cellules de la EPR (Cunha-Vaz, 2017; Daruich et al., 2018). Il est difficilement détecté cliniquement (Daruich et al., 2018) et est associé à l'altération de l'échange ionique et une défektivité des pompes ATPases ioniques  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  (Simard et al., 2007;



Wolfensberger, 2012). L'œdème intracellulaire endommage les cellules et peut mener à la libération de substances vasoactives altérant la BHR menant à l'œdème vasogénique où il y a accumulation de fluide extracellulaire (Wolfensberger, 2012).

### **1.3.3 L'œdème vasogénique extracellulaire**

Chez les patients atteints de l'OMD, les œdèmes intracellulaires et extracellulaires peuvent être présents, débutant par la forme cytotoxique et ultérieurement la forme vasogénique (Romero-Aroca, 2010). La cause la plus fréquente de l'œdème, la forme vasogénique, est caractérisée par l'épaississement rétinien qui présente une dilatation vasculaire des vaisseaux de la iBHR (Coscas et al., 2017; Parodi Battaglia et al., 2018; Strayer et al., 2015). Présentement il y a consensus sur le fait que la principale cause menant à l'œdème rétinien reflète l'hyperperméabilité des vaisseaux sanguins induit par la dégradation des jonctions interendothéliales de la iBHR, ce qui induit l'accumulation de fluides extracellulaires et le dépôt de macromolécules (Chen et al., 2012; Cunha-Vaz, 2017; Musat et al., 2015; Wolfensberger, 2012). Cette accumulation se situe principalement au niveau de la couche du plexiforme externe (CPE) et des couches nucléaires internes (CNI) et externes (CNE) (Romero-Aroca et al., 2016). Cette forme d'œdème est due à la dégradation de la iBHR où l'endothélium devient hyperperméable (Cunha-Vaz, 2017; Satirdav et al., 2014). Il est admis que la dégradation de la BHR est la première impliquée de par sa proximité et par son importance dans le mécanisme de l'œdème maculaire quelle qu'en soit l'étiologie résultant d'un désordre systémique, oculaire ou causé par des médicaments (Coscas et al., 2017). Cette perturbation de la iBHR mène ainsi à l'accumulation de fluides dans les espaces sous-rétinien et intra-rétinien (Zhang, X. et al., 2014), altérant la structure et la fonction de la macula (Gundogan et al., 2016) et peut apparaître avant les microanévrismes ou occlusions capillaires

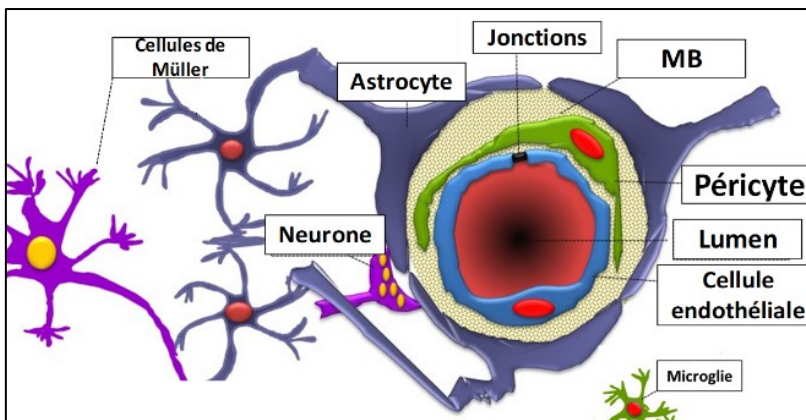
(Cunha-Vaz, 1983). Ainsi comme l'avait mentionné Cunha-Vaz il y plus de 35 ans :

*“The study of the blood-retinal-barrier and of its alteration in diabetes must be kept in the forefront of any research directed to solve the problem of diabetic retinopathy”.*

## 1.4 Fonctions de la barrière hémato-rétinienne interne

### 1.4.1 Composantes et fonctions de l'unité neurovasculaire de la iBHR

L'iBHR procure une barrière sélective contre le passage de molécules potentiellement toxiques pour la rétine présentes dans la circulation. La base cellulaire de cette barrière est composée d'une monocouche de CE étanches et soudées entre elles, d'une membrane basale et de plusieurs cellules qui participent à l'étanchéité vasculaire dont les péricytes, les cellule gliales (astrocytes, microglies et cellules de Müller) et les photorécepteurs. Ces cellules constituent l'unité neurovasculaire, le couplage cellulaire constituant la iBHR (**Figure 1.8**) (Kazuomi, 2010; Kim et al., 2006; Klaassen et al., 2013; Mehta et al., 2006; Romero-Aroca et al., 2016). Les cellules vasculaires musculaires lisses (CVML) dans les vaisseaux de plus gros calibre tels que les artérioles, contribuent aussi à l'inter-communication neurovasculaire et au maintien des fonctions de la iBHR (Daruich et al., 2018).



**Figure 1.8.** L'unité neurovasculaire de la iBHR. (Adapté de Campbell 2018)

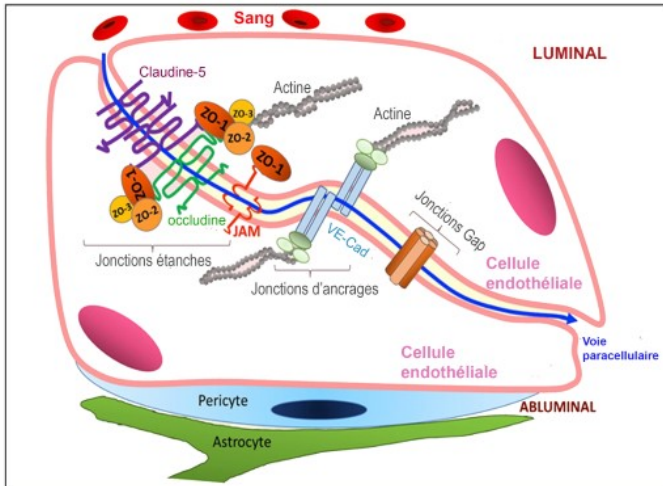
### **1.4.2 Les cellules endothéliales de la iBHR**

Les composantes cellulaires majeures de l'iBHR sont les CE qui forment la première barrière entre la circulation (luminale) et le tissu rétinien interstitiel (abluminal) (Armulik et al., 2010). La barrière endothéliale (endothélium) est formée d'une monocouche de CE connectées entre elles par leurs jonctions à l'intérieur de la membrane basale (MB) (Moran et al., 2016). Avec une masse négligeable (110 g), ce tissu peut couvrir une surface totale de 350 m<sup>2</sup> et est exposé en première ligne aux substances dans le sang en se situant à l'interface entre la paroi vasculaire et la circulation (Popov, 2010). L'endothélium joue un rôle actif dans plusieurs fonctions vitales dans le système cardiovasculaire, telles la régulation de la perfusion, l'hémostase, la réponse inflammatoire, la vasculogénèse, l'angiogénèse et les cycles de vasodilatations ou vasoconstrictions (Moran et al., 2016; Pries et al., 2006). Cruciale dans le maintien de la fonction visuelle, cette barrière cellulaire régule sélectivement le passage de métabolites, nutriments, d'ions et fluides entre le sang et la rétine et est d'importance dans le maintien de l'homéostasie rétinienne (Al Ahmad et al., 2009). En contraste avec d'autres endothéliums capillaires retrouvés dans d'autres tissus qui arborent plusieurs fenestrations (pores) et ouvertures permettant une diffusion moins sélective, l'endothélium capillaire de la iBHR comme la barrière hémato-encéphalique n'est pas fenestré (Aird William, 2007a, 2007b; Daneman et al., 2015).

### **1.4.3 La perméabilité de l'endothélium de la iBHR**

Le flux des solutés et fluides dicte le mouvement net en fonction du temps à travers la iBHR, dont les structures dictent sa fonction dans la perméabilité (Díaz-Coránguez et al., 2017). Les jonctions intercellulaires de la iBHR permettent non seulement de réguler l'adhésion interendothéliale, mais aussi la division cellulaire, la survie cellulaire et la quiescence vasculaire (Daruich et al., 2018;

Wietecha et al., 2013). Une des fonctions clés des complexes jonctionnels est la création d'une barrière pour exercer un contrôle sélectif de la perméabilité (Förster, 2008). Ainsi la perméabilité vasculaire intrarétinienne est définie par le taux de mouvement de macromolécules plasmatiques à travers les jonctions interendothéliales de l'iBHR, menant à leur accumulation dans l'espace interstitiel rétinien en réponse à un stimulus perméabilisant ou physiopathologique (Díaz-Coránguez et al., 2017; Klaassen et al., 2013; Nagy, 2008). Cette barrière mécanique très étanche varie dynamiquement en ouvrant et fermant ces jonctions intercellulaires selon la demande tissulaire et permet ainsi à l'organisme de contrôler le transport et les échanges transcellulaires (Cunha-Vaz, 1976; Das et al., 2015; Zhang, X. et al., 2014). Il a déjà été décrit que 100% des grosses molécules (>400 Da) ne traversent pas la barrière endothéliale du SNC contre 98% lorsqu'elles sont de plus petites tailles (Pardridge, 2005). Bien qu'il y ait plusieurs types de jonctions interendothéliales (Díaz-Coránguez et al., 2017; Romero-Aroca et al., 2016), les différents plexus capillaires de la iBHR sont joints solidement par deux types majeurs d'unions ou complexes jonctionnels, les jonctions étanches (*tight*) et d'ancrages (*adherens*), chacune composée de différents types de molécules d'adhésion (**Figure 1.9**) (Frank et al., 2008; Hombrebueno et al., 2015; McCarthy et al., 1996; Wilkinson et al., 2003).



**Figure 1.9. Principaux complexes de jonction contrôlant la perméabilité de la BHR.** Les composantes sanguines peuvent traverser à partir du côté luminal entre les complexes jonctionnels de deux CE vers le côté abluminal (ligne bleue). Les jonctions étanches qui sont les plus apicales, suivies par les jonctions d’ancrage formées par les VE-cadhérines et finalement viennent les jonctions les plus basolatérales Gap, qui forment des canaux communicants entre deux membranes plasmiques adjacentes pouvant laisser passer des macromolécules de ~1 Kda (Nielsen et al., 2012). Certaines des molécules caractérisant la iBHR et impliquées dans le contrôle de la perméabilité sont indiquées. (Modifié de Diaz-Coranguéz 2017)

### 1.4.3.1 Structure et fonctions des jonctions étanches

Parmi les plus solides, les jonctions étanches constituent un barrage mécanique et biologique contre le flux de solutés, permettant le contrôle du mouvement de protéines et lipides ou l’exportation de déchets cytotoxiques (Cunha-Vaz et al., 2011; Díaz-Coránguez et al., 2017; Förster, 2008; Gonzalez-Mariscal et al., 2003; Zhang, X. et al., 2014). Les jonctions étanches sont composées de plus de 40 protéines transmembranaires liées au cytosquelette qui interagissent avec les protéines d’échafaudage et de signalisation qui agissent en concert pour influencer les propriétés de la iBHR (Gonzalez-Mariscal et al., 2003; Runkle et al., 2012). Au niveau cellulaire, les jonctions étanches représentent près de 20 % du total des jonctions de la face latérale membranaires des CE, le reste étant attribué majoritairement aux jonctions d’ancrage (Wojciak-

Stothard et al., 2001). Selon les tissus il y a une variabilité dans l'expression et la composition des jonctions étanches. Selon le calibre des vaisseaux, pour supporter le flux sanguin par exemple, elles sont plus développées dans les artères que dans les artérioles suivies des capillaires et des veinules. Cependant, l'endothélium de la iBHR est particulièrement riche en jonctions étanches (Bazzoni et al., 2004; Daruich et al., 2018; Wallez et al., 2008). Il y a trois types majeurs de protéines formant les complexes des jonctions étanches; les occludines, les claudines et JAM (Gonzalez-Mariscal et al., 2003). Les occludines et les claudines sont particulièrement importantes dans le maintien d'une barrière fonctionnelle et du contrôle de la perméabilité vasculaire (Campbell et al., 2018; Campbell et al., 2012; Morita et al., 1999).

**Les occludines** ont été les premières protéines aux jonctions étanches à être identifiées en association avec la barrière endothéliale (Furuse et al., 1993). Bien qu'elles soient présentes dans la EPR et d'autres endothéliums non-BHR, tels que dans la choroïde, elles sont exprimées préférentiellement dans l'endothélium de la iBHR et considérées comme des composantes déterminantes dans la perméabilité vasculaire rétinienne (Hirase et al., 1997; Kevil et al., 1998). Bien que leurs rôles précis restent à être explorés dans la formation des jonctions étanches, elles sont d'importance majeure dans leur organisation, stabilisation et leur activité avec le cytosquelette (Giebel et al., 2005). L'occludine est une protéine à quatre domaines transmembranaires avec deux régions cytoplasmiques, un court domaine N-terminal et une partie C-terminale longue, qui est requise dans la fonction de barrière intercellulaire et assujettie à la phosphorylation par plusieurs kinases telles que PKC et Src (Chen et al., 1997; Rahimi, 2017). La partie C-terminale est aussi responsable du recrutement intracellulaire entre autres avec les protéines adaptatrices d'échafaudages telles les Zonula Occludens responsables de l'ancrage au

cytosquelette, le trafic intracellulaire et la stabilité des jonctions (Cummins, 2012; Hosoya et al., 2012). Il a d'ailleurs été démontré que les occludines étaient indispensables dans l'intégrité de la barrière des CE (Kuwabara et al., 2001). La partie extracellulaire responsable de leur assemblage est formée de deux boucles qui permettent l'interaction latérale homodimérique ou hétérodimérique, formant entre les cellules des complexes de filaments dynamiques capables de signalisation modulant leurs propriétés d'adhésion (Blasig et al., 2011; Cummins, 2012; Förster, 2008).

Expérimentalement, l'importance de l'occludine aux jonctions étanches dans un modèle les surexprimant a pu être appréciée par l'augmentation par rapport aux contrôles de près du double de la résistance transcellulaire électrique (RTE) (McCarthy et al., 1996). Cette propriété physique permet de mesurer la force d'adhésion interendothéliale en temps réel (Mehta et al., 2006; Sukriti et al., 2014) et ainsi la restriction de la perméabilité (Klaassen et al., 2013). L'utilisation d'un antagoniste qui mime une partie extracellulaire de l'occludine a montré une augmentation de la perméabilité presque du même ordre par un essai Miles (Blaschuk et al., 2002). De même la délétion de la région N-terminal de l'occludine mène à une hyperperméabilité pour plusieurs traceurs de petites tailles (e.g. ~400 Da) (Bamforth et al., 1999). Il a également été montré que la régulation négative des occludines était directement relié à la perméabilité endothéliale induite par protéolyse ou par des agents de perméabilité tel le VEGF (Cummins, 2012; Murakami et al., 2009; Wachtel et al., 1999).

Paradoxalement, l'observation chez des cellules et des modèles de souris déficientes d'occludines, peut quand même mener à la formation de jonctions étanches et à un phénotype normal (Balda et

al., 1996; Saitou et al., 1998). Ces différences peuvent refléter des fonctions différentes des complexes de jonctions selon le contexte pathophysiologique ou les modèles étudiés (Saitou et al., 2000).

**Les claudines.** La structure et l'association subcellulaire des claudines sont similaires à celles des occludines, mais sont différentes dans leurs homologies séquentielles (Bazzoni et al., 2004; Furuse et al., 1998). Il y a plusieurs claudines identifiées à ce jour (Liu et al., 2016), exprimées différemment selon les tissus. De façon particulière, la claudine-5 est principalement exprimée dans la rétine avec une grande spécificité dans les cellules vasculaires endothéliales (Díaz-Coránguez et al., 2017; Luo et al., 2011; Morita et al., 2003; Morita et al., 1999). Les souris déficientes en claudine-5 présentent une dysfonction de la barrière hémato-encéphalique et une hyperperméabilité pour les molécules plus petites que 800 Da (Furuse, 2009; Nitta et al., 2003). Paradoxalement, cette déficience n'est pas associée à un œdème, tel que démontré par résonance magnétique (Nitta et al., 2003). Dans un contexte diabétique, il a été observé que l'hyperglycémie diminuait les niveaux de claudine-5 et d'occludine (Saker et al., 2014).

#### **1.4.3.2 Structure et fonctions des jonctions d'ancrage**

La perméabilité vasculaire est régulée en partie par les jonctions adhérentes, qui peuvent s'ouvrir ou se fermer de façon dynamique (Dejana et al., 2008). La VE-cadhérine est la composante transmembranaire majeure des jonctions d'ancrage des CE de la iBHR (Collins et al., 1995; Lampugnani et al., 1995; Wallez et al., 2008). Son expression est spécifique à l'endothélium (Gory et al., 1999; Prandini et al., 2005). La VE-cadhérine est spécifiquement responsable de l'assemblage des jonctions d'adhésion, de l'architecture et du développement d'une barrière



endothéliale fonctionnelle (Gavard, 2014). Son domaine extracellulaire peut former des homodimères ou hexamères par la liaison de complexes trimériques de VE-cadhérines interendothéliales (Claesson-Welsh, 2015; Hewat et al., 2007). La force d'adhésion des complexes VE-cadhérines, qui est défini spécifiquement par leur capacité à supporter le stress mécanique du flux et de la pression sanguine, est régulée par leurs attachements aux cytosquelettes (Komarova Yulia et al., 2017). Le domaine intracellulaire de la VE-cadhérine contient plusieurs sites de liaison pour plusieurs protéines dont les caténines p120,  $\gamma$  et  $\beta$ , (Komarova Yulia et al., 2017; Wallez et al., 2008), qui permettent de médier une signalisation intracellulaire, l'attachement au cytosquelette et le contrôle du trafic intracellulaire (Brasch et al., 2011). Cette association intracellulaire aux caténines et à l'actine du cytosquelette est essentielle pour la stabilité des complexes et permet le contrôle de la perméabilité (Corada et al., 1999; Navarro et al., 1995). La  $\beta$ -caténine joue aussi un rôle dans la fonction de la barrière endothéliale, sa stabilité et sa plasticité (Corada et al., 2010; Paolinelli et al., 2013; Timmerman et al., 2012).

Les complexes formés par les VE-cadhérines jouent un rôle fondamental dans le contrôle de la perméabilité vasculaire entre le sang et le tissu interstitiel (Corada et al., 2001). Les déficiences fonctionnelles de VE-cadhérines chez les souris provoquent la désorganisation (Vittet et al., 1997), un désassemblage (Corada et al., 2001) et une désintégration des vaisseaux (Carmeliet et al., 1999). L'expression de VE-cadhérines mutées dans leurs domaines extracellulaires provoque une perméabilité chez des cellules microvasculaires endothéliales humaines (Venkiteswaran et al., 2002). De plus, l'utilisation d'anticorps ciblant le domaine extracellulaire mène à une déstabilisation de l'assemblage transendothélial des VE-cadhérines et augmente la perméabilité aux macromolécules (Corada et al., 2001). Chez les CE quiescentes, la VE-cadhérine

et le VEGFR2 interagissent mutuellement et fonctionnellement pour moduler la perméabilité (Gaengel et al., 2012; Weis et al., 2004). La VE-cadhérine influence l'activité de plusieurs autres médiateurs intracellulaires ou récepteurs tels le récepteur Tie-2, TGF $\beta$ -R2, et Alk1/Smad1,5,9 (Gavard, 2014; Rudini et al., 2008). Il a aussi été démontré que la VE-cadhérine stabilise le contact cellule-cellule par une signalisation bidirectionnelle et organise la barrière par une dynamique engageant le calcium et les microtubules (Komarova et al., 2012).

#### **1.4.4 Les membranes basales**

La membrane basale est une forme unique de la matrice extracellulaire qui sépare les CE des péricytes et astrocytes et qui joue un rôle actif dans les fonctions de l'unité neurovasculaire (Zlokovic, 2009). Il y a deux types de membranes basales dans le SNC, l'une enveloppant exclusivement les CE et l'autre qui englobe à la fois les péricytes et les CE (Xu et al., 2018). Outre son rôle dans le support structural, la membrane basale exerce plusieurs fonctions, comme la stabilité de l'endothélium par l'ancrage cellulaire et la signalisation. Elle est composée de plusieurs protéines matricielles qui interagissent avec nombreux récepteurs cellulaires en réponse à certains médiateurs tel que le VEGF (Zlokovic, 2009). De plus, elle peut agir en tant que réservoir pour plusieurs médiateurs angiogéniques, incluant le VEGF qui est libéré par l'activation des métalloprotéinases matricielles (MMP).

#### **1.4.5 Les cellules murales**

Situés du côté extérieur de la membrane basale, les péricytes sont des cellules contractiles périvasculaires qui jouent un rôle essentiel dans le maintien de la iBHR et sont en contact étroit avec les CE en conditions physiologiques (Chan-Ling et al., 2011; Cogan et al., 1984). Avec leurs

multiples processus cytoplasmiques, les péricytes jouent un rôle central chez plusieurs composantes de l'unité neurovasculaire et dans l'intégrité des micro-vaisseaux. Leur perte précoce en conditions pathologiques, comme dans le diabète, mène à un endothélium relativement instable (Bergers et al., 2005; Berthiaume et al., 2018) et rend les CE plus sensibles aux niveaux de VEGF (Park et al., 2017). Des études ont en effet montré que l'inhibition du VEGF mène à des vaisseaux instables par l'élimination des CE n'étant plus supportées par des péricytes (He et al., 2016; Shah et al., 2017). Outre la stabilisation des vaisseaux, les péricytes contrôlent le diamètre capillaire, le flux sanguin, la prolifération des CE et la néovascularisation. Plusieurs molécules modulent l'interaction entre les péricytes et les CE, telles le PDGF-B, TGF- $\beta$ , VEGF et l'angiopoïétine (Harris et al., 2014).

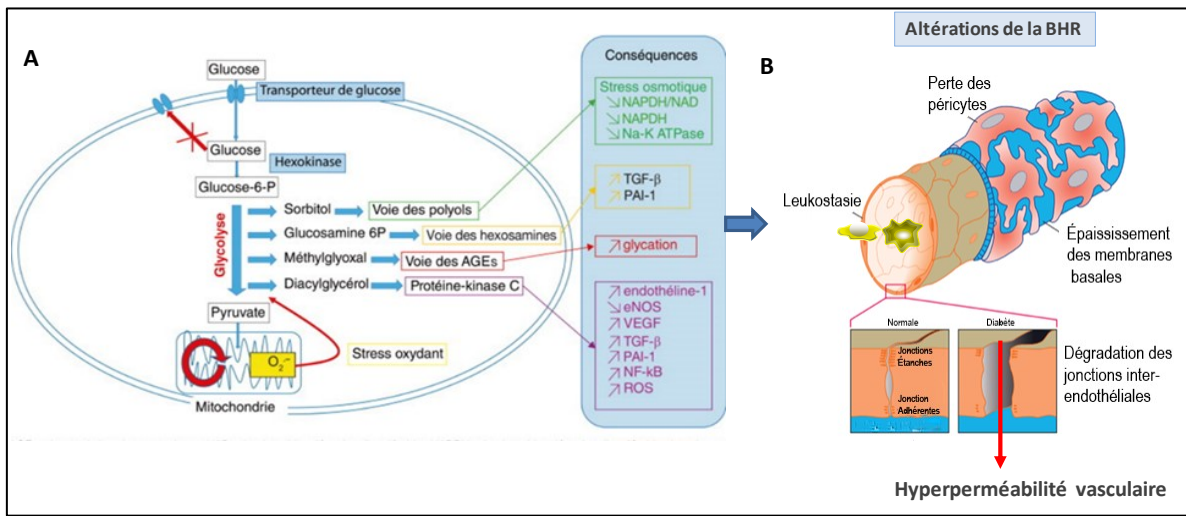
#### **1.4.6 Les cellules gliales et autres cellules de l'unité neurovasculaire**

Les cellules gliales sont localisées à l'interface entre les neurones et l'endothélium de la rétine (Sorrentino et al., 2016). Les astrocytes et les cellules de Müller sont deux types de cellules gliales ayant des processus qui enveloppent la lamina basale et les vaisseaux sanguins réiniens (Fletcher, Erica L et al., 2008; Klaassen et al., 2013). Bien que leur principale fonction est le recaptage des neurotransmetteurs des terminaisons synaptiques, les cellules gliales jouent un rôle crucial dans le maintien de la iBHR par l'absorption de nutriments et l'élimination des déchets en conditions physiologiques (Fletcher, E. L. et al., 2008; Shin, E. S. et al., 2014). En condition hyperglycémiques, les cellules gliales peuvent contribuer à la progression de la RD par l'augmentation de l'expression de VEGF et d'autres agents neuroactifs et cytokines (Ewing et al., 1998; Fletcher, Erica L et al., 2008). Ainsi, les cellules gliales en étant en étroite association avec les CE permettent de maintenir l'intégrité de la iBHR.

## 1.5 Dégradation de l'iBHR et l'hyperperméabilité

### 1.5.1 Altérations biochimiques causées par l'hyperglycémie contribuant à l'OMD

La dégradation de la iBHR est reconnue de nos jours comme étant la manifestation la plus précoce de l'OMD (Zhang, X. et al., 2014). Il y a 4 principales voies métaboliques hyperactives intercommunicantes en hyperglycémie impliquées dans la dysfonction de la iBHR menant à l'hyperperméabilité : la voie des polyols, des hexosamines, des AGE et celle des PKC (**Figure 1.10**). Une cinquième voie, celle des espèces réactives d'oxygène (ROS), peut être en aval ou en amont des autres voies. Ces ROS sont produits principalement par une suractivation de la phosphorylation oxydative en hyperglycémie (Arden et al., 2015; Chua et al., 1998; Ketema et al., 2015; Knels et al., 2008; Larger et al., 2015; Luo et al., 2016; Madamanchi et al., 2007; Rask-Madsen, Christian et al., 2013; Schalkwijk, Casper G. et al., 2005; Tang et al., 2012; Wang et al., 2007; Yan, 2018; Yan et al., 2010). Ces voies sont connues pour la production de nombreux médiateurs, dont le VEGF, et sont associées à l'OMD (**Figure 1.10 et section 1.5.2**) et impliquées dans la dégradation de la iBHR et l'hyperperméabilité, endommageant plusieurs cellules rétinienne de l'unité neurovasculaire (Aiello, 2002; Asnaghi et al., 2003; Biswas et al., 2017; Daruich et al., 2018; Das et al., 2015; Geraldès et al., 2009; Hammes et al., 2003; Klaassen et al., 2013; Larger et al., 2015; Lechner et al., 2017; Robinson et al., 2012; Romero-Aroca et al., 2016; Shin, E. S. et al., 2014; Singh et al., 2009; Titchenell et al., 2012; Urias et al., 2017; Xue et al., 2008; Zhang, X. et al., 2014).



**Figure 1.10. Altérations biochimiques en hyperglycémie altérant la iBHR menant à l’hyperperméabilité dans l’OMD.** (A) L’hexokinase engage le glucose intracellulaire en le convertissant en G6P qui est confiné dans l’espace intracellulaire ou en sorbitol qui change la pression osmotique et augmente le stress oxydatif. La voie des hexosamines mène à la glycosylation enzymatique de plusieurs protéines et accélère la formation des produits finaux de glycations avancées (AGE). Corrélant avec les niveaux glycémiques, les AGE sont des réactions irréversibles biochimiques non-enzymatiques entre le glucose et les macromolécules, telles les protéines, modifiant leurs fonctions. La synthèse du diacylglycérol est le principal activateur des protéines kinases C (PKC) qui induisent l’expression de plusieurs facteurs impliqués dans l’angiogenèse, tels le TGF-beta et le VEGF. La glycolyse suractivée en hyperglycémie mène aussi à l’augmentation de l’activité mitochondriale et la production des radicaux libres et d’espèces réactives d’oxygènes (ROS), qui sont aussi responsables de l’inhibition d’enzymes telles eNOS et de la production de VEGF. Voir texte pour les références sur les médiateurs. (B) Ces médiateurs altèrent les structures de la iBHR par la dégradation des jonctions interendothéliales, menant à l’hyperperméabilité. D’autres changements contributeurs incluent la perte des péricytes, l’épaississement des membranes basales et la leukostase. (Bilous et al., 2014; Das, 2016) (Schéma modifié de Larger et al 2015 et Bilous 2016).

### 1.5.2 Médiateurs de la perméabilité de l’iBHR hyperglycémique

Il existe une panoplie de médiateurs initiés par les altérations biochimiques causées par l’hyperglycémie qui créent un microenvironnement hypoxique et proinflammatoire menant à la

dysfonction de la BHR dans l'OMD (Chua et al., 1998; Kaji et al., 2007; Okamoto et al., 2002; Ola et al., 2012; Palimeri et al., 2015; Romero-Aroca et al., 2016; Stitt et al., 2000; Weigert et al., 2004). En effet, des changements dans la production de plusieurs facteurs de croissance (e.g. VEGF, TGF- $\beta$ ), d'agents proinflammatoires ou de molécules d'adhésion (e.g. ICAM-1, VCAM, sélectines et intégrines), eicosanoïdes(e.g. Cox-2), des chemokines (e.g. MCP1, IL-8), des cytokines (e.g. IL-6, IL-12 et TNF- $\alpha$ ) et des protéases extracellulaires (MMP) (Daruich et al., 2018; Homme et al., 2018; Klaassen et al., 2013; Romero-Aroca et al., 2016; Rubsam et al., 2018) ont été observés suite à une hyperglycémie chronique.

Plusieurs de ces médiateurs se retrouvent en excès dans l'humeur aqueuse et surtout dans l'humeur vitrée de patients souffrant d'OMD (Daruich et al., 2018; Rubsam et al., 2018) et qui corrélient avec l'épaississement maculaire. Ces facteurs incluent l'IL-6 (Funatsu et al., 2009), l'IL-8 (Lee et al., 2012), ICAM-1 (Funatsu et al., 2005) MCP-1 (Funatsu et al., 2009) et le VEGF, qui est très fortement augmenté (Daruich et al., 2018; Funatsu et al., 2005; Sonoda et al., 2013). Il n'est pas surprenant de voir que plusieurs de ces médiateurs ont un rôle majeur dans l'induction de la perméabilité vasculaire rétinienne (Daruich et al., 2018), dont l'IL-6 (Yun et al., 2017), IL-8 (Yu et al., 2013) et le VEGF (Antonetti, Lieth, et al., 1999; Behzadian et al., 2003; Schepke et al., 2008). Fait remarquable sur le VEGF, il a été estimé qu'il était ~50 000 fois plus puissant que l'histamine dans l'induction de la perméabilité vasculaire (Senger et al., 1990).

Les recherches des 25 dernières années ont mis en lumière plusieurs des mécanismes impliqués dans la dégradation de la iBHR et ont mené à des thérapies très efficaces qui font partie des traitements de pointe contre la perméabilité maculaire rétinienne, dont l'utilisation des anti-VEGF

(Daruich et al., 2018). Ces médiateurs compromettent l'intégrité des jonctions intercellulaires et l'intercommunication de l'unité neurovasculaire menant à la dégradation de la BHR et à l'hyperperméabilité.

### **1.5.3 Mécanismes majeurs menant à l'hyperperméabilité**

Bien que l'OMD soit multifactorielle, plusieurs recherches ont permis d'élucider les mécanismes potentiels qui peuvent mener à la dégradation de la iBHR. Les mécanismes de perméabilité vasculaire rétiniens et choroïdiens impliquent de nombreux médiateurs/récepteurs tels VEGF/VEGFR2, le facteur placentaire de croissance PIGF/VEGFR1, Ang-2/Tie2; Bradykinine BK/B2R-B1R, Angiotensine II, Aldostérone/MR, les composantes du complément C3a et C5a, TNF- $\alpha$ /TNFR, TGF $\beta$ ; IL-1 $\beta$ , IL-6 et IL-8 (Daruich et al., 2018). Ces mécanismes coexistent souvent dans la pathophysiologie de l'OMD et contribuent à l'augmentation de la perméabilité par les altérations de l'intégrité des jonctions, la perte des CE ou leurs rétractions, la perte des autres cellules de l'unité neurovasculaire incluant les péricytes et cellules gliales qui sont toutes impliquées dans la dégradation de la iBHR (Daruich et al., 2018).

### **1.5.4 Altérations des jonctions dans l'hyperperméabilité de l'iBHR**

#### **1.5.4.1 Altérations des jonctions étanches occludines**

L'hyperglycémie chronique induite dans un modèle murin diabétique-STZ mène à une diminution des niveaux d'occludines, qui est associée à une augmentation de la perméabilité de la iBHR à l'albumine de près de 35% dans les microvaisseaux rétiniens (Antonetti et al., 1998). Il a été rapporté que l'hyperglycémie diminuait les niveaux des jonctions étanches par leur dégradations dans la rétine et que l'exposition des CE rétiniennes humaines (HREC) à une hyperglycémie (25

mM) diminuait les niveaux d'occludines et claudine-5 induisant une hyperperméabilité (Saker et al., 2014; Stewart et al., 2016). Le mécanisme menant à ces diminutions serait possiblement médié par angiopoïétine-2, qui est augmentée en conditions hyperglycémiques (Stewart et al., 2016). Comparativement à l'endothélium rétinien, l'endothélium choroïdien humain a montré être peu affecté dans les mêmes conditions hyperglycémiques (25 mM) pour les niveaux de ces mêmes protéines, occludines et claudine-5 (Saker et al., 2014).

La réduction des niveaux d'occludines en conditions diabétiques provoque une hyperperméabilité de la iBHR (Antonetti et al., 1998). Parmi les molécules des jonctions étanches, la régulation négative de l'occludine médié principalement par le VEGF, est sans nul doute le mécanisme le plus rapporté à être impliqué dans la dégradation de la BHR (Klaassen et al., 2013). Il a été montré que l'effet du VEGF provoquant l'hyperperméabilité passe par la phosphorylation de l'occludine menant à son internalisation et ubiquitination (Antonetti, Barber, et al., 1999; Erickson et al., 2007; Murakami et al., 2009; Sundstrom et al., 2009). Cette modification postraductionnelle peut mener à la dégradation de l'occludine via le système ubiquitine-protéasome, mais peut aussi contribuer à réguler de multiples autres fonctions biologiques incluant le trafic intracellulaire et la leukostasie (Murakami et al., 2009; Sundstrom et al., 2009). Cet effet du VEGF implique l'activation de la signalisation des kinases PKC $\beta$  (Harhaj et al., 2006; Liu et al., 2016; Murakami et al., 2012) et celle des Src (Scheppke et al., 2008). Cette dernière kinase s'associe en effet préférentiellement au VEGFR2 et joue un rôle crucial pour médier la signalisation au VEGF dans la perméabilité et l'angiogenèse (Chou et al., 2002). En effet, il a été démontré in vivo que l'ablation de Src empêche la perméabilité rétinienne induite par le VEGF chez la souris (Scheppke et al., 2008).



Certaines études ont aussi montré que le VEGF pouvait dégrader l'occludine via l'activation des protéinases uPar (Behzadian et al., 2003) et les métalloprotéinases matricielles (MMP) en conditions inflammatoires ou hyperglycémiques (Behzadian et al., 2001; Giebel et al., 2005). Ces études démontrent l'importance de l'hyperglycémie comme condition étiologique dans la pathophysiologie de l'OMD qui peut incorporer et amplifier plusieurs mécanismes hypoxiques et inflammatoires menant la dégradation des complexes étanches de la iBHR.

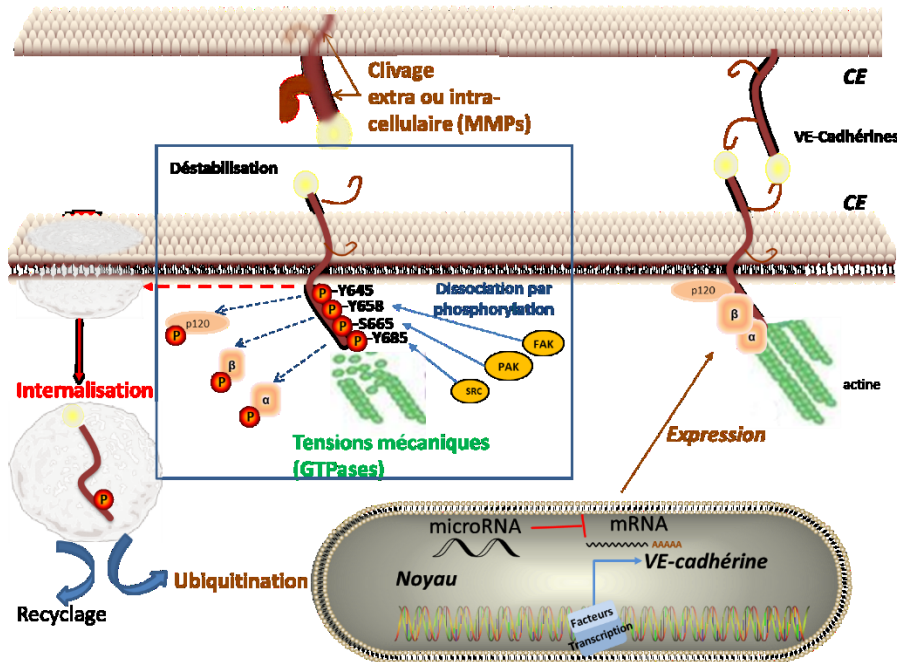
#### **1.5.4.2 Altérations des jonctions d'ancrage VE-cadhérines**

Plusieurs mécanismes mènent au désassemblage et à la perte de fonction du complexe VE-cadhérines dans la iBHR (Wallez et al., 2008). Ceci peut s'effectuer par plusieurs voies menant à la perméabilité vasculaire (Gavard, 2014). La phosphorylation des VE-cadhérines joue un rôle majeur dans le contrôle de la perméabilité vasculaire. FAK, PAK et Src peuvent phosphoryler la partie C-terminale du domaine cytoplasmique de VE-cadhérine sur plusieurs tyrosines compromettant l'intégrité de la barrière endothéliale et la perméabilité ou la phosphorylation des résidus sérines impliqué dans l'assemblage des jonctions d'ancrage (Adam, 2015; Dejana et al., 2008; Potter et al., 2005; Sidibé, Adama et al., 2014; Turowski et al., 2008). Les résidus phosphorylés contrôlent l'activité de la VE-cadhérine. Par exemple, pY685 contrôle la perméabilité contrairement aux Y645, Y731 et Y733 qui sont impliqués dans la diapédèse, qui est l'infiltration de leucocytes entre les CE (Dejana et al., 2008; Sidibé, Adama et al., 2014; Sidibé, A. et al., 2014) ou la S665 qui joue un rôle dans la perméabilité induite par une tension mécanique (e.g. hypertension ou flux sanguin) (Gavard, 2014; Gavard et al., 2006; Tzima et al., 2005; Wojciak-Stothard et al., 2002).

Ces phosphorylations mènent à la dissociation des complexes VE-cadhérines/caténines induisant leurs détachements du cytosquelette, leurs internalisations et dégradations (Gavard, 2014; Wallez et al., 2008). Les vaisseaux quiescents sont caractérisés par des complexes VE-cadhérines stables et peu phosphorylés (Komarova Yulia et al., 2017; Wallez et al., 2008), car la VE-cadhérine est associée à plusieurs phosphatases qui la déphosphorylent (Wallez et al., 2008). En conditions diabétiques hyperglycémiques il y a augmentation des niveaux de VEGF, ce qui mène à l'internalisation de VE-cadhérine et sa dégradation suite à une phosphorylation rapide et transitoire, menant à une hyperperméabilité (Esser et al., 1998). La transduction de ce mécanisme débute par la liaison du VEGF sur le récepteur VEGFR2 qui provoque son activation par sa phosphorylation de la tyrosine Y951 (Koch, Sina et al., 2011; Sun et al., 2012; Wessel et al., 2014). En conséquence, Src kinase qui s'associe préférentiellement au VEGFR2, est phosphorylé (Chou et al., 2002), ce qui mène à la phosphorylation de la tyrosine Y685 de la VE-cadhérine (Wallez et al., 2007). Cette phosphorylation et la dissociation des composantes intracellulaires p120 et  $\beta$ -caténine, mène à l'endocytose et la dégradation de VE-cadhérine (**Figure 1.11**) (Koch, S. et al., 2011; Komarova Yulia et al., 2017; Rahimi, 2017). L'activation du VEGFR2 mène aussi à une déstabilisation jonctionnelle des VE-cadhérines par phosphorylation d'eNOS et son activation dans la production de l'oxyde nitrique médiée par la voie PI3K/AKT (Di Lorenzo et al., 2013; Duran et al., 2010; Rahimi, 2017; Sun et al., 2012). Bien que le VEGF soit considéré comme le facteur primaire impliqué dans l'altération des fonctions vasculaires menant à l'OMD, d'autres mécanismes peuvent y participer. Les CE rétiniennes humaines (CERH) hyperglycémiques (30.5 mM) et les tissus rétiniens murins diabétiques STZ ont aussi montré la réduction des niveaux de VE-cadhérines modulée par Ang-2 par un mécanisme médié par la phosphorylation en position

Y658 (Rangasamy et al., 2011).

L'expression et les niveaux de VE-cadhérines peuvent être modulés au niveau transcriptionnel, par miRNA ou par une régulation post-translationnelle par clivage intracellulaire ou extracellulaire, ou encore dégradé par ubiquitination ou dans les lysosomes (**Figure 1.11**) (Gavard, 2014). Son domaine extracellulaire est très sensible à la dégradation par des protéases telles les métalloprotéases matricielles (MMP), qui sont augmentées en conditions diabétiques, contribuant à la diminution de leur disponibilité aux jonctions intercellulaires à la surface membranaire (Navaratna et al., 2007). Des mécanismes en conditions inflammatoires impliquant le TGF- $\beta$  et l'IL-1 $\beta$  ont montré la réduction des niveaux des protéines VE-cadhérine concomitante à l'hyperperméabilité des CE microvasculaires humaines en culture (Matsuda et al., 2015). Les mêmes effets ont été observés sur des CE microvasculaires hyperperméables de cerveaux humains, démontrant une diminution non seulement des niveaux de protéines VE-cadhérines mais incluant les jonctions étanches occludines et claudines-5 en réponse aux agents proinflammatoires IL-6 et TNF- $\alpha$  (Rochfort et al., 2014).



**Figure 1.11. Principales voies modulant le désassemblage des VE-cadhérines aux jonctions interendothéliales.** Par modification post-traductionnelle, la phosphorylation des VE-cadhérines au C-terminal peut les dissocier de leurs composantes intracellulaires et les déstabiliser. Cette modification de la VE-cadhérine peut mener à son internalisation par endocytose et sa dégradation subséquente (encadré bleu), diminuant sa présence aux jonctions CE-CE. Les niveaux de VE-cadhérine sont aussi régulés au niveau transcriptionnel (microARN, ARNm) ou par des modifications post-traductionnelles par ubiquitination ou encore des clivages par les protéases (Brun) (Gavard 2014).

### 1.5.4.3 Altérations des composantes vasculaires

L'altération des jonctions interendothéliales est potentiellement une des premières altérations moléculaires dans l'OMD vasogénique. La dégradation de la iBHR peut aussi résulter de la perte des CE et des péricytes, ceci étant parmi les signes les plus précoces et les plus spécifiques dans la RD et l'OMD (Antcliff et al., 1999; Ciulla et al., 2003; Hammes et al., 2011). Certains ont ainsi proposé que l'apoptose des CE pourrait être due à la perte des péricytes (Shin et al 2014), ce qui corrèle avec les microanévrismes observés cliniquement (Kuwabara et al., 1963; Speiser et al., 1968). Dans des modèles expérimentaux de diabète de type 1 et de type 2, il a été ainsi démontré

une perte par apoptose des cellules microvasculaires endothéliales et péricytaires qui est induite par un mécanisme impliquant le TNF- $\alpha$  (Behl et al., 2008). Plusieurs mécanismes supplémentaires sont aussi impliqués dans la perte des cellules péricytaires (Daruich et al., 2018; Klaassen et al., 2013; Shin, E. S. et al., 2014). Ainsi des modèles mécanistiques ont suggéré que la perte des péricytes des capillaires réiniens s'effectuait plus tôt que celle des CE, menant à des capillaires acellulaires qui à leur tour génèrent des régions tissulaires non perfusées et augmentant l'hyperperméabilité de la rétine diabétique (Hammes et al., 2011). Des études ont aussi montré que l'absence de péricytes autour des microvaisseaux menait à la surproduction de plusieurs facteurs impliqués dans la pathophysiologie de l'OMD et RD, tels qu'une surproduction de VEGF, Ang2 et une diminution d'Ang1 (Daneman et al., 2010; Hellström et al., 2001). Ces mécanismes en hyperglycémie chronique affectent la signalisation stabilisatrice Ang1/Tie2, menant au détachement, à la migration et à l'apoptose des péricytes et à une vasorégression progressive (Hammes et al., 2011). De plus, l'hyperglycémie induit l'apoptose des cellules péricytaires via les ROS/NFkB et compromet leur survie par l'inhibition de la signalisation VEGFR2/PDGFR via l'activation des PKC/SHIP (Ejaz et al., 2008; Geraldès et al., 2009; Rask-Madsen, Christian et al., 2013; Shin, Eui Seok et al., 2014). Plus récemment, il a été démontré que dans un contexte proinflammatoire, un mécanisme induisant l'apoptose des péricytes serait médié par le TGF- $\beta$  produit par les microglies réiniennes humaines dans la rétinopathie diabétique non proliférative (RDNP) (Betts-Obregon et al., 2016). Pris ensemble, les conditions hyperglycémiques induisent plusieurs mécanismes menant à la perte des EC et péricytes, ce qui compromet l'intégrité et les fonctions de la iBHR et peut mener à l'hyperperméabilité rencontré dans l'OMD. En plus de ces altérations cellulaires, il est à considérer l'épaississement des membranes basales et la leukostasie permettant la diapédèse, qui sont aussi des caractéristiques non-négligeables et qui peuvent

perturber l'hémodynamique circulatoire et amplifier la réponse proinflammatoire, ce qui ajoute ainsi à la complexité de la pathophysiologie de l'OMD (Ciulla et al., 2003).

## **1.6 Facteurs protecteurs et traitements de l'OMD**

### **1.6.1 Facteurs protecteurs endogènes**

Plusieurs mécanismes de protection vasculaire peuvent être altérés dans le diabète, la RD ou la OMD comme la signalisation de l'insuline ou encore le PEDF, l'endostatine et l'angiostatine, les facteurs neurotrophiques BDNF ou CNTF, ou le niveau d'enzymes anti-oxydantes (Kim, J. et al., 2013; Rask-Madsen, Christian et al., 2013; Romero-Aroca et al., 2016). Présentement un des traitements standards pour la prévention et le traitement de l'OMD est la neutralisation de la signalisation du VEGF. Bien qu'ayant des bienfaits cliniques certains, l'utilisation des anti-VEGF présente aussi des risques pour la fonction visuelle puisque le VEGF est un facteur neuroprotecteur nécessaire à la survie des cellules de l'unité neurovasculaire.

### **1.6.2 Facteurs protecteurs thérapeutique de l'OMD : les anti-VEGF**

La rétine ayant une haute demande en nutriments et oxygène, elle est plus facilement assujettie à devenir hypoxique suite aux altérations microvasculaires diabétiques. L'hypoxie associée à l'hyperglycémie peut mener à la stabilisation du facteur de transcription hypoxique HIF-1 $\alpha$ , qui induit la production du VEGF pour perfuser le tissus. Le haut taux de glucose peut à lui seul stabiliser HIF-1 $\alpha$  même en présence d'oxygène par l'effet Warburg. Le VEGF-A (i.e. VEGF), est aussi appelé facteur de perméabilité vasculaire qui est un régulateur majeur de la déstabilisation

de la BHR et de l'induction de la perméabilité vasculaire en condition pathologique (Rahimi, 2017; Zhang, X. et al., 2014). Le VEGF-A est le plus étudié de la famille des VEGF, qui inclut le VEGF-B, -C, -D, -E et le facteur placentaire de croissance (PlGF) (Ferrara et al., 1997; Zhang, X. et al., 2014). Le VEGF-A a plusieurs isoformes dont la plus abondante est le VEGF-165 (Zhang, Xinyuan et al., 2014). Trois récepteurs tyrosines kinases sont connus pour transmettre le signal du VEGF : les récepteurs VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (FLK-1) et VEGFR3 (FLT-4). Chez l'humain, le VEGFR1 est exprimé dans les capillaires quiescents rétiens, contrairement au VEGFR2 et VEGFR3 qui sont peu présents (Witmer, Antonella N. et al., 2002). Cependant VEGFR2 et VEGFR3 sont augmentés dans les capillaires rétiens diabétiques humains ou par l'action du VEGF et sont colocalisés spécifiquement aux régions d'hyperperméabilité (Witmer, A. N. et al., 2002). Des études ont aussi montré que le VEGFR2 était aussi exprimé par les cellules de Müller (Fu et al., 2015) et au niveau des couches neuronales rétiennes et a fonctionnellement un rôle important dans la neuroprotection (Fu et al., 2015; Nishijima et al., 2007). Bien que le VEGFR1 et VEGFR2 soient tous deux activés par le VEGF, le VEGFR2 est reconnu comme étant le médiateur prédominant du VEGF dans la déstabilisation des jonctions endothéliales (Rahimi, 2017) et un important régulateur de la perméabilité vasculaire et de l'angiogenèse, et essentiel à la survie cellulaire, la neurogenèse et la synaptogenèse (Cébe-Suarez et al., 2006; Hombrebueno et al., 2015). À l'opposé, le VEGFR1 a été décrit comme un leurre et antagonise l'action du VEGF (Gille et al., 2001). Les voies majeures dans l'induction de la perméabilité médiée par l'activation du VEGFR2 impliquent la phosphorylation des VE-cadhérines, p120- et  $\beta$ -caténines, et celles médiées par eNOS/NO (Rahimi, 2017).

Le VEGF est un important contributeur à la RD et l'OMD et contribue à l'épaississement de la macula (Zhang 2014). Les injections de protéines neutralisant le VEGF ont montré généralement de grands bénéfices en renversant l'épaississement de l'œdème maculaire et en améliorant l'acuité visuelle tout en rétablissant la dépression de la fovéola (Koyanagi et al., 2018; Sophie et al., 2015; Wells et al., 2016; Willmann et al., 2017). Pour cette raison, le développement d'inhibiteurs du VEGF est considéré comme l'un des avancements les plus significatifs de la médecine moderne (Cheung et al., 2014). Ces agents sont devenus le traitement standard de l'OMD, surclassant les traitements maculaires locaux au laser, vitrectomies et corticostéroïdes (Tsai et al., 2017; Wells et al., 2016). Cependant cette approche thérapeutique présente plusieurs effets secondaires et complications qui sont non négligeables, incluant l'atrophie géographique rétinienne, la perte de photorécepteurs (Rofagha et al., 2013), l'inflammation intraoculaire, des endophtalmies, l'élévation de la pression intraoculaire, des détachements rétiens, des hémorragies oculaires et même des effets systémiques puisque les anti-VEGF par injection intraoculaire se retrouvent dans la circulation en quantité significative (Diago et al., 2009; Falavarjani, K. G. et al., 2013). De plus, ce ne sont pas tous les patients ayant l'OMD qui répondent aux traitements anti-VEGF (Blinder et al., 2017; Koyanagi et al., 2018). De plus, les patients qui répondent peuvent, après quelques années d'injections, avoir des accumulations de fluides récurrentes et épisodiques intra rétiniennes associées à une diminution de l'acuité visuelle (Channa et al., 2014). Expérimentalement, il a été observé que les traitements soutenus d'anti-VEGF chez des souris diabétiques pouvaient exacerber la perméabilité vasculaire à l'albumine, induire un enflément de la fovéa, la détérioration des photorécepteurs, une déstabilisation des structures synaptiques et la perte des cellules amacrines et ganglionnaires, le tout accompagné d'une perte potentielle de fonction rétinienne (Hombrebueno et al., 2015). Ainsi il serait important de considérer des approches

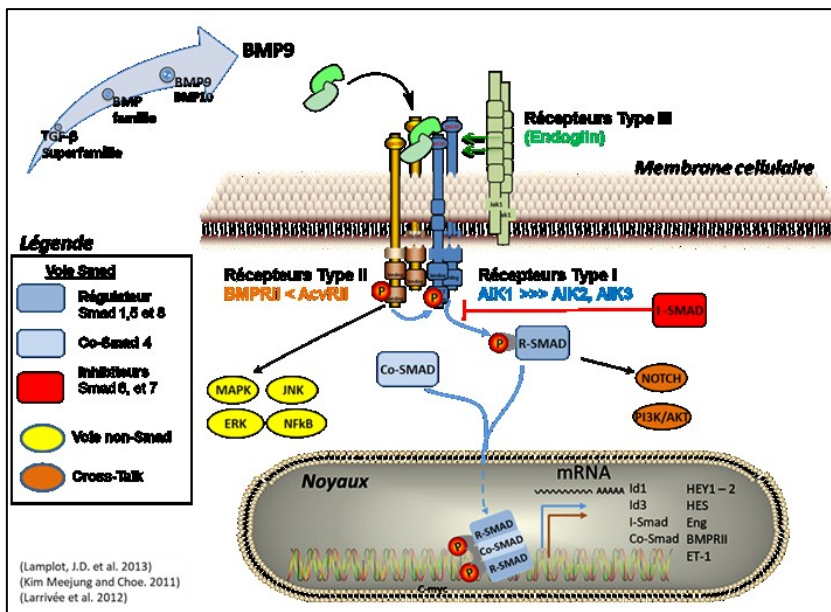


alternatives qui pourraient non seulement protéger les vaisseaux en préservant leur intégrité et leur stabilité jonctionnelle en conditions hyperglycémiques diabétiques, mais aussi qui auraient une action plus spécifique sur l'endothélium que celle des anti-VEGF, dont les récepteurs sont nécessaires à plusieurs autres cellules de l'unité neurovasculaire, pour prévenir des dommages collatéraux de la neurorétine.

## 1.7 La signalisation BMP9/Alk1 protectrice des vaisseaux

Le récepteur Alk1 (*activin receptor-like kinase type 1*) et ses ligands physiologiques, les protéines morphogénétique osseuse-9 et 10 (BMP9 et BMP10), jouent un rôle majeur dans le développement et la maturation des vaisseaux sanguins. Ces BMP font parties de la superfamille des cytokines TGF- $\beta$ , qui regroupe une quarantaine de protéines identifiées chez l'humain et sont subdivisées en plusieurs sous-familles (Ricard et al., 2011). La sous-famille des BMP inclue une quinzaine de membres dont plusieurs ont démontré des effets sur l'endothélium vasculaire, telles les BMP1, 2, 4, 7, 9 et 10 (Dyer et al., 2014; Santibañez et al., 2011). Leur expression distincte est régulée de façon spatio-temporelle avec une action qui est spécifique au tissu et dépend des récepteurs présents, ce qui permet un contrôle versatile de leurs signalisations (Erickson et al., 2003; Lembong et al., 2008; Lowery et al., 2010; Paralkar et al., 1998). Les BMP offrent une variété de possibilités de signalisation par la diversité de leurs complexes hétérodimériques localisés à la surface membranaire qui comprennent principalement deux types de récepteurs sérine/thréonine kinases appelés Type I et II. Il y a 7 types de récepteurs de type I, qui incluent Alk1 à Alk7. Parmi ces récepteurs, seulement Alk1, 2, 3, 6 et 7 sont connus pour transmettre la

signalisation des BMP et peuvent former différents complexes hétérotétramériques en s'associant aux récepteurs de types II, BMPRII, ActRIIA et IIB (Herrera et al., 2014). De plus, pour ajouter à la complexité des réponses fonctionnelles des BMP, des récepteurs de types III, qui incluent l'endogline et le betaglycan, peuvent aussi être recrutés aux complexes formés par les récepteurs de type I et II et contribuent à cette spécificité pour moduler la signalisation (Tillet et al., 2018). La transmission des signaux générés par les BMP impliquent ainsi trois types de récepteurs qui peuvent se complexer, avec des degrés différents d'affinités pour la BMP9, afin de permettre la transduction du signal intracellulaire qui s'effectue principalement par la voie canonique des facteurs de transcriptions Smad1, 5 et 8 (Kim et al., 2011; Lamplot et al., 2013; Larrivee et al., 2012; Leblanc et al., 2013) (**Figure 1.12**)



**Figure 1.12. Mécanismes d'action de la protéine morphogénétique osseuse 9 (BMP9).** La BMP9 (et la BMP10) induit la transduction du signal par les récepteurs hétérotétramères sérine/thréonine kinase composés de deux récepteurs de type I et deux récepteurs de types II (> ou < représentent l'affinité comparative de la BMP9). Une fois que la BMP9 se lie aux récepteurs, l'initiation de la transduction du signal s'effectue via la voie canonique Smad, ou encore non-Smad ou non canoniques. Dans la voie canonique le récepteur de type I (i.e. Alk1) phosphoryle

les R-Smad (i.e. Smad1, 5 et 9), qui s'associent ensuite avec un médiateur commun, Smad4 (Co-Smad), qui va être transloqué au noyau pour ainsi se lier à l'élément BRE (BMP Responsive element), présent dans les promoteurs de multiples gènes, pour activer la transcription de gènes cibles. Il y a plusieurs promoteurs/inhibiteurs extracellulaires/intracellulaires de la signalisation des BMP (i.e. Smad6 et 7) qui peuvent être une cible de la signalisation des BMP (Leblanc, 2013) (Kim et al., 2011; Lamplot et al., 2013; Larrivee et al., 2012).

### **1.7.1 Structure et fonction du ligand BMP9**

La BMP9 (aussi connu sous le nom de GDF2) est une protéine circulante qui est principalement produite par les cellules hépatiques (Bidart et al., 2012; Leblanc et al., 2013; Miller et al., 2000). Chez la souris, ses concentrations augmentent lors du développement jusqu'à atteindre un pic trois mois après la naissance pour ensuite redescendre à l'âge adulte à des concentrations de ~2 ng/mL (Bidart et al., 2012). La biosynthèse de la BMP9 procède par la sécrétion de la protéine précurseur pré-pro-BMP9 ayant trois régions qui incluent la région du peptide signal, un long prodomaine (33 kDa) et la protéine mature (12,5 kDa) (Bidart et al., 2012). Après une série de transformations suivant une homodimérisation et clivages protéolytiques, les deux formes actives sont générées suite à une liaison des sous-unités par des ponts disulfures, l'une étant un homodimère composé de deux protéines matures de 25 kDa et l'autre de 100 kDa composé d'un homodimère de la protéine mature et de son prodomaine (Bidart et al., 2012). Pouvant s'hétérodimériser et conserver leurs activités, la BMP9 et BMP10 ont près de 65% d'homologie séquentielle au niveau de la protéine et ont une très grande affinité et spécificité pour Alk1 (David et al., 2007; Scharpfenecker et al., 2007; Tillet et al., 2014; Townson et al., 2012). La BMP9 est reconnue comme une puissante activatrice de la signalisation d'Alk1 dans les CE, qui peut être modulée par les récepteurs de types II et optimisée par le récepteur de type III endogline (Tian et al., 2012). Outre ses effets dans la formation osseuse (Leblanc, 2013), la BMP9 présente aussi des effets sur la chondrogenèse,

neurogenèse, l'hépatorégénération et dans le développement vasculaire (Leblanc et al., 2013). 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 et ces souris présentent des défauts importants dans la maturation de ce réseau (Levet 2013). La BMP9 joue aussi un rôle important dans la formation et maintenance des vaisseaux sanguins : il a été démontré que la BMP9, tout comme la BMP10, joue un rôle critique dans le remodelage vasculaire rétinien, de par ses effets sur la quiescence vasculaire. (Chen, H. et al., 2013; David et al., 2008; David et al., 2007; Ouarne et al., 2018; Ricard, 2013; Ricard et al., 2011; Ricard et al., 2012). Enfin, il a aussi été démontré que la BMP9 joue un rôle dans le contrôle de l'homéostasie du glucose et la sensibilité à l'insuline (Chen et al., 2003; Leblanc et al., 2013). Contrairement à la BMP9, la BMP10, qui est aussi un ligand spécifique de Alk1, joue un rôle plus spécifique dans le développement cardiaque embryonnaire, et semble avoir peu de rôle dans la vie post-natale, puisque ses niveaux diminuent drastiquement à la naissance chez la souris (Chen et al., 2004).

### **1.7.2 Structure du récepteur de type I : Alk1**

Spécifique à l'endothélium (Massague, 1998), Alk1 est le produit du gène *Activin receptor-like kinase de type 1 (ACVRL1)*, et est une protéine transmembranaire sérine/thréonine kinase appartenant à la famille des récepteurs TGF $\beta$  de type I (Attisano et al., 1993). Alk1 est composé de trois domaines : un domaine extracellulaire, une région cytoplasmique et une région intracellulaire. La partie extracellulaire peut être composée d'un peptide signal qui est clivé pour générer un Alk1 mature. La partie intracellulaire contient la région GS juxtamembranaire 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 (Gonzalez-Nunez et al., 2013). Cette activation 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 (Attisano et al., 1993).

### **1.7.3 Structures des récepteurs de type II et III**

Il existe trois récepteurs de type II auxquels Alk1 peut s'associer, BMPR2, ActRIIA et ActRIIB, pour intégrer le signal des BMP (Donaldson et al., 1992; Rosenzweig et al., 1995; Yu et al., 2005). Les récepteurs de types II ont des structures similaires aux récepteurs de type I et comprennent trois domaines : extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire, ayant un sous-domaine sérine /thréonine kinase dans la région intracellulaire mais sans une région GS comme les récepteurs de type I (Donaldson et al., 1992; Mueller et al., 2012; Rosenzweig et al., 1995; Wrana et al., 1994; Yu et al., 2005). Ayant été identifié comme biomarqueur spécifique à l'endothélium, le co-récepteur accessoire endoglin (Fonsatti et al., 2001), est requis (Nolan-Stevaux et al., 2012) et essentiel à la signalisation BMP9/Alk1 dans l'endothélium (Gougos et al., 1988; Saito et al., 2017). Cette glycoprotéine transmembranaire homodimérique n'ayant pas de domaine kinase (Nolan-Stevaux et al., 2012) est exprimée à de hautes concentrations dans les cellules vasculaires endothéliales et est capable de lier plusieurs cytokines de la famille TGF- $\beta$  (Gougos et al., 1988; Wong et al., 2000) avec une très grande affinité (Castonguay et al., 2011; Scharpfenecker et al., 2007). L'endogline peut aussi s'associer avec un autre récepteur accessoire du même ordre, le betaglycan, mais aussi avec les complexes des récepteurs de type I et II (Lowery et al., 2010; Wong et al., 2000; Yamashita et al., 1994; Zhang et al., 1996).

#### **1.7.4 Expression physiopathologique d'Alk1 dans l'endothélium**

Pendant le développement, l'expression d'Alk1 est observée dans plusieurs tissus et organes, mais son expression est particulièrement enrichie dans l'endothélium. Durant le développement embryonnaire, son expression reste élevée dans les régions de vasculogénèse et dans les vaisseaux naissants durant la phase angiogénique au moment de la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (Roelen et al., 1997). Des études ont aussi montré qu'Alk1 aurait un rôle critique dans l'artérialisation et le remodelage vasculaire dans les artères en développement (Seki et al., 2003). Il est intéressant de noter que Eng présente un pattern d'expression identique à celui d'Alk1 (Jonker et al., 2002). Bien que les niveaux d'Alk1 puissent être réduits à l'âge adulte (Seki et al., 2003), l'expression transcriptionnelle d'Alk1 reste élevée dans les microvaisseaux de plusieurs organes, tels que le poumon (Miller et al., 2000; Panchenko et al., 1996) et le cerveau (Ge et al., 2017). Les produits de transcription d'Alk1 ont aussi été détectés dans les rétines de souris et l'expression de sa protéine se retrouve préférentiellement dans les vaisseaux sanguins rétiniens de la iBHR (Ntumba et al., 2016). En conditions pathologiques, Alk1 est surexprimé dans l'endothélium de plusieurs types de tumeurs (Hu-Lowe et al., 2011). Dans la rétine hypoxique, l'expression d'Alk1 est induite significativement relativement à d'autres récepteurs de type 1 (Ntumba et al., 2016). À notre connaissance son expression dans la rétine diabétique n'a pas encore été documentée.

#### **1.7.5 Spécificité d'action de la voie BMP9/Alk1 dans l'endothélium**

Le récepteur Alk1 a longtemps été considéré orphelin, jusqu'à ce que les BMP9 et BMP10 soient identifiés comme ligands de grande affinité dans les CE (Brown et al., 2005; David et al., 2008; Lux et al., 1999). D'autres groupes ont également démontré que la BMP9 et la BMP10 étaient les

seuls ligands d'Alk1 de la famille TGF- $\beta$  pouvant activer la signalisation Smad1,5,9 dans les cellules primaires endothéliales par l'intermédiaire de Alk1 (David et al., 2007; Mitchell et al., 2010; Nolan-Stevaux et al., 2012; Scharpfenecker et al., 2007). Les ligands physiologiques d'Alk1, la BMP9 et BMP10 s'y lient avec une grande affinité de l'ordre du picomolaire ( $EC_{50} = 23$  pM) comparativement aux autres récepteurs Alk2, Alk3 et Alk7 qui ont une affinité de l'ordre du nanomolaire (Brown et al., 2005; Coskuner et al., 2017; Mi et al., 2015; Scharpfenecker et al., 2007; Shao, Esther S. et al., 2009). Les BMP9 et BMP10 ont aussi une plus grande affinité pour Alk1 comparativement aux autres BMP pour leurs récepteurs spécifiques (David et al., 2009; David et al., 2008; Tillet et al., 2014).

## **1.7.6 Intégration fonctionnelle du signal BMP9/Alk1 dans l'endothélium**

### **1.7.6.1 Signalisation canonique de quiescence Smad1,5,9**

Le domaine kinase intracellulaire des récepteurs de types II étant constitutivement activé, le complexe assemblé par la BMP9 rapproche les domaines intracellulaires des récepteurs permettant la phosphorylation d'Alk1 aux domaines GS. Cette activation d'Alk1 permet de réguler la transcription de plusieurs gènes spécifiques. Plusieurs études transcriptomiques indépendantes sur les CE stimulées par la BMP9 ou ayant Alk1 constitutivement activé montrent l'induction de plusieurs gènes impliqués dans la stabilité et la quiescence vasculaire, tels Id1, Id2, Id3 (David et al., 2008; Herrera et al., 2014; Larrivee et al., 2012; Ricard, 2013).

### **1.7.6.2 Perte de fonction de la signalisation Alk1 dans l'endothélium**

#### **Chez l'humain**

Des désordres génétiques vasculaires humains sont liés à la perte de fonction des composantes signalétiques BMP9/Alk1. Deux maladies rares très représentatives des conséquences de l'altération de plusieurs composantes de cette voie sur l'endothélium vasculaire humain sont la télangiectasie hémorragique héréditaire (THH) et l'hypertension artérielle pulmonaire familiale (HTAP) (Bernabéu et al., 2010).

La THH est une maladie rare autosomale dominante qui se développe avec l'âge associée à plusieurs anomalies vasculaires au cerveau, aux poumons et dans le système gastrointestinal. (Abdalla et al., 2006; Bernabéu et al., 2010; Thalgott et al., 2015; Winkler et al., 2011). Plusieurs mutations des membres de la famille TGF- $\beta$ /BMP ont été associées à la THH, telles que Alk1, endoglin, et Smad 4 (Abdalla et al., 2006; Bernabéu et al., 2010; Cai et al., 2012; Lowery et al., 2010; Wooderchak-Donahue et al., 2013). En général, une haploinsuffisance est nécessaire pour l'un de ces gènes et suffisante pour causer la THH (Abdalla et al., 2006) (Johnson et al., 1996; Lowery et al., 2010; McAllister et al., 1994; Ricard et al., 2010). Chez l'humain, ces altérations génétiques se caractérisent principalement par des altérations fonctionnelles incluant principalement des malformations artério-veineuses (MAV) accompagnées par des dilatations veineuses et la perte des réseaux capillaires et de péricytes, menant à des vaisseaux instables et fragilisés, perméables, angiogéniques et hémorragiques (Abdalla et al., 2006; Bernabéu et al., 2010; Thalgott et al., 2015; Winkler et al., 2011).



Certains sous-groupes de patients THH ayant une mutation aux gènes *Alk1* et *Eng* peuvent aussi développer la HTAP (Lowery et al., 2010; Soubrier et al., 2013). Cette maladie progressive et fatale se manifeste par une élévation exagérée de la pression pulmonaire (Austin et al., 2014). Les altérations génétiques impliquant la HTAP incluent principalement le récepteur de type II, *BMPR2*, *Smad9* et certains gènes non-associés à la famille des TGF- $\beta$ , telle la cavéolin-1 (Austin et al., 2014; Cai et al., 2012; Machado et al., 2006; Wooderchak-Donahue et al., 2013). Ces altérations génétiques dans la HTAP se caractérisent par le dysfonctionnement de l'endothélium suite à une série d'évènements incluant l'apoptose CE capillaires, une hyper-prolifération et une angiogenèse menant à un endothélium instable et désorganisé (Zhou et al., 2016). En conséquence, il y a altération des médiateurs vasoactifs qui peuvent rendre la barrière endothéliale hyperperméable. Cette dernière altération fonctionnelle est aussi observée dans l'OMD et RD, bien qu'elle soit peu explorée dans la HTAP.

Ensemble, ces données montrent que les composantes de la signalisation *Alk1* sont cruciales pour le maintien d'un endothélium vasculaire systémique fonctionnel et stable chez l'humain.

### Selon une approche expérimentale

Le rôle crucial de *Alk1* dans l'endothélium a été démontré par des invalidations homozygotes d'*Alk1* chez la souris, qui sont léthales au stade embryonnaire E10.5 (Oh et al., 2000; Park et al., 2009; Urness et al., 2000). Cette léthalité est due principalement à des défauts dans l'angiogenèse et le développement cardiaque, des dilatations excessives des vaisseaux qui présentent des lésions vasculaires exacerbées similaires à celles observées dans la THH (Park et al., 2009; Tual-Chalot et al., 2015).

Les souris hétérozygotes ayant des mutations dans plusieurs gènes de la voie BMP9/Alk1 se développent normalement sans phénotype notable (Tual-Chalot et al., 2015). Jusqu'à un certain point cependant, puisque les observations phénotypiques pathologiques vasculaires humaines rencontrées dans la THH peuvent être reproduites à une échelle appréciable expérimentalement (e.g. ~12 mois ou plus pour Alk1+/-) dans des modèles murins impliquant des délétions hétérozygotes des récepteurs Alk1, BMPR2 et Eng (Bourdeau et al., 2000; David et al., 2009; Frank et al., 2008; Lowery et al., 2010; Srinivasan et al., 2003). Il est important de mentionner que d'autres délétions d'Alk1 induites dans des lignées Cre ont aussi été reproduites spécifiquement sur d'autres cellules tel que chez les CVML et péricytes et n'ont pas donné des phénotypes de dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire (Chen et al., 2014; Garrido-Martin et al., 2014; Tual-Chalot et al., 2015). Ceci se compare aux délétions d'Alk1 chez l'humain qui présentent des altérations fonctionnelles qui elles aussi sont au niveau de la perméabilité de l'endothélium. Une étude sur les mécanismes potentiels sous-jacents a démontré sur les cerveaux de souris déficientes d'Alk1 qu'une stimulation soutenue au VEGF induisait la perturbation de l'intégrité de la barrière endothéliale, accompagnée par la perte des cellules murales (Chen, W. et al., 2013), qui est l'un des signes les plus précoces rencontré dans la RD et l'OMD. En conséquence, ces souris présentent une hyperperméabilité exacerbée par le VEGF. Il a été démontré expérimentalement que l'inactivation homozygote d'Alk1 mène à une hyperperméabilité dès les 2 premiers jours suivant la délétion (Tual-Chalot et al., 2015).

Prises ensemble, ces données permettent d'observer une bonne concordance entre l'humain et le modèle animal d'une voie qui est bien conservée évolutivement (Ramel et al., 2012) et témoigne des conséquences qu'une perte de fonctionnalité du récepteur Alk1 peut avoir sur la stabilité de l'endothélium vasculaire.

## **1.8 Potentiel de l'activation de la signalisation BMP9/Alk1**

La perte de fonction spécifique de la voie BMP9/ALK1/Smad1,5,9 dans l'endothélium vasculaire suggère que son activation ou du moins sa préservation pourrait contrecarrer plusieurs altérations physiologiques fonctionnelles de l'endothélium vasculaire diabétique. Une fois activée, la voie BMP9/Alk1 est responsable non seulement de la transcription de nombreux gènes impliqués dans la stabilité et la quiescence vasculaire adulte sous le contrôle des Smad1,5,9, mais aussi de réprimer l'expression de plusieurs facteurs/récepteurs pouvant être impliqués dans la dégradation de la iBHR ou la perméabilité incluant le VEGF, VEGFR2, Ang2, HIF-1  $\alpha$ , STAT3, TNF et Cavéolin-1 (Oh et al., 2000; Ota et al., 2002; Shao, E. S. et al., 2009), pouvant ainsi freiner plusieurs altérations de fonctions physiologiques vasculaires hyperglycémiques rappelant celles rencontrées dans la pathophysiologie de la RD et l'OMD.

### **1.8.1 Effets cellulaires endothéliaux de l'activation BMP9/Alk1**

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 microvasculaires endothéliales humaines (HMVEC) ou chez des cellules primaires endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) (David et al., 2007; Lamouille et al., 2002; Ota et al., 2002; Upton et al., 2009). Bien que certains essais incluant ceux effectués sur des cellules immortalisées soient contradictoires (**Section 1.8.1.1**) (Lebrin et al., 2004; Suzuki et al., 2010), les effets de la BMP9 in vitro semblent aussi favoriser l'inhibition de la migration, de la prolifération et de l'angiogenèse induite par le

FGF chez les CE (Scharpfenecker et al., 2007) (David et al., 2008). Tout comme la BMP9, la BMP10 démontre aussi une inhibition de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales microvasculaires (David et al., 2007). Ces résultats sur l'inhibition de plusieurs fonctions angiogéniques démontrent le potentiel de favoriser la phase de maturation de l'angiogenèse et/ou du maintien du phénotype de quiescence par l'activation de la voie BMP9/Alk1 dans la stabilisation de l'endothélium. Dans ce contexte, une étude utilisant un modèle surexprimant Alk1 chez des EC rétinienne capillaires a démontré un effet favorisant un remodelage stable des néovaisseaux tout en inhibant l'angiogenèse (Li et al., 2008). À l'inverse, l'inhibition avec des RNA interférents sur ces mêmes cellules a réduit l'expression des jonctions étanches occludine (Li et al., 2008).

#### **1.8.1.1 Effet vasculaire de l'activation de voie TGF- $\beta$ /Alk1**

Bien que plusieurs publications mettent en évidence la signalisation Alk1 et son rôle important dans la maturation, la quiescence et la stabilité vasculaire, le rôle exact qu'occupe Alk1 dans l'angiogenèse demeure partiellement incompris. En effet, plusieurs études publiées présentent des effets qui sont à première vue contradictoire, suggérant que Alk1 peut avoir une activité angiogénique dépendant du contexte (Tillet et al., 2014; David et al., 2008; Suzuki et al., 2010). Certaines études ont en effet démontrées des effets favorisant la prolifération et la migration des CE (Goumans et al., 2002) ou l'inverse proposant un effet inhibiteur de la prolifération et la migration en favorisant la phase de maturation (Lamouille et al., 2002). L'effet pro ou antiangiogénique d'Alk1 peut varier selon plusieurs facteurs incluant les types cellulaires, les affinités et concentrations locales de ces ligands, l'expression relative spatio-temporelle des différents

récepteurs à la surface cellulaire et des conditions pathophysiologiques qui peuvent affecter la balance du processus angiogénique.

Une importante composante de cette complexité est l'interdépendance fonctionnelle entre la signalisation Alk1 et celle d'Alk5 sur l'activation ou la quiescence des CE. En effet plusieurs publications ont suggéré une opposition des réponses cellulaires modulées par les signalisations Alk1 et Alk5 (Holderfield et al., 2008). Le TGFb ayant une grande affinité pour Alk5, peut lier et activer Alk1 avec une plus faible affinité. Il a ainsi été démontré que l'activation de la voie canonique TGFb/Alk5 pouvait réduire les niveaux de VEGFR2, augmenter le VEGFR1 et la prolifération et le recouvrement périvasculaire, favorisant la quiescence endothéliale. Inversement, l'effet d'activation d'Alk1 par le TGFb augmente la prolifération des CE et de ce fait favorise le processus angiogénique (Goumans et al., 2002; Jarad et al., 2017; Oh et al., 2000). Cependant lorsque les deux ligands TGFb ou BMP9 sont présent, comme l'affinité de la BMP9 pour Alk1 est beaucoup plus élevée que le TGFb, la signalisation stabilisatrice BMP9/Alk1 serait favorisée (Cunha et al., 2017; Cunha et al., 2011). De plus, dépendant de la disponibilité et l'expression des récepteurs spécifiques à chacun des ligands sur les cellules endothéliale (BMPR2, ACTR2B ou TBR2) pourrait favoriser une action pro-ou antiangiogénique (Kumar et al., 2014). Les récepteurs accessoires de type III pourraient aussi affecter la balance angiogénique de l'interaction entre Alk1 et Alk5. De plus, il est important de mentionner que Alk5 est principalement exprimé dans les cellules périvasculaire tandis qu'Alk1 serait préférentiellement exprimé dans les CE. Cette spécificité élève l'effet sur la fonction angiogénique au niveau de l'intercommunication intercellulaire entre les cellules péricyaires et les EC, qui est vitale dans la régulation de l'angiogenèse (Simionescu et al., 2017; Sweeney et al., 2018).

## **1.8.2 Potentiel thérapeutique de la voie BMP9/Alk1**

L'activation BMP9/Alk1/Smad1,5,9 pourrait potentiellement prévenir plusieurs altérations fonctionnelles de l'endothélium hyperglycémique telles que la perturbation du flux sanguin, la leukostase, l'angiogenèse, l'apoptose des CE et l'hyperperméabilité (Corti et al., 2011) (Kim, C. W. et al., 2013) (Larrivee et al., 2012) (Alastalo et al., 2011) (Long L 2015). Cette activation contribuerait aussi à préserver l'intégrité vasculaire par la maintenance du couplage endothélial et péricytaire (Tachida et al., 2017). Dans un contexte pathophysiologique, l'agent FK506, qui est un puissant activateur de la voie ALK1/BMPRII/Smad1,5,9 et induit le gène reporteur Id1, a montré récemment qu'à de faibles doses il pouvait renverser l'HTAP. (Spiekerkoetter et al., 2013). Cependant très peu de publications sur la voie BMP9/Alk1 ont été rapportées quant à la perméabilité de l'endothélium.

Des études récentes ont démontré l'importance de la BMP9 dans des syndromes métaboliques et le remodelage vasculaire rétinien. Récemment, il a été démontré que les niveaux de BMP9 circulantes étaient significativement diminués chez les patients récemment diagnostiqués du diabète et chez les prédiabétiques résistants à l'insuline par rapport aux sujets sains (Luo et al., 2017; Xu et al., 2017). Expérimentalement, les souris BMP9 KO ne démontrent pas de phénotypes aberrants vasculaires (Ricard et al., 2012). Les conséquences vasculaires d'une déficience pathologique de la BMP9 circulante chez les souris nouveau-nées par des anticorps spécifiques ou des trappes à ligands BMP9 (partie soluble extracellulaire du récepteur Alk1) augmentent la densité des vaisseaux rétiens et la néovascularisation rétinienne (Larrivee et al., 2012; Ricard et al., 2012). La mise en circulation de ces trappes à ligands chez des souris BMP9 KO, perturbe la vascularisation rétinienne, pointant vers un rôle compensatoire de la BMP10 chez les BMP9

KO. À l'inverse, l'activation de la voie BMP9/Alk1 dans les vaisseaux rétiniens a montré une inhibition de l'angiogenèse induite par l'hypoxie rétinienne dans un modèles de souris de dégénérescence maculaire lié à l'âge (DMLA) (Ntumba et al., 2016).

Des études intéressantes sur des cerveaux murins ont montré que la délétion des composantes en aval des récepteurs, impliquant le co-facteur Smad4 nécessaire à la translocation des Smad1,5,9 aux noyaux, menait à une perturbation de l'interaction entre les cellules péricytaire et l'endothélium, une dégradation de la barrière hémato-encéphalique (BHE) via les cadhérines ayant pour conséquences des dilatations vasculaires, la présence fréquente d'hémorragies et d'anévrismes intracrâniens (Li et al., 2011).

### **1.8.3 Signalisation BMP9/Alk1 non canonique**

Outre la voie canonique, il existe plusieurs voies non canoniques qui peuvent être induites par les BMP, incluant MAPK, NF- $\kappa$ B, Wnt et Rho-GTPase et la modulation des microRNA (Herrera et al., 2014; Rui, 2014; Tikhanovich et al., 2013). L'ensemble des voies peuvent être activées de manière simultanées ou séquentielles, leur permettant ainsi d'induire une variété de réponses biologiques distinctes.

#### **1.8.3.1 Communication de la voie Alk1 avec la voie de quiescence Notch**

La signalisation Alk1/BMP9 peut induire la voie non canonique Notch et l'expression des gènes tels Hey1-2, Jagged1, Hes1, qui sont impliqués dans l'inhibition de l'angiogenèse. Un des mécanismes bien connus est l'activation des CE d'extrémités (*tip cells*) par le VEGF-A/VEGFR2 qui mène à l'activation du phénotype de quiescence dans les cellules adjacentes via l'activation

de la voie Dll4/Notch (Jakobsson et al., 2010; Ricard, 2013). Lors de la phase d'activation du bourgeonnement impliquant des réorganisations jonctionnelles, les cellules tiges prolifèrent et forment le corps du bourgeon guidé par une cellule d'extrémité en réponse au VEGF-A. Normalement activés par la voie Notch, Hey1 et Hey2 sont des gènes qui répriment la formation des cellules d'extrémités en inhibant la signalisation par VEGF via le VEGFR1, favorisant ainsi le phénotype cellulaire quiescent « Stalk cells » dans les cellules adjacentes (Levet, 2013; Ricard, 2013). Une étude a récemment démontré que la voie BMP9/ALK1/Smad1,5,9 communiquait avec la voie Notch et ainsi favorisait le phénotype quiescent endothélial par la transcription de gènes tels Hey1 et Hey2 (Larrivee et al., 2012) ce qui renforce la position de l'inhibition du processus angiogénique de cette voie et son intérêt surtout dans les cas où l'angiogenèse est activée dans la RD. Cette intercommunication des voies BMP9/Alk1 et Dll4/Notch sont ainsi interdépendantes pour optimiser la quiescence de l'endothélium (Rostama et al., 2015), et maintenir un endothélium stable. Il est intéressant de noter que l'utilisation des trappes à ligands inhibant la BMP9 et la BMP10 montre des similarités vasculaires avec celles observées lors d'une invalidation des composantes de la signalisation Notch (Hellström et al., 2007; Lobov et al., 2007; Suchting et al., 2007).

### **1.8. 3.2 Intercommunication avec la voie PI3K/AKT dans le foie**

La régulation du glucose requiert l'activation de la voie PI3K/AKT par l'insuline qui est sévèrement inhibée lors d'une résistance à l'insuline ou une déficience d'insuline (Leblanc, 2013; Rask-Madsen, Christian et al., 2013). Cette voie anabolique non spécifique est responsable de l'inhibition du catabolisme glucidique (gluconéogenèse et la glycogénolyse) et stimule l'absorption du glucose par les tissus périphériques. Les membres de la famille BMP peuvent



activer la voie non canonique PI3K/AKT et ont été de plus associés à plusieurs désordres métaboliques incluant l'obésité et le diabète (Kim et al., 2011).

L'existence d'un facteur hépatique humoral régulant l'homéostasie du glucose avait été avancée en 1999 (Caperuto et al., 2008; Lutt, 1999, 2007). En parallèle, la BMP9 avait été découverte dans le foie de souris en 1990 (Celeste et al., 1990; Wozney et al., 1990). L'identité de cette substance hépatique sensibilisatrice à l'insuline reste à démontrer, bien qu'une étude pionnière multidisciplinaire ait identifié la BMP9 comme étant potentiellement la première substance hépatique régulatrice du glucose parmi 8000 protéines sécrétées, (Chen et al., 2003). Sécrétée en haute concentration, la BMP9 est exprimée dans le foie par les hépatocytes, les cellules de Kupffer, les cellules stellaires et les cellules épithéliales biliaires hépatiques (Bidart et al., 2012; Miller et al., 2000). Bien que les mécanismes impliqués demeurent à être élucidé, il à été démontré que la sécrétion de la BMP9 serait contrôlée par le glucose et l'insuline (Caperuto et al., 2008). En effet, il à été démontré que l'expression hépatique de la BMP9 était régulée négativement à jeun sur des modèles murins de résistance à l'insuline (i.e. dexamétasone)(Caperuto et al., 2008). Des études plus récentes sur des foies de patients diabétiques ont aussi montrées une régulation négative de la transcription et l'expression de la protéine BMP9 (Yang et al., 2019). Les récepteurs Alk1, Alk2, Alk3 ont aussi été identifiés sur les cellules hépatiques (Bi et al., 2014; Mayeur et al., 2014; Miller et al., 2000; Song et al., 1995; Tobin et al., 2006). Des études ont aussi démontré que les cellules hépatiques primaires et HepG2 répondent fortement au signal BMP9 à des concentrations de 5 ng/mL de BMP9 en induisant l'expression du gène reporteur Id1 (Herrera et al., 2014). D'autres recherches ont subséquemment révélé que des doses croissantes de BMP9 (0,1 à 10 ng/mL) induisaient une réponse fonctionnelle dans les cellules hépatiques murines et

humaines (Leblanc, 2013; Song et al., 1995). Ces réponses ont mis de l'avant un rôle de la BMP9 dans la signalisation par voies paracrines et autocrines dans le foie. (Miller et al., 2000).

#### 1.8.3.2.2 La BMP9 dans l'homéostasie du glucose

##### La BMP9 dans l'absorption du glucose périphérique

Dans un contexte diabétique, dans des études fonctionnelles par des test de tolérances au glucose, permettant d'évaluer principalement l'élimination du glucose sanguin, il à été démontré chez des modèles murins à jeun que les traitements BMP9 amélioreraient la tolérance au glucose (Chen et al., 2003). Cela était accompagné d'une augmentation significative des niveaux d'insuline. À l'inverse, une publication a montré que la neutralisation de la BMP9 par des anti-BMP9 provoquait une résistance à l'insuline et une intolérance au glucose (Caperuto et al., 2008). Expliquant en partie cette effet, il a été démontré que l'administration de la BMP9 augmentait l'absorption du glucose dans les cellules musculaire L6 par l'expression et la phosphorylation d'AKT in vivo et in vitro (Anhe et al., 2010; Chen et al., 2003; Kim et al., 2011; Tobin et al., 2006). Cette activation d'AKT favoriserait la glycogénèse des cellules musculaires (Chen et al., 2003) et serait potentiellement médiée par Smad5 (Anhe et al., 2010). Selon cette dernière étude, l'inactivation de Smad5 à su réduire la phosphosrylation de la sérine 473 d'AKT et l'absorption du glucose dans les cellules musculaires L6. Cependant, ils n'ont pas détecté des niveaux d'ARNm Alk1, mais plutôt la surexpression d'Alk3 et Alk6 dans ces cellules. Cette observation est aussi en lien avec une étude ultérieure sur des cellules NIH-3T3 surexprimant Alk3, mais qui exprime peu Alk1, qui avait montré une légère augmentation de l'activité de la voie BMP9/Smad1,5,9 avec une concentration de 0,5 ng/mL (David L 2007; Anhe et al., 2010).

## La BMP9 dans la régulation du métabolisme hépatique

De plus, l'étude in vivo de l'équipe de Chen a démontré aussi que la BMP9 activait le métabolisme lipidique et inhibait la gluconéogenèse hépatique (Chen et al., 2003). Dans cette étude sur des souris normales ou diabétiques (db/db) non à jeun, une seule injection sous-cutanée de BMP9 a montré une amélioration du contrôle glycémique et une diminution du glucose sanguin à des niveaux physiologiques ayant des effets allant jusqu'à plus de 48h heures après le traitement, bien que ces effets débutent suivant ~4 heures de traitements. Chez les souris normales traitées avec la BMP9 relativement aux souris non-traitées, il a été observé que leur glycémie a été diminuée substantiellement entre 24 et 48 heures (~64% et 80%), retournant à la normale après 72 heures. Chez les souris diabétiques traitées avec la BMP9, la réduction des niveaux glycémiques étaient maximales après 30 heures (~45%) avec un effet hypoglycémiant perdurant jusqu'à 52 heures. In vitro, cet effet a été en partie expliqué par une diminution de l'activation de la PEPCK des cellules hépatiques de rat (H4Ile), inhibant la gluconéogenèse (Chen et al., 2003). Bien qu'effectuées sur des CE, des études ont en effet démontré que l'activation de la voie BMP9 réprime aussi l'expression du gène FBPase dans l'endothélium (Ota et al., 2002). Cependant, les mécanismes de cette régulation glycémique hépatique par la BMP9 via AKT demeurent à être élucidés.

## 1.9 Hypothèses et objectifs de la recherche

Selon les données empiriques discutées précédemment, l'activation de la voie BMP9/Alk1 serait une alternative thérapeutique intéressante aux anti-VEGF dans le traitement et la prévention de l'OMD. Le raisonnement est basé sur plusieurs points. Par rapport aux anti-VEGF, dont la voie VEGFR2 affectée est presque ubiquitaire dans les cellules rétinienne et d'importance dans leur survie, la voie BMP9/Alk1 a l'avantage de cibler préférentiellement l'endothélium rétinien, évitant les dommages collatéraux. De plus, l'activation de la voie BMP9/Alk1 surexprime des facteurs protecteurs et réprime l'expression de plusieurs facteurs/récepteurs pouvant être induits en conditions hyperglycémiques incluant le VEGF/VEGFR2, qui sont impliqués dans la pathophysiologie de l'OMD. Fonctionnellement l'activation d'Alk1 a démontré pouvoir contrer plusieurs altérations fonctionnelles connues pour être activées dans le diabète incluant l'hyperméabilité. À l'inverse, les déficiences de la signalisation BMP9/Alk1 chez l'humain et les modèles animaux rappellent les altérations fonctionnelles vasculaires rencontrées dans la pathophysiologie de la RD et l'OMD, incluant l'hyperperméabilité. D'ailleurs comme pour plusieurs autres facteurs protecteurs, nous spéculons que cette voie protectrice vasculaire pourrait être inhibée en hyperglycémie ce qui augmenterait la susceptibilité aux complications vasculaires et que son activation pourrait empêcher les dysfonctions vasculaires diabétiques. Ceci est supporté par deux études récentes indépendantes qui ont démontré que cette voie serait potentiellement inhibée par les niveaux circulants de BMP9, qui sont sévèrement réduits chez les patients diabétiques (Luo et al., 2017), ce qui pourrait mener à des dysfonctions vasculaires dues à une activation inadéquate de Alk1 (Huang et al., 2018). De plus, la BMP9 pourrait réguler la

production du glucose hépatique. Le ciblage de la voie BMP9/Alk1 assurerait des effets i) au niveau local (vasculaire) agissant directement pour préserver l'intégrité et la stabilité de l'endothélium de la iBHR ii) et/ou systémique sur la régulation de l'hyperglycémie et limiterait l'activation des voies biochimiques dégradant la BHR. L'activité de la BMP9 permettrait ainsi de protéger contre l'hyperperméabilité vasculaire rétinienne diabétique.

Ainsi, connaissant le rôle de la voie BMP9 dans la quiescence vasculaire et l'homéostasie du glucose nous postulons que :

- i. La voie BMP9/Alk1 serait inhibée en hyperglycémie, ce qui favoriserait la perte de l'intégrité vasculaire menant à l'hyperperméabilité de l'endothélium rétinien
- ii. L'activation de cette voie préviendrait l'hyperperméabilité de l'endothélium rétinien par la préservation et la stabilisation des jonctions interendothéliales
- iii. La BMP9 régulerait la gluconéogenèse hépatique dans le diabète par l'inhibition de la voie non canonique AKT/FOXO1

Pour vérifier cette hypothèse nous avons déterminé les objectifs suivants :

- 1- Déterminer si la voie de signalisation BMP9/ALK1/Smad1,5,8 canonique est inhibée dans l'endothélium hyperglycémique
- 2- Déterminer si l'activation de la voie BMP9/Alk1 stabilise les jonctions interendothéliales et prévient l'hyperperméabilité rétinienne induite par le VEGF
- 3- Évaluer l'effet de la BMP9 sur la régulation du glucose hépatique
- 4- Déterminer les mécanismes de l'effet hypoglycémiant de la signalisation BMP9/AKT dans l'activation de FOXO1 et l'inhibition des enzymes gluconéogéniques.

### **1.9.1 Premier article**

**Akla N, Viallard C, Popovic N, Lora Gil C, Sapiha M, Larrivée B, (2018) BMP9 (Bone Morphogenetic Protein-9)/Alk1 (Activin-Like Kinase Receptor Type I) Signaling Prevents Hyperglycemia-Induced Vascular Permeability. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 38:1821-183.**

Connaissant l'importance de la voie BMP9/Alk1 dans la stabilité vasculaire, nous avons suggéré que la perte de fonction de cette voie en hyperglycémie pourrait être un facteur contribuant à l'hyperperméabilité de l'endothélium rétinien associé aux complications diabétiques. Nous postulons que l'activation de la voie BMP9/Alk1 favoriserait le maintien de l'intégrité jonctionnelle interendothéliale de la iBHR et pourrait prévenir l'hyperperméabilité vasculaire rétinienne rencontrée dans l'OMD. Notre premier objectif était de vérifier l'effet d'une perte de fonction d'Alk1 sur cette perméabilité dans un modèle de souris diabétiques STZ et le modèle d'invalidation conditionnel Cre-Lox. L'étude de l'activation d'Alk1 par les vecteurs adénoviraux surexprimant la BMP9 (Ad-BMP9) a été réalisée pour attester son effet endocrinien sur la perméabilité de l'endothélium rétinien hyperglycémique. Les mécanismes moléculaires vasoprotecteurs de l'activation de la voie BMP9/Alk1 ont été évalués sur des CE mis en culture en conditions hyperglycémiques ou exposées au VEGF.

## 1.9.2 Deuxième article

**Akla N, Sapiha P, Larrivée B, (2019) BMP9 (Bone Morphogenetic Protein-9) non-canonical signaling AKT/FOXO1 inhibits hepatic gluconeogenesis via Alk3. Submitted to Molecular and Metabolism Journal**

La production excessive du glucose hépatique durant le diabète est un facteur important contribuant aux complications diabétiques vasculaires. Connaissant le rôle potentiel de la BMP9 dans le contrôle glycémique, l'hypothèse de cette recherche est d'élucider si la BMP9 produite par le foie a des effets proximaux sur la gluconéogenèse hépatique. Notre objectif était d'étudier d'abord chez des souris non-diabétiques à jeun si la surexpression de la BMP9 hépatique par des vecteur adénoviraux (Ad-BMP9) pouvait réguler les niveaux de glucose sanguin. Dans un deuxième temps, savoir si cette régulation s'effectuait mécaniquement par une inhibition de la libération du glucose hépatique via la régulation d'enzymes gluconéogéniques médiée par la voie AKT/FOXO1. Par la suite nous avons testé ce même modèle d'inhibition de la gluconéogenèse hépatique sur le modèle STZ de souris diabétiques pour attester le contrôle glycémique à long terme. En parallèle, les taux des différents métabolites et hormones principaux ont été considérés pour dresser un schéma plus global de l'effet de la BMP9 sur le métabolisme du glucose.

## **Chapitre II : Premier article**



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

**Naoufal Akla<sup>1,4</sup>, Claire Viallard<sup>5,4</sup>, Popovic Nataljia<sup>3,4</sup>, Cindy Lora Gil<sup>3,4</sup>, Przemyslaw Mike Sapielha<sup>1,2,4</sup> and Bruno Larrivée<sup>2,3,4,5\*</sup>**

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Medicine, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

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

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

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

<sup>5</sup>Departments of Molecular biology, 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.

## 2.1 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.

## 2.2 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 (Kolluru, Bir, & Kevil, 2012; Williams & Pickup, 2004). These adverse effects ultimately impair vascular function and significantly increase the risks of complications such as renal failure, amputations, strokes, cardiopathies and blindness (Cade, 2008; Chawla, Chawla, & Jaggi, 2016). A frequent microvascular complication induced by diabetes is retinopathy, of which diabetic macular edema (DME) is a major consequence (Duh, Sun, & Stitt, 2017), and is the leading cause of blindness in the diabetic population (R. Lee, Wong, & Sabanayagam, 2015). 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 years (Romero-Aroca, 2011).

DME is a complex disease of multifactorial origin and is the consequence of destabilization of the blood-retinal barrier (BRB) (Romero-Aroca, 2010). 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). The disruption of the BRB leads to the accumulation of fluid into the retina, resulting in tissue damage and, eventually, to vision loss (Romero-Aroca et al., 2016). 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 VEGF (Miller et al., 1994), leading to increased vascular permeability (Romero-Aroca, 2011; Romero-Aroca et al., 2016). Mechanistically, increased vascular permeability occurs as a consequence of disrupted cell-cell junctions in the endothelium and loss of junctional proteins such as occludin (Antonetti, Lieth, Barber, & Gardner, 1999; Klaassen, Van Noorden, & Schlingemann, 2013; Meng & Takeichi, 2009; X. Zhang, Zeng, Bao, Wang, & Gillies, 2014). Furthermore, increased VEGF signaling (Hammes, Lin, Bretzel, Brownlee, & Breier, 1998) 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 (Dejana, Tournier-Lasserre, & Weinstein,

2009; Giannotta, Trani, & Dejana, 2013; Klaassen et al., 2013; Mehta & Malik, 2006; Sukriti, Tauseef, Yazbeck, & Mehta, 2014). 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 (Blinder et al., 2017; Boyer, Hopkins, Sorof, & Ehrlich, 2013; L. A. Kim & D'Amore, 2012; Singer, Kermany, Waters, Jansen, & Tyler, 2016; Willmann et al., 2017). However, despite encouraging results, intravitreal injection of anti-VEGF agents may be associated with systemic adverse events and devastating ocular complications (Falavarjani & Nguyen, 2013). 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 occlusion (Rask-Madsen & King, 2013). 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 (Niessen, Zhang, Ridgway, Chen, & Yan, 2010; Seki, Yun, & Oh, 2003; Urness, Sorensen, & Li, 2000). Alk1 is a TGF-beta/Bone Morphogenetic Protein receptor expressed in endothelial cells (Roman & Hinck, 2017). Following ligand binding, the activated receptor propagates the signal by phosphorylating members of the Smad family of transcription factors (Y. G. Chen & Massague, 1999; Roman & Hinck, 2017). Non-Smad signaling pathways have also been described for BMPs (M. Kim & Choe, 2011; Lamplot et al., 2013; Larrivee et al., 2012). Recently published studies suggest that BMP9, which is produced by the liver and circulates in the bloodstream (Bidart et al., 2012), binds with high affinity to Alk1 in association with type II BMP receptors, including BMP receptor 2 (BMPR2) and Activin Receptor 2B (ActRIIB) (Brown et al., 2005; L. David, Feige, & Bailly, 2009; Laurent David et al., 2008; L. David, Mallet, Mazerbourg, Feige, & Bailly, 2007; Townson et al., 2012). Mice lacking Alk1 die early during embryonic development (E11) due to a severe lack of vascular remodeling (Urness et al., 2000). The vessels in these mice are characterized by enlarged lumen, inadequate pericyte coverage, increased proliferation which leads to blood vessel rupture and hemorrhages (Kloc, Kubiak, Li, &

Ghobrial, 2015; Oh et al., 2000; Park et al., 2008; Park et al., 2009). 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 (Larrivee et al., 2012). 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.

## **2.3 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% CO<sub>2</sub>. 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 *acvr1l* floxed mice were kindly provided by Ralf Adams and S. Paul Oh respectively. *Cdh5-CreErt2* mice were crossed with *acvr1l* 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 $\Delta$ 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 diabetes (Bell, Khurana, Ryan, & Finegood, 1994).

## **Antibodies and reagents**

The following primary antibodies were used: ALK1; (human AF370; or mouse AF770; 0.4  $\mu$ g/mL), Eng (AF1320; 0.2  $\mu$ g/mL) were obtained from R&D Systems. pSmad1,5,9 (cs9511; 10  $\mu$ M), Smad1 (cs6944; 10  $\mu$ M), pVEGFR2-Y951 (cs4991; 10  $\mu$ M), VEGFR2 (cs55B11 or cs9698; 10  $\mu$ M), pSrc (cs6943; 10  $\mu$ M), Src (cs2108; 10  $\mu$ M), peNOS (cs9570; 10  $\mu$ M), p $\beta$ -catenin/Ser 675 (cs4176; 10  $\mu$ M) and eNOS (cs32027; 10  $\mu$ M) were acquired from Cell Signaling Technology. Anti-BMP2 (ab96826; 0.5  $\mu$ g/mL), ActR2B (ab135635; 0.7  $\mu$ g/mL), pVE-Cadherin (ab119785; 1  $\mu$ g/mL), Desmin (ab32362; 1.5  $\mu$ g/mL) were obtained from Abcam. Antibodies against Occludin (40-4700; WB-0,25  $\mu$ g/mL; IHC-0,8  $\mu$ g/mL; Thermo Scientific) and VE-Cadherin (sc9989; 0,2  $\mu$ g/mL) were used for WB while anti-VE-Cadherin (sc6458; 1  $\mu$ g/mL) was used for immunohistochemistry (Santa Cruz). Anti- $\beta$ -actin (sc47778; 0,1  $\mu$ g/mL) and  $\beta$ -catenin (sc7963; 0,2  $\mu$ g/mL) were acquired from Santa Cruz. Claudin-5 (352588; 0,5  $\mu$ g/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), *acvr1l* (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 Alk1 $\Delta$ EC 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) (Cerani et al., 2013).

### **Adenovirally-delivered BMP9 system (Ad-BMP9)**

Adenoviral constructs were produced and purified as previously described (Larrivee et al., 2012). Mice groups with stable hyperglycemia were randomly assigned to receive i.p. injections of  $5 \times 10^8$  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  $\mu$ g/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 0C 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(Cerani et al., 2013; Xu et al., 2001).

To evaluate the functional mechanism by which BMP9 affects vascular leakage, a modified Miles assay on skin was performed(Radu & Chernoff, 2013). 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 0C 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 described(Friedl et al., 2002). HUVECs were seeded (1,5 mL; 2 X 10<sup>5</sup> 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 Z0, 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 ~50,000cells/cm<sup>2</sup> for at least 24hrs at 37°C 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 MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 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 (Cerani et al., 2013). In 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 used (Dunn, Kamocka, & McDonald, 2011). All group data are shown as mean  $\pm$  SEM and a p value < 0.05 was considered statistically significant.

## 2.4 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 2.1A**) or its non-metabolizable enantiomer, L-Glucose (**Figure S2.1A**), 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 2.1A**). This inhibition was not observed

in the presence of L-Glucose, which is not metabolized by mammalian cells (RUDNEY, 1940) (**Figure S2.1A**). 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 S2.1B**). 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 S2.1C**). 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 Retinal 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 S2.1D**). 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 2.1B**). 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 S2.1E**). 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 2.1B**).

As hyperglycemia has recently been shown to alter the localization and signaling of endothelial receptors, including VEGFR2 (Warren, Ziyad, Briot, Der, & Iruela-Arispe, 2014), 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 2.1C**). Treatment of HUVECs with BMP9 resulted in decreased cell surface localization of Alk1 after 30 min at 5mM glucose, consistent with receptor internalization (**Figure 2.1D**). However, Alk1 internalization following BMP9 stimulation was significantly impaired in HUVECs cultured in the presence of 11 or 25 mM glucose (**Figure 2.1D**). 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 S2.1F**) (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 S2.1F**). 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 (Cerani et al., 2013; K. K. Wu & Huan, 2008; Xu et al., 2001). Mice with blood glucose consistently above 17mM were considered diabetic (Graham, Janecek, Kittredge, Hering, & Schuurman, 2011). Eight weeks after the onset of hyperglycemia, analysis of circulating BMP9 levels by ELISA showed no significant differences between normoglycemic and diabetic groups (**Figure S2.1G**). 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 2.1E**). Immunofluorescent staining of retinas harvested from diabetic mice eight weeks after STZ injections also revealed a substantial decrease in Alk1 staining in retinal blood vessels (**Figure 2.1F**). Together, these data suggest that hyperglycemia impairs Alk1 expression and signaling in endothelial cells.

*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 permeability (Long et al., 2015). 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 2.2**). We first evaluated whether specific loss of endothelial Alk1 was implicated in retinal vascular permeability under physiological conditions using mice with conditional

deletion of *acvr11* in the endothelium ( $\text{Alk1}\Delta\text{EC}$ ). To detect vascular permeability, retinal Evans Blue-Albumin permeation was assessed as previously described (Cerani et al., 2013; Xu et al., 2001). Deletion of endothelial Alk1 protein in  $\text{Alk1}\Delta\text{EC}$  mice following tamoxifen injections was confirmed by immunoblotting of lung tissue and immunofluorescent staining of retinas (**Figure S2.2A,B**). While Evans blue permeability in non-diabetic  $\text{Alk1}\Delta\text{EC}$  heterozygoteous mice was not significantly different from control animals eight weeks after tamoxifen injections (**Figure 2.2A**), homozygous deletion of endothelial Alk1 in non-diabetic mice showed significantly higher retinal vascular albumin extravasation compared to control mice after 7 days (**Figure 2.2B**). Permeability experiments were performed after 7 days of deletion in  $\text{Alk1}\Delta\text{EC}$  homozygous mice, as opposed to 8 weeks in heterozygous animals, as  $\text{Alk1}\Delta\text{EC}$  homozygous mice display high lethality starting 10 days after tamoxifen injections. While homozygote  $\text{Alk1}\Delta\text{EC}$  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 S2.2B**).

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  $\text{Alk1}\Delta\text{EC}$  mice were injected with STZ to induce diabetes and eight weeks after induction of diabetes, Evans blue permeation was evaluated in retinas (**Figure 2.2C**) (Cerani et al., 2013; Xu et al., 2001). Histological assessment of the retinal vasculature revealed no significant difference in retinal capillaries between control and heterozygous  $\text{Alk1}\Delta\text{EC}$  diabetic mice (**Figure S2.2C**). However, as reported (Anand-Apte et al., 2010; Hossain et al., 2016; Y. H. Kim et al., 2012; Xu et al., 2001; S. X. Zhang et al., 2005), we observed an increase in Evans blue permeability in diabetic control mice compared to non-diabetic mice (**Figure 2.2D**). Furthermore, while we had previously observed that non-diabetic heterozygous  $\text{Alk1}\Delta\text{EC}$  mice did not show any differences in vascular permeability (**Figure 2.2A**), they displayed a significant increase in retinal vascular permeability compared to control mice in diabetic conditions (**Figure 2.2D**). 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.

*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 S2.1C**). 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 2.3A**). 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 S2.3A**).

Further evidence for the ability of BMP9 to preserve endothelial barrier function was obtained from real-time analysis of transendothelial electric resistance(Murakami et al., 2008).Treatment of an intact monolayer of HUVECs (**Figure 2.3B**) or HRMECs (**Figure S2.3B,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 S2.3D**). No significant changes in mouse weight were observed throughout the length of the experiment (**Figure S2.3E**). Interestingly measurements of glycaemia after AdBMP9 injections showed a small but significant decrease in average blood glucose compared to baseline Ad-CTL levels (**Figure 2.3C**), which is consistent with a previous report showing that injections of recombinant BMP9 in mice reduces glycemia through the inhibition of gluconeogenesis (C. Chen et al., 2003). 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 2.3D**). 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 2.3E**). 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 S2.3F,G**).

*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 (Boyer et al., 2013; Campochiaro, Aiello, & Rosenfeld, 2016; Singer et al., 2016; X. Zhang et al., 2014). 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 (Eliceiri et al., 2000; Ito et al., 2003; Sano, Hosokawa, Kidoya, & Takakura, 2006; Senger, Connolly, Van de Water, Feder, & Dvorak, 1990) (**Figure 2.4A,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 $\Delta$ EC homozygote mice did not prevent VEGF-induced permeability (**Figure 2.4A**).

VEGF loosens cell junctions by activating a molecular cascade which results in the phosphorylation and internalisation of VE-cadherin (Giannotta et al., 2013). 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 (Koch, Tugues, Li, Gualandi, & Claesson-Welsh, 2011; Satirdav, Otulu, & Kerimoglu, 2014). 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 2.4C**). Since Src activation plays an essential role in VEGF-mediated permeability (Eliceiri et al., 2000), 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 2.4C**). Downstream of Src phosphorylation, phosphorylation of VE-cadherin has been shown to regulate vascular permeability, as phosphorylation of VE-cadherin at Tyr685 (Gavard, 2014) controls the opening of endothelial cell junctions (Wessel et al., 2014; Z. Wu et al., 2016). 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 2.4C**). Interestingly, while high glucose concentrations did not alter levels of  $\beta$ -catenin, BMP9 stimulation resulted in higher levels of  $\beta$ -catenin. High levels of  $\beta$ -catenin in BMP9-stimulated cells may contribute to decreased VEGFR2 phosphorylation, as  $\beta$ -catenin has previously been demonstrated to inhibit VEGFR2 phosphorylation (Lampugnani et al., 2003). Finally, VEGF-induced phosphorylation of eNOS and subsequent modulation of NO levels have also been shown to be mediators of vascular permeability in diabetes (Claesson-Welsh, 2015; Q. Li et al., 2010; Takeda et al., 2001) and are thought to be key factors in the occurrence and development of DME (Felinski & Antonetti, 2005; Simo, Sundstrom, & Antonetti, 2014; X. Zhang et al., 2014), 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 2.4C**). 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 S2.4A**). 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 2.4D**). HRMECs transfected with *ACVRL1* siRNA also displayed

exacerbated phosphorylation of VEGFR2, Src, VE-cadherin and eNOS (**Figure S2.4B**). These observations were also confirmed in vivo in lung tissue extracted from homozygous *Alk1* $\Delta$ EC mice (**Figure 2.4D**). 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 endothelium<sup>14</sup>. For example, reduced vascular expression of the tight junction protein occludin has been reported in diabetes<sup>14</sup>. Furthermore, it is proposed that VEGF signalling, through phosphorylation of Src, leads to the internalization of VE-cadherin and the subsequent disruption of adherens junctions (Giannotta et al., 2013; Meng & Takeichi, 2009). 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 2.5A**). 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 2.4C; Figure 2.5B**), 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 2.4C**). 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 (Hawkins & Davis, 2005; H. S. Lee et al., 2004; Wang, Hui, Guo, & Ma, 2007), were significantly increased by BMP9 in normoglycemic and hyperglycemic conditions (**Figure 2.5B**).

While BMP9 maintained high levels of occludin, its expression was decreased in HUVECs transduced with *acvr1l* siRNA and in *Alk1* $\Delta$ EC mice (**Figure 2.5C**). 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 2.5D**; unprocessed images shown in **Figure S2.5B**); (**Figure S2.5A**). 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 S2.5A**). To evaluate the contribution of occludin to BMP9's anti-permeability properties, HUVECs were transfected with control or *occludin* siRNA (**Figure S2.5C**) and treated with BMP9 in normoglycemic or hyperglycemic conditions. As previously shown (Dang, Seale, & Qu, 2005; Hempel et al., 1997), we observed increased Evans blue leakage in the presence of elevated glucose concentrations (11mM), and an inhibition in the presence of rhBMP9 (**Figure 2.5E**). 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 2.5E**). 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.

## 2.5 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 (Boyer et al., 2013; Creager, Luscher, Cosentino, & Beckman, 2003; Rask-Madsen & King, 2013; Rechtman, Harris, Garzozzi, & Ciulla, 2007). 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 (Bhagat, Grigorian, Tutela, &

Zarbin, 2009; Das, McGuire, & Monickaraj, 2016; Mathew, Yunirakasiwi, & Sanjay, 2015). Recent studies have indeed suggested that VEGF-independent mechanisms such as carbonic anhydrase (Gao et al., 2007), netrins (Miloudi et al., 2016), erythropoietin (Garcia-Ramirez et al., 2011; Hernandez et al., 2006) and Semaphorin 3A (Cerani et al., 2013) 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 S2.6**).

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 (Bertolino, Deckers, Lebrin, & ten Dijke, 2005; Oh et al., 2000). While many studies have helped uncover the mechanisms by which Alk1 contributes to vascular remodelling (Larrivee et al., 2012; Ola et al., 2016; Ricard et al., 2012; Shao, Lin, Yao, & Boström, 2009; Toporsian et al., 2005), 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 (Rudini et al., 2008). 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 1175 (Ola et al., 2016), 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 (Koch et al., 2011; Satirdav et al., 2014). Alternatively, decreased VEGFR2 phosphorylation and downstream VEGF signaling in BMP9-treated ECs may be a consequence of elevated levels of  $\beta$ -catenin, which has previously been shown to restrict VEGFR2 phosphorylation (Lampugnani et al., 2003), although the mechanisms by which BMP9 affects  $\beta$ -catenin levels are unclear.

Alk1 also participates in vascular barrier functions by promoting the expression of occludin (B. Li et al., 2008), 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 rats (Klaassen et al., 2009) and correlate with increased vascular permeability (Antonetti et al., 1998). Moreover, occludin levels drop in diabetic retinas (Antonetti, Barber, Hollinger, Wolpert, & Gardner, 1999; Antonetti et al., 1998; Barber, Antonetti, & Gardner, 2000) and the localization of the protein at endothelial junctions is altered (Antonetti et al., 1998). 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 activity (Navaratna, McGuire, Menicucci, & Das, 2007). 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 (Weis et al., 2004). 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.

Although vascular complications have long been associated with diabetes, the complex series of events that lead to endothelial dysfunction in a hyperglycemic setting are less understood. Here we show that reduced signaling by Alk1 in hyperglycemic conditions could contribute to

increased vascular permeability. Several mechanisms could account for decreased Alk1 signaling in the presence of high glucose concentrations. It has been well documented that Advanced Glycation End Products (AGE), which are formed in hyperglycemic conditions, can either activate inflammatory signaling, such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 and C-reactive protein (CRP) (Riehl, Nemeth, Angel, & Hess, 2009) or can interfere with the signaling of kinase receptors, including the epidermal growth factor receptor (EGFR) (Portero-Otin et al., 2002). Other mechanisms, including repressed transcriptional activity, or alterations in cellular localization have also been suggested to play a role in alterations of endothelial cell signaling in hyperglycemic conditions. In the case of Alk1, the transcription factor Sp1 has been shown to be a key regulator of *ACVRL1* transcription. Chromatin immunoprecipitation assays demonstrated multiple Sp1 binding sites along the proximal promoter region of *ACVRL1* in endothelial cells, and silencing of this factor results in decreased Alk1 expression (Garrido-Martin et al., 2010). 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 (Clark et al., 2003). 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.

## 2.6 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.

## 2.7 Figures Article 1

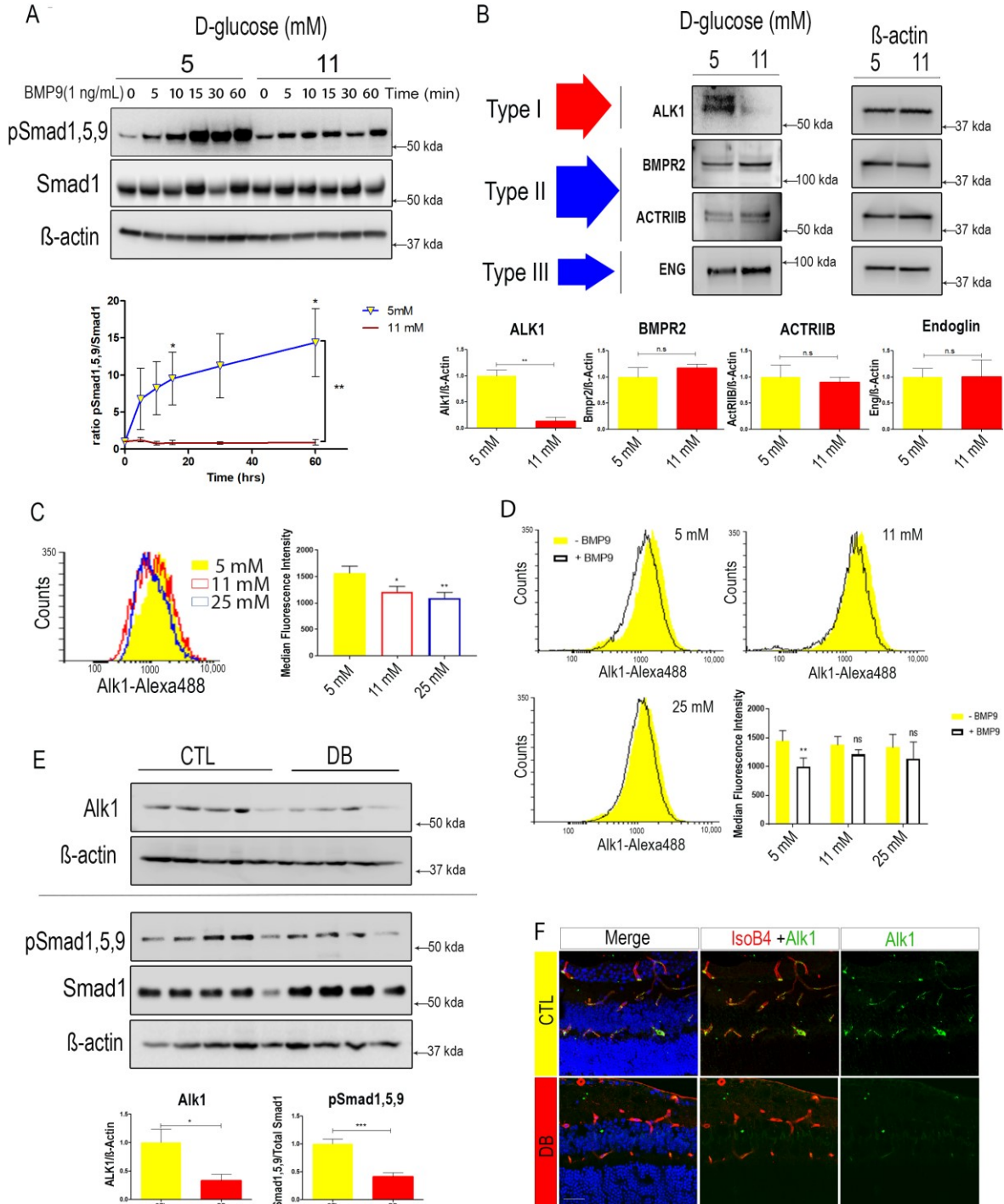


Figure-1



**Figure 2.1. 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  $\beta$ -actin . Representative blots are shown (upper panel) and bands were quantified by densitometry (lower panel). Total protein Smad1 and Internal  $\beta$ -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  $\beta$ -actin. Representative blots are shown (upper panels) and bands were quantified by densitometry (lower panels). Internal  $\beta$ -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  $\mu$ m. Differences between means were analyzed using unpaired t test. \*  $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$  \*\*\* $p < 0.001$ .

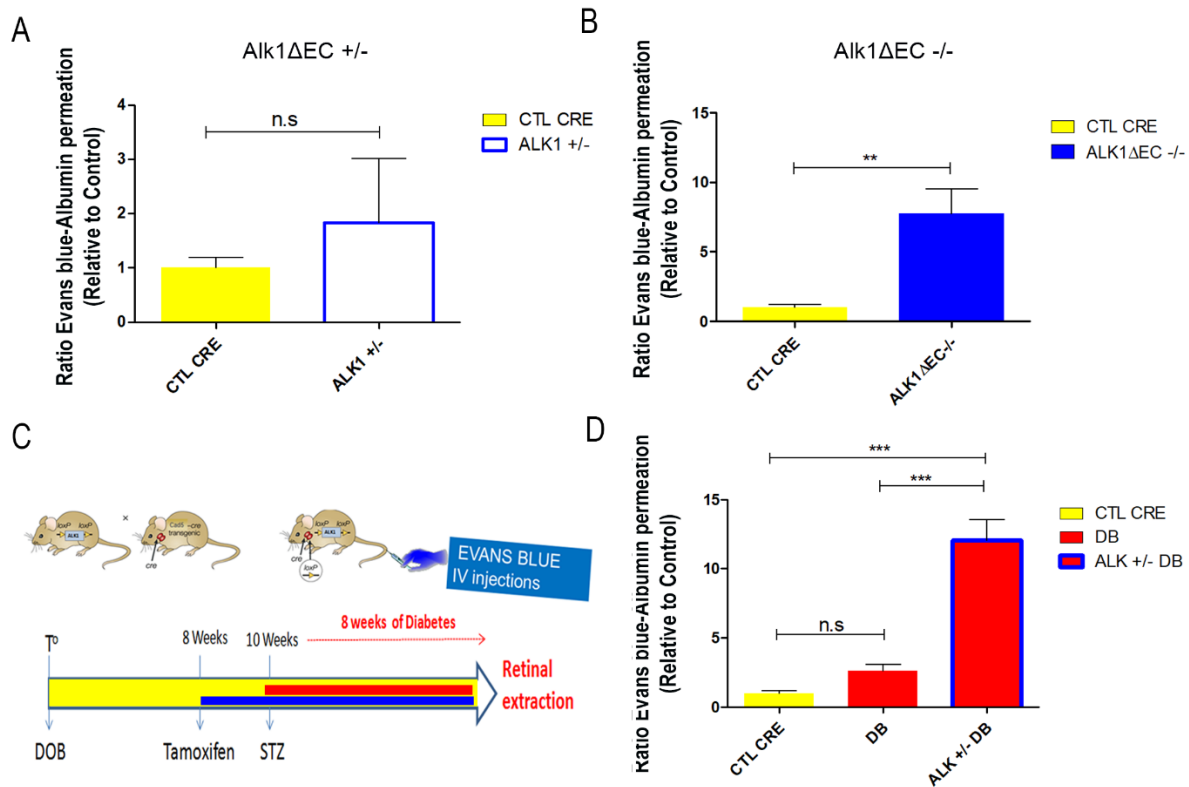


Figure-2

**Figure 2.2. Endothelial-specific loss of Alk1 exacerbates retinal permeability.** (A) Measurement of Evans blue leakage in heterozygous  $Alk1\Delta EC$  (N=8 mice) vs CTL (N=7 mice) mice or (B) homozygous  $Alk1\Delta EC$  normoglycemic mice (N=8 mice) vs CTL mice (N=6 mice). (C) Experimental time line for the generation of diabetic heterozygote  $Alk1\Delta EC$  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  $Alk1\Delta EC$  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). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

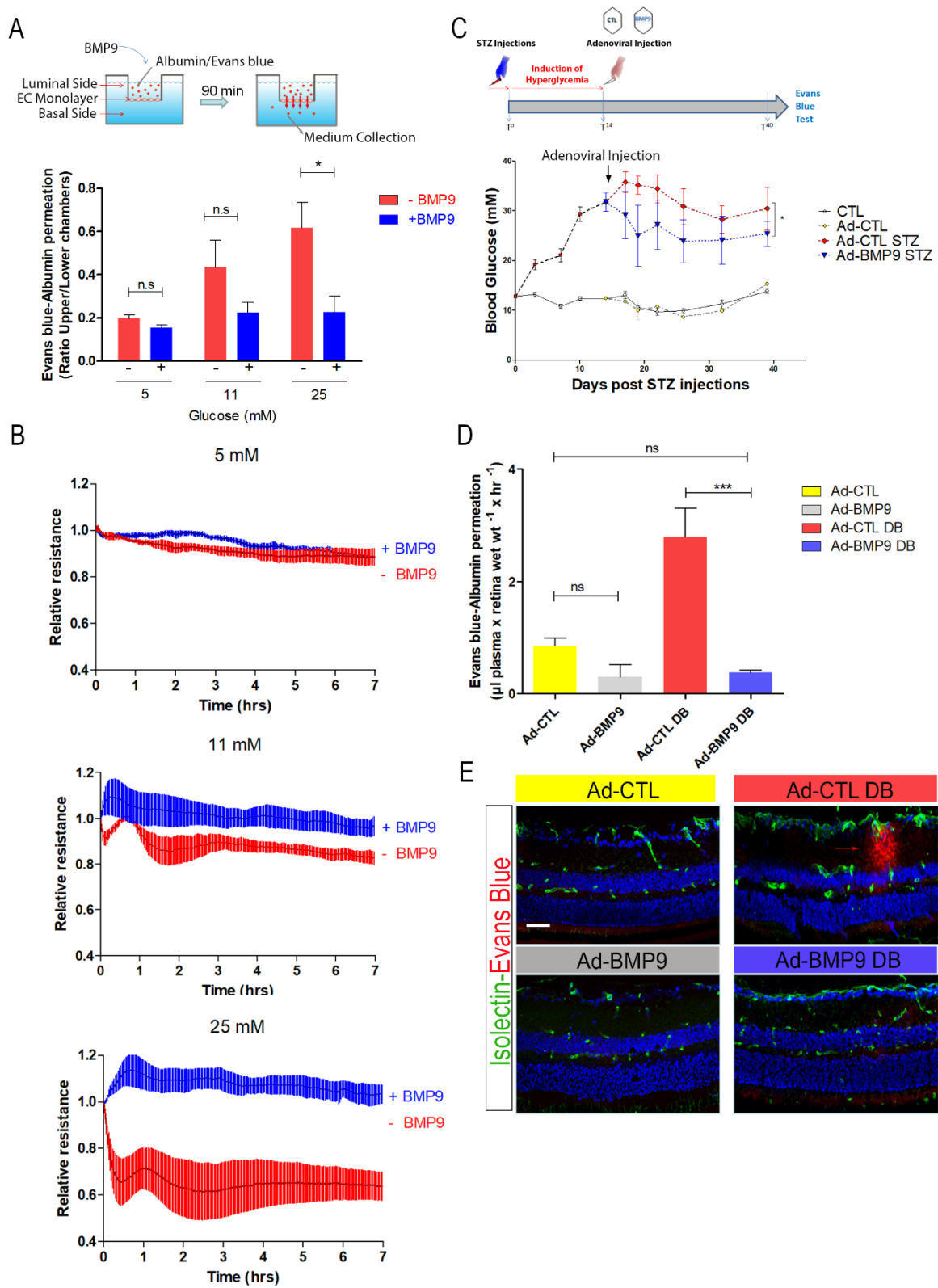


Figure-3

**Figure 2.3. 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 essay; 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 essay 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. (E) 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  $\mu$ 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.

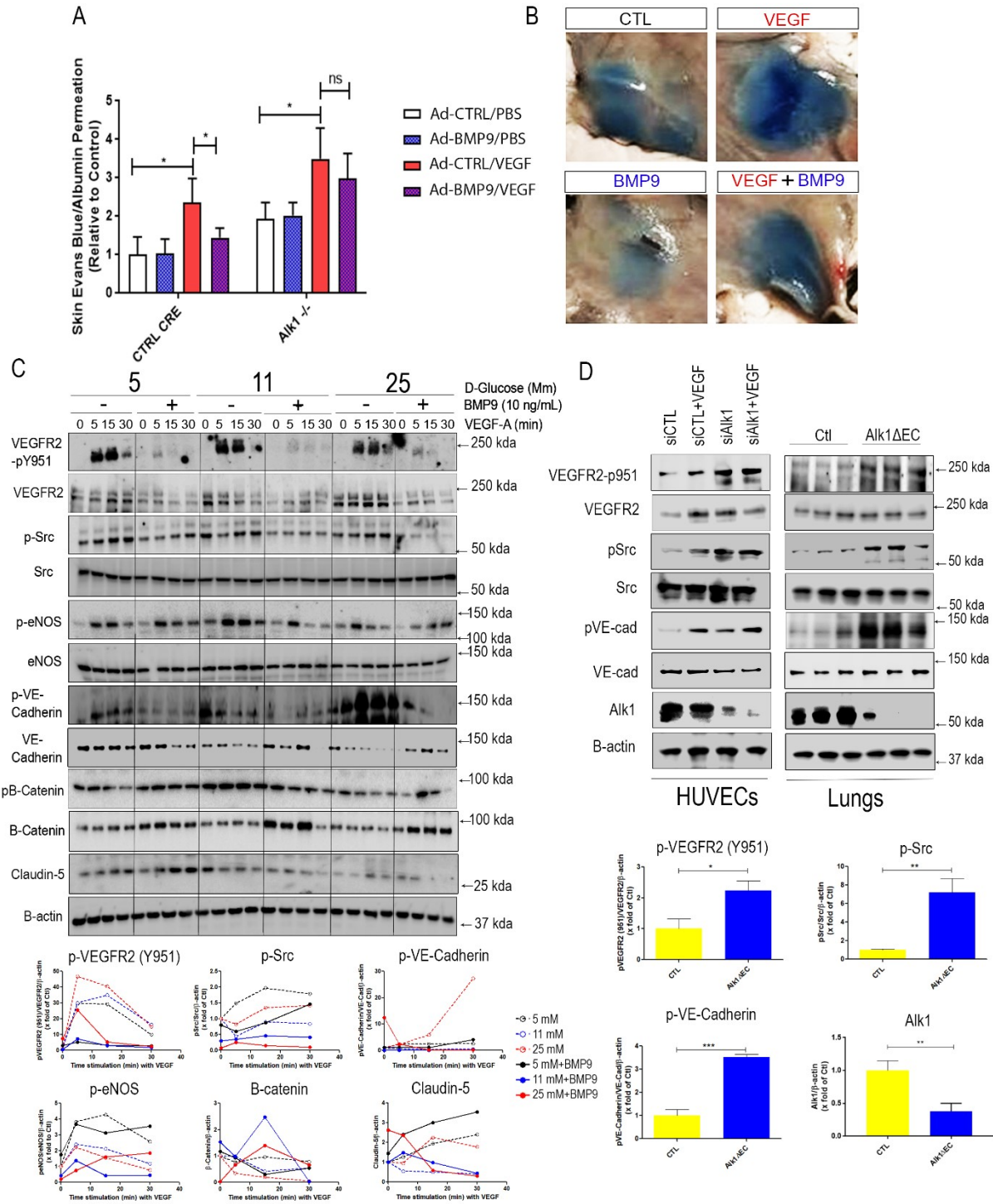


Figure-4

**Figure 2.4. 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 $\Delta$ 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 $\Delta$ EC mice (right panel) were processed for immunoblotting with antibodies of signaling molecules involved in vascular permeability.  $\beta$ -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.

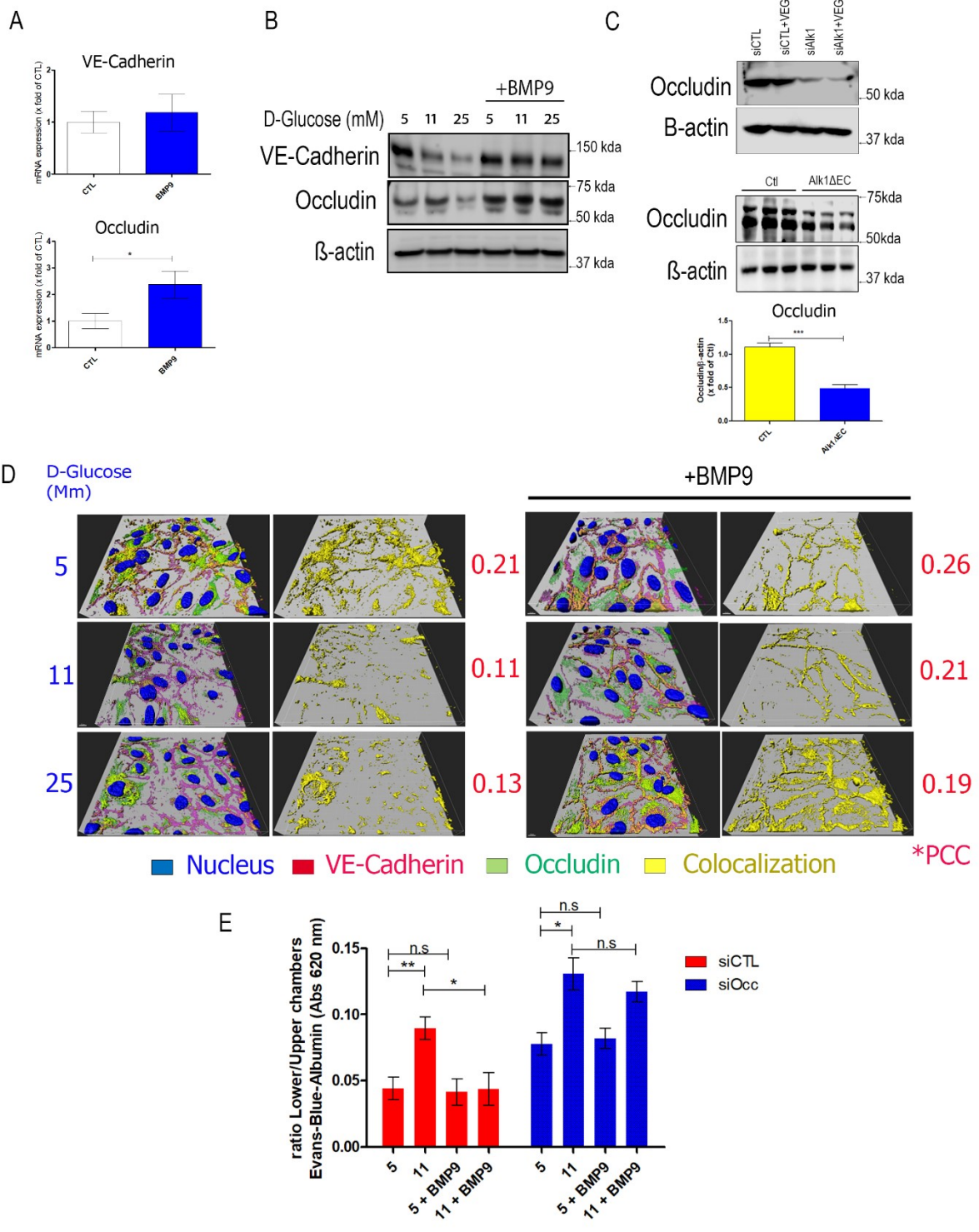
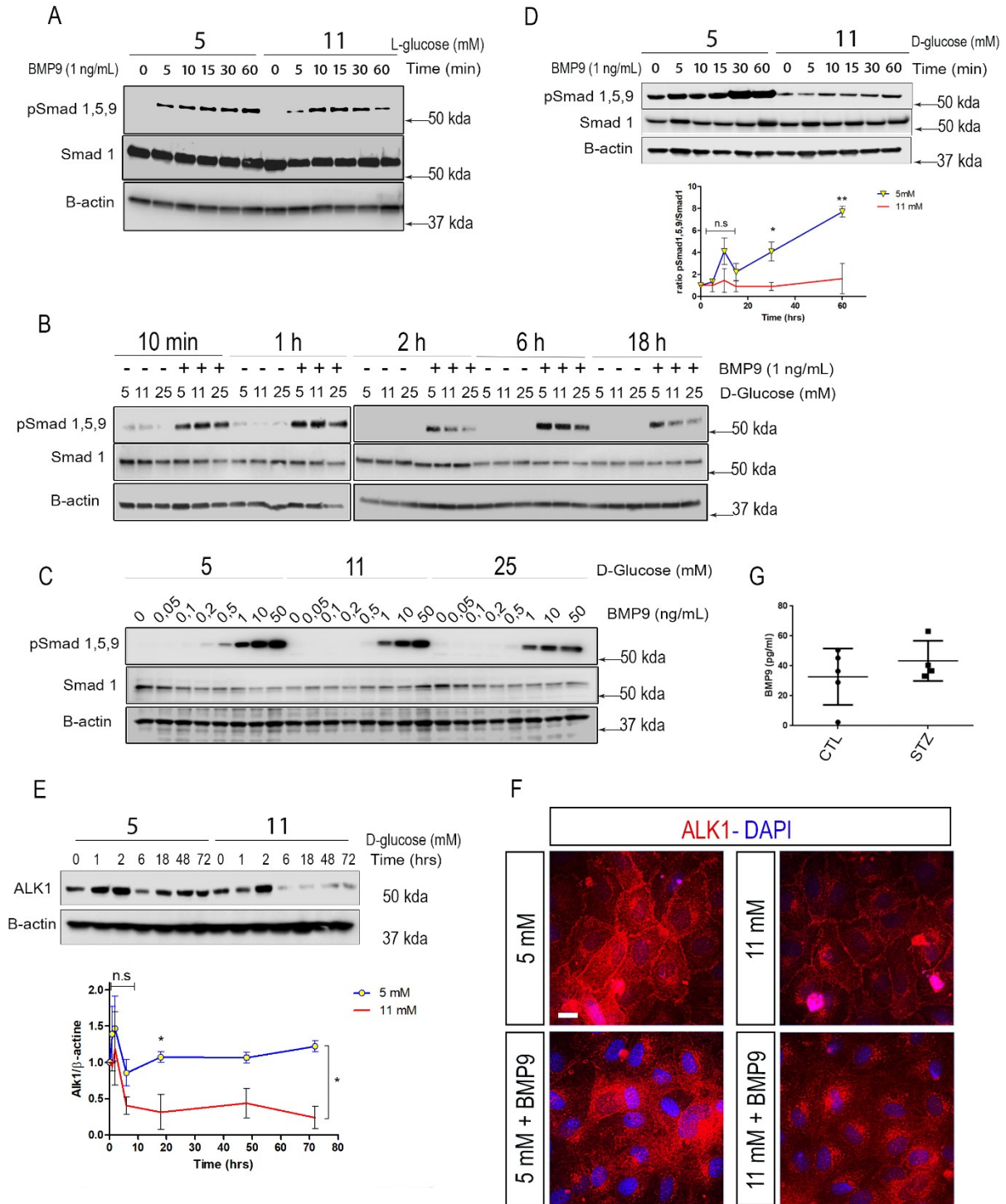


Figure-5

**Figure 2.5. 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 panel) or from mouse pulmonary tissues harvested from homozygote  $Alk1\Delta EC$  were analyzed by immunoblotting for occludin expression. Lower panel: densitometric analysis of occludin expression in lungs of control and  $Alk1\Delta EC$  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 occludin. A volumetric view of confocal Z-stack images of human transendothelial junctions with VE-Cadherin (Red channel) and occludin tight junctions (green channels) was used for 3D representation. An additional yellow channel shows colocalization of VE-cadherin and occludin 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). (E) Boyden chambers permeability assay on HUVECs transfected with occludin 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.

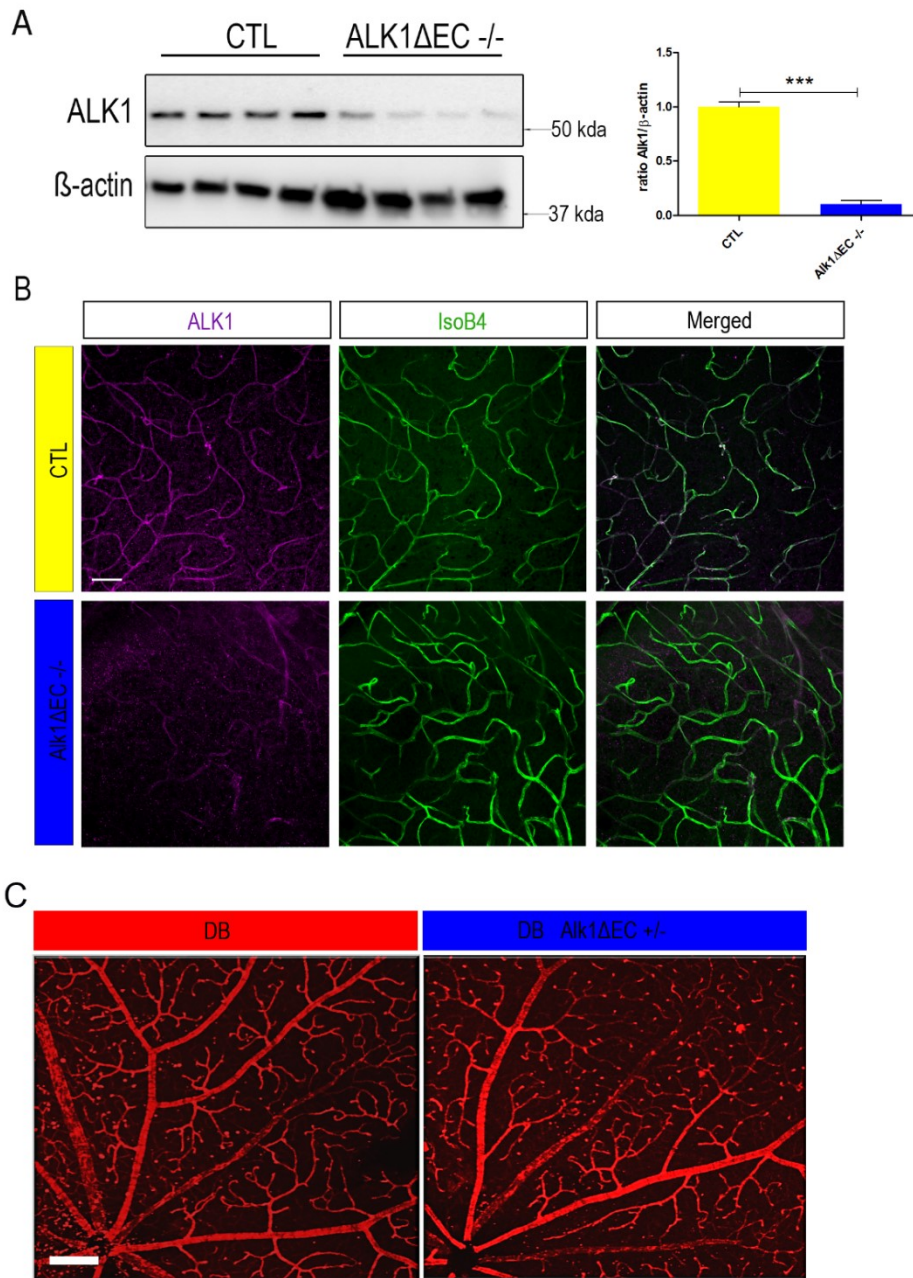


## 2.8 Supplementary Data Article 1

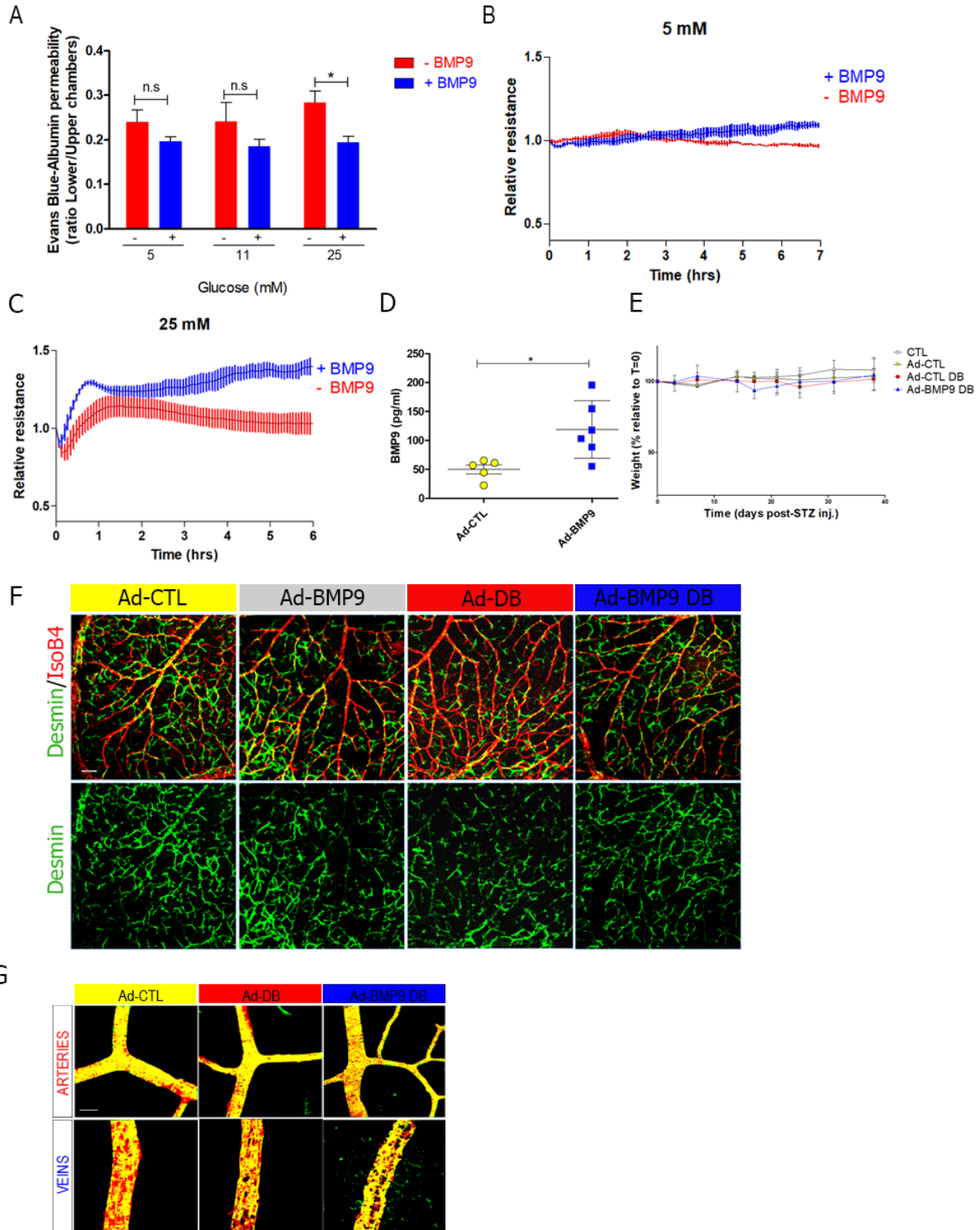


Supplementary Figure-1

**Figure S2.1: 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  $\beta$ -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  $\beta$ -actin. Representative blots are shown (upper panel) and bands were quantified by densitometry (lower panel). Total protein Smad1 and Internal  $\beta$ -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  $\mu$ 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.

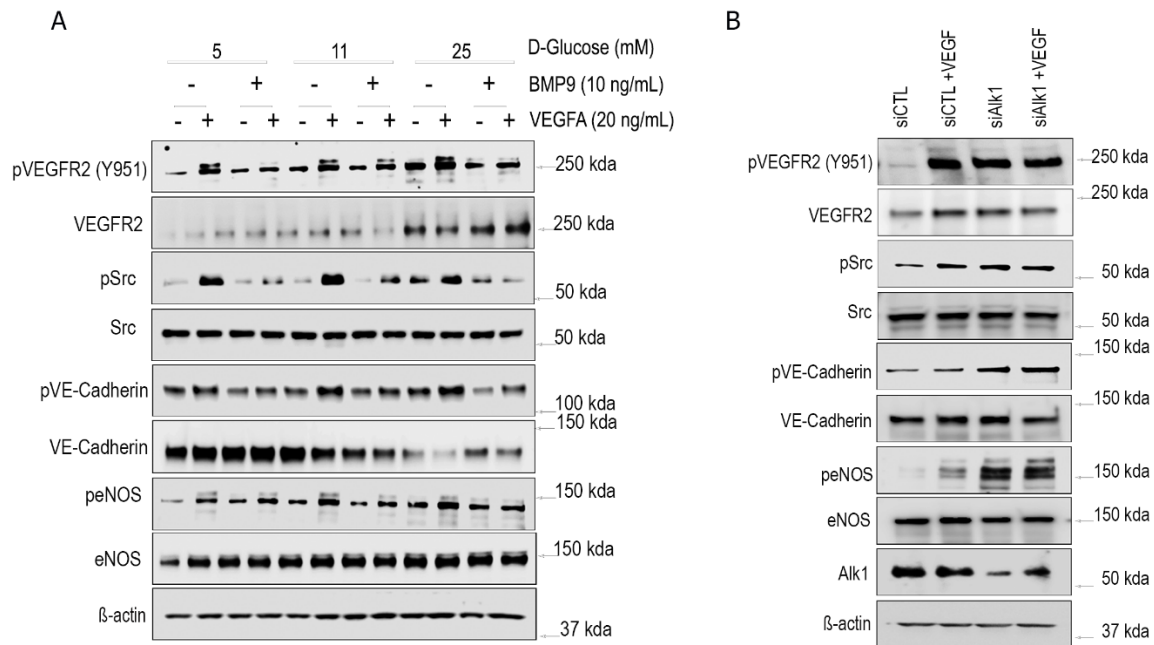


**Figure S2.2. Deletion of Alk1 in Alk1 $\Delta$ EC mice.** (A) Lungs were harvested from 8-week-old Alk1 $\Delta$ EC mice injected for 5 consecutive days with tamoxifen. Protein extracts were subjected to Alk1 and  $\beta$ -actin immunoblotting and quantified by densitometry. Values are shown as mean $\pm$ SEM. Control mice (N=4) and Alk1 $\Delta$ EC (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 Alk1 $\Delta$ EC homozygote mice. Scale Bar: 50  $\mu$ m. (C) IsoB4 staining of retinas from diabetic control or diabetic heterozygote Alk1 $\Delta$ EC mice. Scale Bar: 100  $\mu$ m. Representative of at least four individual mice.



Supplementary Figure-3

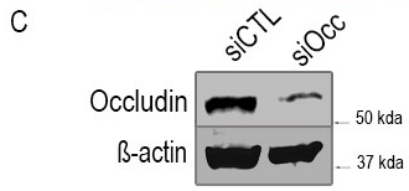
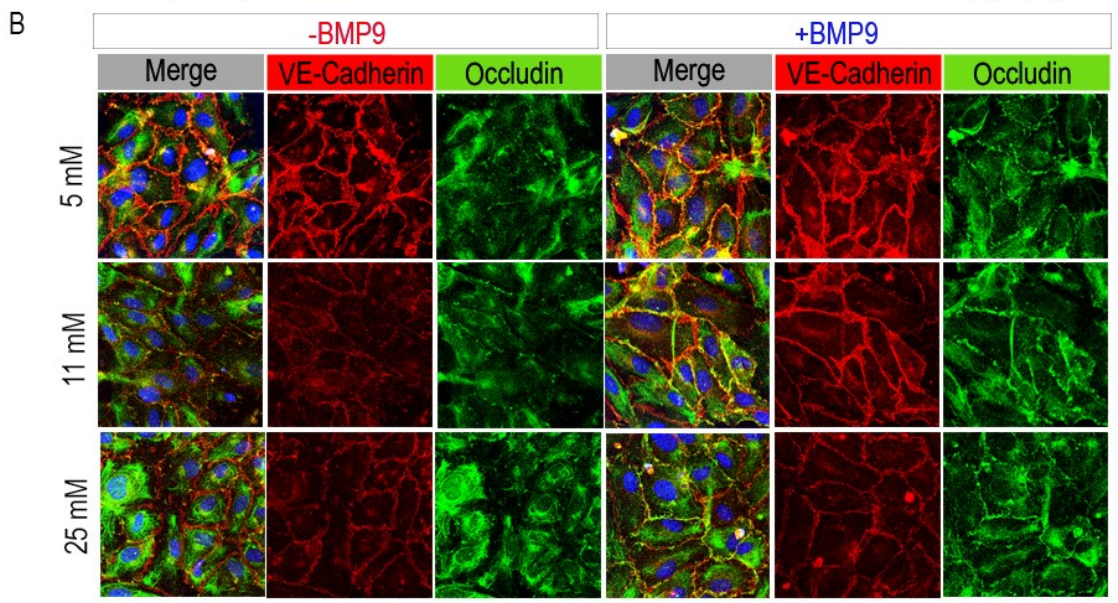
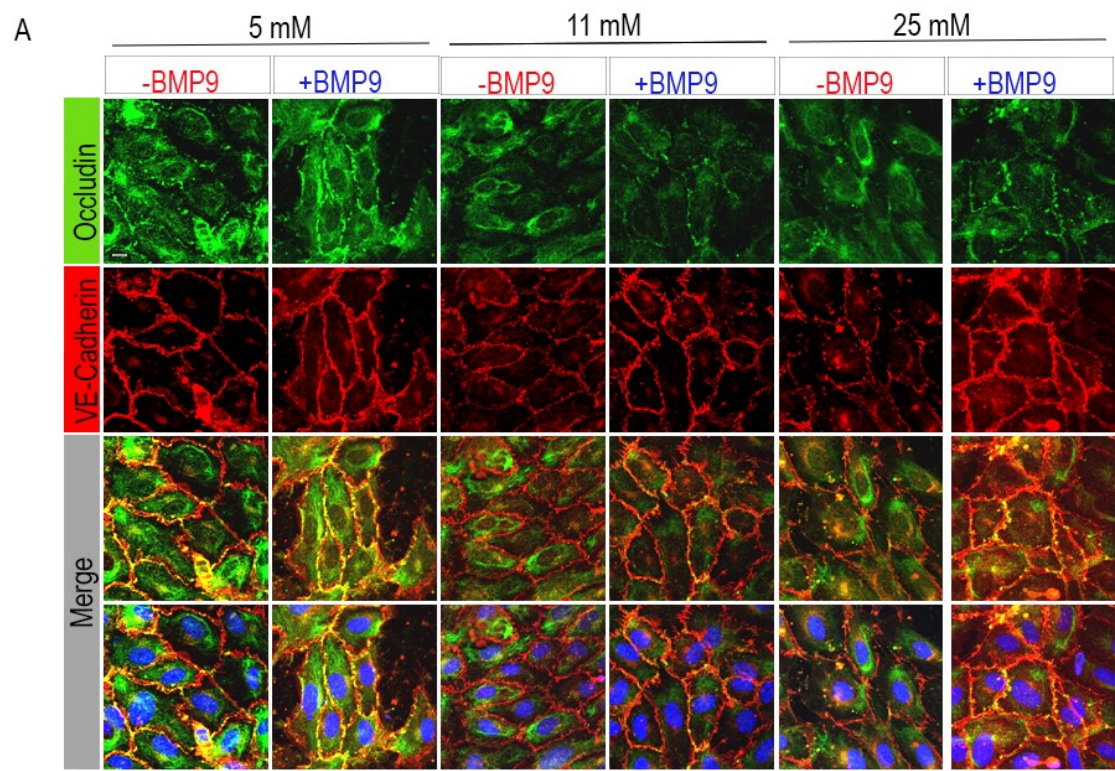
**Figure S2.3. Effects of BMP9 on vascular permeability.** (A) HRMECs in transwell boyden chambers following 18 hrs exposition to hyperglycemia (11 and 25 mM) or normoglycemia (5 mM) with or w/o BMP9 (10 ng/mL) were tested for Evans-Blue bound Albumin permeability (deposited in the upperchamber for 90 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  $\mu$ m. (G) Retinal flatmounts stained with IsoB4 (ECs; Red) or smooth muscle actin (SMA) (smooth muscle cells; green). Scale bar 30  $\mu$ m. Differences between means were analyzed using a t test (A, D), \* $p$ <0.05 and One-Way ANOVA with Tukeys MCT (E).



Supplementary Figure 4

**Figure S2.4. 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-5

**Figure S2.5. 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  $\mu$ m. (C) HUVECs transfected with SiRNA control or occludin siRNA were processed for Occludin immunoblotting (48 hrs post-transfection).



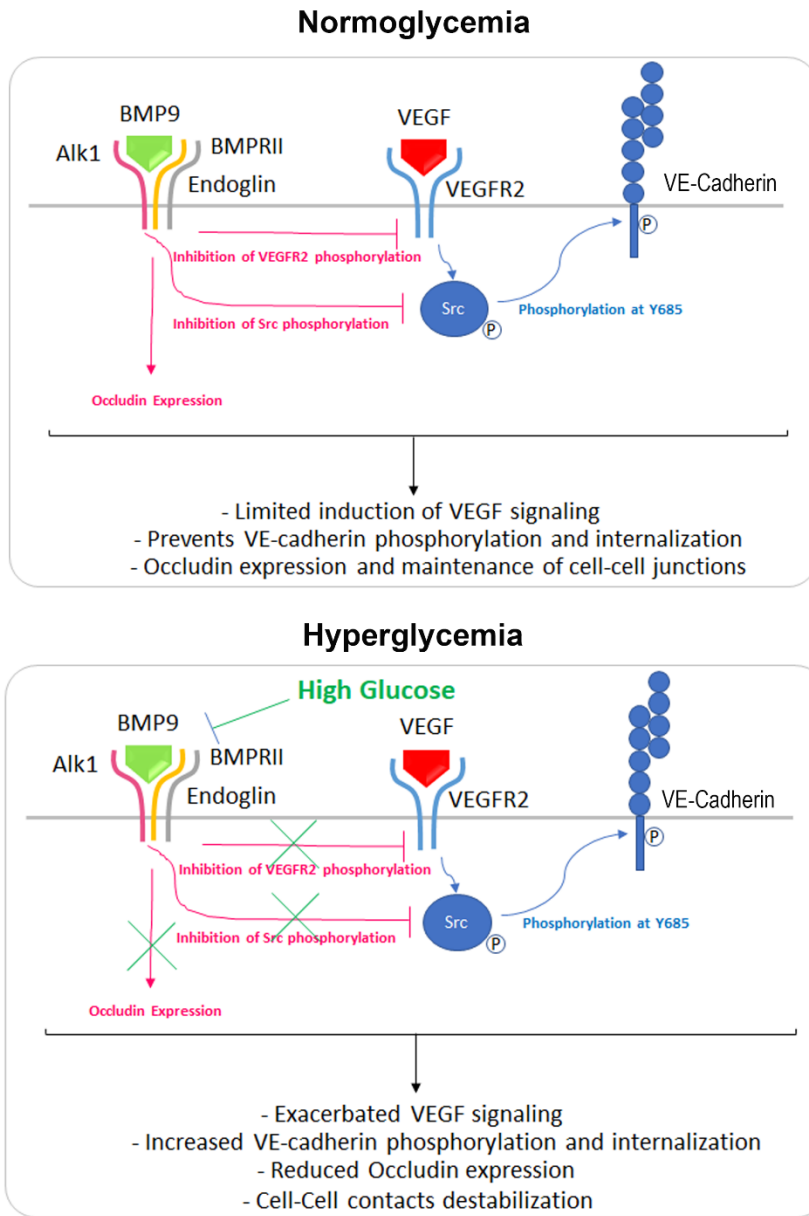


Figure-6

**Figure S2.6. Graphic depiction 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.

## 2.9 References

- Anand-Apte, B., Ebrahem, Q., Cutler, A., Farage, E., Sugimoto, M., Hollyfield, J., & Folkman, J. (2010). Betacellulin induces increased retinal vascular permeability in mice. *PLoS One*, 5(10), e13444. doi:10.1371/journal.pone.0013444
- Antonetti, D. A., Barber, A. J., Hollinger, L. A., Wolpert, E. B., & Gardner, T. W. (1999). 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*, 274(33), 23463-23467.
- Antonetti, D. A., Barber, A. J., Khin, S., Lieth, E., Tarbell, J. M., & Gardner, T. W. (1998). Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*, 47(12), 1953-1959.
- Antonetti, D. A., Lieth, E., Barber, A. J., & Gardner, T. W. (1999). Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol*, 14(4), 240-248. doi:10.3109/08820539909069543
- Barber, A. J., Antonetti, D. A., & Gardner, T. W. (2000). Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(11), 3561-3568.
- Bell, R. C., Khurana, M., Ryan, E. A., & Finegood, D. T. (1994). Gender differences in the metabolic response to graded numbers of transplanted islets of Langerhans. *Endocrinology*, 135(6), 2681-2687. doi:10.1210/endo.135.6.7988458
- Bertolino, P., Deckers, M., Lebrin, F., & ten Dijke, P. (2005). Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest*, 128(6 Suppl), 585s-590s. doi:10.1378/chest.128.6\_suppl.585S
- Bhagat, N., Grigorian, R. A., Tutela, A., & Zarbin, M. A. (2009). Diabetic macular edema: pathogenesis and treatment. *Surv Ophthalmol*, 54(1), 1-32. doi:10.1016/j.survophthal.2008.10.001
- Bidart, M., Ricard, N., Levet, S., Samson, M., Mallet, C., David, L., . . . Bailly, S. (2012). BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci*, 69(2), 313-324. doi:10.1007/s00018-011-0751-1
- Blinder, K. J., Dugel, P. U., Chen, S., Jumper, J. M., Walt, J. G., Hollander, D. A., & Scott, L. C. (2017). Anti-VEGF treatment of diabetic macular edema in clinical practice: effectiveness and patterns of use (ECHO Study Report 1). *Clin Ophthalmol*, 11, 393-401. doi:10.2147/ophth.s128509
- Boyer, D. S., Hopkins, J. J., Sorof, J., & Ehrlich, J. S. (2013). Anti-vascular endothelial growth factor therapy for diabetic macular edema. *Ther Adv Endocrinol Metab*, 4(6), 151-169. doi:10.1177/2042018813512360
- Brown, M. A., Zhao, Q., Baker, K. A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., . . . Choe, S. (2005). Crystal Structure of BMP-9 and Functional Interactions with Pro-region and Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 25111-25118. doi:10.1074/jbc.M503328200
- Cade, W. T. (2008). Diabetes-Related Microvascular and Macrovascular Diseases in the Physical Therapy Setting. *Physical Therapy*, 88(11), 1322-1335. doi:10.2522/ptj.20080008

- Campochiaro, P. A., Aiello, L. P., & Rosenfeld, P. J. (2016). Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Agents in the Treatment of Retinal Disease: From Bench to Bedside. *Ophthalmology*, *123*(10s), S78-s88. doi:10.1016/j.ophtha.2016.04.056
- Cerani, A., Tetreault, N., Menard, C., Lapalme, E., Patel, C., Sitaras, N., . . . Sapieha, P. (2013). Neuron-Derived Semaphorin 3A Is an Early Inducer of Vascular Permeability in Diabetic Retinopathy via Neuropilin-1. *Cell Metabolism*, *18*(4), 505-518. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.003
- Chawla, A., Chawla, R., & Jaggi, S. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, *20*(4), 546-551. doi:10.4103/2230-8210.183480
- Chen, C., Grzegorzewski, K. J., Barash, S., Zhao, Q., Schneider, H., Wang, Q., . . . Birse, C. E. (2003). An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotech*, *21*(3), 294-301. doi:http://www.nature.com/nbt/journal/v21/n3/supinfo/nbt795\_S1.html
- Chen, Y. G., & Massague, J. (1999). Smad1 recognition and activation by the ALK1 group of transforming growth factor-beta family receptors. *J Biol Chem*, *274*(6), 3672-3677.
- Claesson-Welsh, L. (2015). Vascular permeability—the essentials. *Upsala Journal of Medical Sciences*, *120*(3), 135-143. doi:10.3109/03009734.2015.1064501
- Clark, R. J., McDonough, P. M., Swanson, E., Trost, S. U., Suzuki, M., Fukuda, M., & Dillmann, W. H. (2003). Diabetes and the accompanying hyperglycemia impairs cardiomyocyte calcium cycling through increased nuclear O-GlcNAcylation. *J Biol Chem*, *278*(45), 44230-44237. doi:10.1074/jbc.M303810200
- Creager, M. A., Luscher, T. F., Cosentino, F., & Beckman, J. A. (2003). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*, *108*(12), 1527-1532. doi:10.1161/01.cir.0000091257.27563.32
- Dang, L., Seale, J. P., & Qu, X. (2005). HIGH GLUCOSE-INDUCED HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELL HYPERPERMEABILITY IS DEPENDENT ON PROTEIN KINASE C ACTIVATION AND INDEPENDENT OF THE Ca<sup>2+</sup>-NITRIC OXIDE SIGNALLING PATHWAY. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, *32*(9), 771-776. doi:10.1111/j.1440-1681.2005.04266.x
- Das, A., McGuire, P. G., & Monickaraj, F. (2016). Novel pharmacotherapies in diabetic retinopathy: Current status and what's in the horizon? *Indian J Ophthalmol*, *64*(1), 4-13. doi:10.4103/0301-4738.178154
- David, L., Feige, J. J., & Bailly, S. (2009). Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, *20*(3), 203-212. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.05.001
- David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamandé, N., Gasc, J.-M., Dupuis-Girod, S., . . . Bailly, S. (2008). Bone Morphogenetic Protein-9 Is a Circulating Vascular Quiescence Factor. *Circulation Research*, *102*(8), 914-922. doi:10.1161/circresaha.107.165530
- David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J., & Bailly, S. (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood*, *109*(5), 1953-1961. doi:10.1182/blood-2006-07-034124
- Dejana, E., Tournier-Lasserre, E., & Weinstein, B. M. (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. *Dev Cell*, *16*(2), 209-221. doi:10.1016/j.devcel.2009.01.004

- Duh, E. J., Sun, J. K., & Stitt, A. W. (2017). Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight*, 2(14). doi:10.1172/jci.insight.93751
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 300(4), C723-C742. doi:10.1152/ajpcell.00462.2010
- Eliceiri, B., Paul, R., Schwartzberg, P., Hood, J., Leng, J., & A Cheres, D. (2000). *Selective Requirement for Src Kinases during VEGF-Induced Angiogenesis and Vascular Permeability* (Vol. 4).
- Falavarjani, K. G., & Nguyen, Q. D. (2013). Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye (Lond)*, 27(7), 787-794. doi:10.1038/eye.2013.107
- Felinski, E. A., & Antonetti, D. A. (2005). Glucocorticoid regulation of endothelial cell tight junction gene expression: novel treatments for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*, 30(11), 949-957. doi:10.1080/02713680500263598
- Friedl, J., Puhmann, M., Bartlett, D. L., Libutti, S. K., Turner, E. N., Gnant, M. F., & Alexander, H. R. (2002). 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*, 100(4), 1334-1339.
- Gao, B.-B., Clermont, A., Rook, S., Fonda, S. J., Srinivasan, V. J., Wojtkowski, M., . . . Feener, E. P. (2007). Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med*, 13(2), 181-188. doi:http://www.nature.com/nm/journal/v13/n2/supinfo/nm1534\_S1.html
- Garcia-Ramirez, M., Hernandez, C., Ruiz-Meana, M., Villarroya, M., Corraliza, L., Garcia-Dorado, D., & Simo, R. (2011). Erythropoietin protects retinal pigment epithelial cells against the increase of permeability induced by diabetic conditions: essential role of JAK2/ PI3K signaling. *Cell Signal*, 23(10), 1596-1602. doi:10.1016/j.cellsig.2011.05.011
- Garrido-Martin, E. M., Blanco, F. J., Fernandez, L. A., Langa, C., Vary, C. P., Lee, U. E., . . . Bernabeu, C. (2010). Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. *BMC Mol Biol*, 11, 51. doi:10.1186/1471-2199-11-51
- Gavard, J. (2014). Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr*, 8(2), 158-164.
- Giannotta, M., Trani, M., & Dejana, E. (2013). VE-cadherin and endothelial adherens junctions: active guardians of vascular integrity. *Dev Cell*, 26(5), 441-454. doi:10.1016/j.devcel.2013.08.020
- Graham, M. L., Janecek, J. L., Kittredge, J. A., Hering, B. J., & Schuurman, H. J. (2011). The streptozotocin-induced diabetic nude mouse model: differences between animals from different sources. *Comp Med*, 61(4), 356-360.
- Hammes, H. P., Lin, J., Bretzel, R. G., Brownlee, M., & Breier, G. (1998). Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes*, 47(3), 401-406.
- Hawkins, B. T., & Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*, 57(2), 173-185. doi:10.1124/pr.57.2.4
- Hempel, A., Maasch, C., Heintze, U., Lindschau, C., Dietz, R., Luft, F. C., & Haller, H. (1997). High glucose concentrations increase endothelial cell permeability via activation of protein kinase C alpha. *Circ Res*, 81(3), 363-371.

- Hernandez, C., Fonollosa, A., Garcia-Ramirez, M., Higuera, M., Catalan, R., Miralles, A., . . . Simo, R. (2006). Erythropoietin is expressed in the human retina and it is highly elevated in the vitreous fluid of patients with diabetic macular edema. *Diabetes Care*, *29*(9), 2028-2033. doi:10.2337/dc06-0556
- Hossain, A., Heron, D., Davenport, I., Huckaba, T., Graves, R., Mandal, T., . . . Bhattacharjee, P. (2016). *Protective effects of bestatin in the retina of streptozotocin-induced diabetic mice* (Vol. 149).
- Ito, Y., Oike, Y., Yasunaga, K., Hamada, K., Miyata, K., Matsumoto, S.-i., . . . Suda, T. (2003). *Inhibition of Angiogenesis and Vascular Leakiness by Angiopoietin-Related Protein 4* (Vol. 63).
- Kim, L. A., & D'Amore, P. A. (2012). A Brief History of Anti-VEGF for the Treatment of Ocular Angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, *181*(2), 376-379. doi:https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.06.006
- Kim, M., & Choe, S. (2011). BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep*, *44*(10), 619-634. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.10.619
- Kim, Y. H., Park, S. Y., Park, J., Kim, Y. S., Hwang, E. M., Park, J. Y., . . . Choi, W. S. (2012). Reduction of experimental diabetic vascular leakage and pericyte apoptosis in mice by delivery of alphaA-crystallin with a recombinant adenovirus. *Diabetologia*, *55*(10), 2835-2844. doi:10.1007/s00125-012-2625-y
- Klaassen, I., Hughes, J. M., Vogels, I. M., Schalkwijk, C. G., Van Noorden, C. J., & Schlingemann, R. O. (2009). Altered expression of genes related to blood-retina barrier disruption in streptozotocin-induced diabetes. *Exp Eye Res*, *89*(1), 4-15. doi:10.1016/j.exer.2009.01.006
- Klaassen, I., Van Noorden, C. J., & Schlingemann, R. O. (2013). Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res*, *34*, 19-48. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.02.001
- Kloc, M., Kubiak, J. Z., Li, X. C., & Ghobrial, R. M. (2015). Pericytes, microvascular dysfunction, and chronic rejection. *Transplantation*, *99*(4), 658-667. doi:10.1097/tp.0000000000000648
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., & Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*, *437*(2), 169-183. doi:10.1042/bj20110301
- Kolluru, G. K., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2012). Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing. *International Journal of Vascular Medicine*, *2012*, 30. doi:10.1155/2012/918267
- Kraehling, J. R., Chidlow, J. H., Rajagopal, C., Sugiyama, M. G., Fowler, J. W., Lee, M. Y., . . . Sessa, W. C. (2016). Genome-wide RNAi screen reveals ALK1 mediates LDL uptake and transcytosis in endothelial cells. *Nat Commun*, *7*, 13516. doi:10.1038/ncomms13516
- Lamplot, J. D., Qin, J., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., . . . He, T. C. (2013). BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. *Am J Stem Cells*, *2*(1), 1-21.
- Lampugnani, M. G., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., . . . Dejana, E. (2003). Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin,  $\beta$ -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *The Journal of Cell Biology*, *161*(4), 793-804. doi:10.1083/jcb.200209019

- Larrivee, B., Prahst, C., Gordon, E., del Toro, R., Mathivet, T., Duarte, A., . . . Eichmann, A. (2012). ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell*, 22(3), 489-500. doi:10.1016/j.devcel.2012.02.005
- Lee, H. S., Namkoong, K., Kim, D. H., Kim, K. J., Cheong, Y. H., Kim, S. S., . . . Kim, K. Y. (2004). Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells. *Microvasc Res*, 68(3), 231-238. doi:10.1016/j.mvr.2004.07.005
- Lee, R., Wong, T. Y., & Sabanayagam, C. (2015). Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye and Vision*, 2(1), 17. doi:10.1186/s40662-015-0026-2
- Li, B., Yin, W., Hong, X., Shi, Y., Wang, H. S., Lin, S. F., & Tang, S. B. (2008). Remodeling retinal neovascularization by ALK1 gene transfection in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(10), 4553-4560. doi:10.1167/iovs.07-0995
- Li, Q., Verma, A., Han, P. Y., Nakagawa, T., Johnson, R. J., Grant, M. B., . . . Hauswirth, W. W. (2010). Diabetic eNOS-knockout mice develop accelerated retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(10), 5240-5246. doi:10.1167/iovs.09-5147
- Lim, Y. C., Bhatt, M. P., Kwon, M. H., Park, D., Lee, S., Choe, J., . . . Ha, K. S. (2014). Prevention of VEGF-mediated microvascular permeability by C-peptide in diabetic mice. *Cardiovasc Res*, 101(1), 155-164. doi:10.1093/cvr/cvt238
- Long, L., Ormiston, M. L., Yang, X., Southwood, M., Graf, S., Machado, R. D., . . . Morrell, N. W. (2015). Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat Med*, 21(7), 777-785. doi:10.1038/nm.3877
- Mathew, C., Yunirakasiwi, A., & Sanjay, S. (2015). Updates in the Management of Diabetic Macular Edema. *J Diabetes Res*, 2015, 8. doi:10.1155/2015/794036
- Mehta, D., & Malik, A. B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, 86(1), 279-367. doi:10.1152/physrev.00012.2005
- Meng, W., & Takeichi, M. (2009). Adherens junction: molecular architecture and regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1(6), a002899. doi:10.1101/cshperspect.a002899
- Miller, J. W., Adamis, A. P., Shima, D. T., D'Amore, P. A., Moulton, R. S., O'Reilly, M. S., . . . et al. (1994). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is temporally and spatially correlated with ocular angiogenesis in a primate model. *Am J Pathol*, 145(3), 574-584.
- Miloudi, K., Binet, F., Wilson, A., Cerani, A., Oubaha, M., Menard, C., . . . Sapieha, P. (2016). Truncated netrin-1 contributes to pathological vascular permeability in diabetic retinopathy. *J Clin Invest*, 126(8), 3006-3022. doi:10.1172/JCI84767
- Murakami, M., Nguyen, L. T., Zhang, Z. W., Moodie, K. L., Carmeliet, P., Stan, R. V., & Simons, M. (2008). The FGF system has a key role in regulating vascular integrity. *J Clin Invest*, 118(10), 3355-3366. doi:10.1172/JCI35298
- Navaratna, D., McGuire, P. G., Menicucci, G., & Das, A. (2007). Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes*, 56(9), 2380-2387. doi:10.2337/db06-1694
- Niessen, K., Zhang, G., Ridgway, J. B., Chen, H., & Yan, M. (2010). ALK1 signaling regulates early postnatal lymphatic vessel development. *Blood*, 115(8), 1654-1661. doi:10.1182/blood-2009-07-235655

- Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., . . . Li, E. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(6), 2626-2631. doi:10.1073/pnas.97.6.2626
- Ola, R., Dubrac, A., Han, J., Zhang, F., Fang, J. S., Larrivee, B., . . . Eichmann, A. (2016). PI3 kinase inhibition improves vascular malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nat Commun*, *7*, 13650. doi:10.1038/ncomms13650
- Park, S. O., Lee, Y. J., Seki, T., Hong, K. H., Fliess, N., Jiang, Z., . . . Oh, S. P. (2008). ALK5- and TGFBR2-independent role of ALK1 in the pathogenesis of hereditary hemorrhagic telangiectasia type 2. *Blood*, *111*(2), 633-642. doi:10.1182/blood-2007-08-107359
- Park, S. O., Wankhede, M., Lee, Y. J., Choi, E. J., Fliess, N., Choe, S. W., . . . Oh, S. P. (2009). Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest*, *119*(11), 3487-3496. doi:10.1172/jci39482
- Portero-Otin, M., Pamplona, R., Bellmunt, M. J., Ruiz, M. C., Prat, J., Salvayre, R., & Negre-Salvayre, A. (2002). Advanced glycation end product precursors impair epidermal growth factor receptor signaling. *Diabetes*, *51*(5), 1535-1542.
- Radu, M., & Chernoff, J. (2013). An in vivo assay to test blood vessel permeability. *J Vis Exp*(73), e50062. doi:10.3791/50062
- Rask-Madsen, C., & King, G. L. (2013). Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab*, *17*(1), 20-33. doi:10.1016/j.cmet.2012.11.012
- Rechtman, E., Harris, A., Garzosi, H. J., & Ciulla, T. A. (2007). Pharmacologic therapies for diabetic retinopathy and diabetic macular edema. *Clin Ophthalmol*, *1*(4), 383-391.
- Ricard, N., Ciais, D., Levet, S., Subileau, M., Mallet, C., Zimmers, T. A., . . . Bailly, S. (2012). BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood*, *119*(25), 6162-6171. doi:10.1182/blood-2012-01-407593
- Riehl, A., Nemeth, J., Angel, P., & Hess, J. (2009). The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell Commun Signal*, *7*, 12. doi:10.1186/1478-811x-7-12
- Roman, B. L., & Hinck, A. P. (2017). ALK1 signaling in development and disease: new paradigms. *Cell Mol Life Sci*. doi:10.1007/s00018-017-2636-4
- Romero-Aroca, P. (2010). Targeting the pathophysiology of diabetic macular edema. *Diabetes Care*, *33*(11), 2484-2485. doi:10.2337/dc10-1580
- Romero-Aroca, P. (2011). Managing diabetic macular edema: The leading cause of diabetes blindness. *World J Diabetes*, *2*(6), 98-104. doi:10.4239/wjd.v2.i6.98
- Romero-Aroca, P., Baget-Bernaldiz, M., Pareja-Rios, A., Lopez-Galvez, M., Navarro-Gil, R., & Verges, R. (2016). Diabetic Macular Edema Pathophysiology: Vasogenic versus Inflammatory. *J Diabetes Res*, *2016*, 2156273. doi:10.1155/2016/2156273
- Rudini, N., Felici, A., Giampietro, C., Lampugnani, M., Corada, M., Swirsding, K., . . . Dejana, E. (2008). VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *Embo j*, *27*(7), 993-1004. doi:10.1038/emboj.2008.46
- RUDNEY, H. (1940). THE UTILIZATION OF L-GLUCOSE BY MAMMALIAN TISSUES AND BACTERIA. *Science*, *92*(2379), 112-113. doi:10.1126/science.92.2379.112
- Sano, H., Hosokawa, K., Kidoya, H., & Takakura, N. (2006). Negative regulation of VEGF-induced vascular leakage by blockade of angiotensin II type 1 receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *26*(12), 2673-2680. doi:10.1161/01.ATV.0000245821.77155.c3

- Satirdav, G., Otulu, R., & Kerimoglu, H. (2014). Current evidence of pathophysiology of diabetic macular edema: A review. *World J Ophthalmology*, 4(4), 147-151. doi:10.1084/jem.20111343
- Seki, T., Yun, J., & Oh, S. P. (2003). Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res*, 93(7), 682-689. doi:10.1161/01.res.0000095246.40391.3b
- Senger, D. R., Connolly, D. T., Van de Water, L., Feder, J., & Dvorak, H. F. (1990). Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*, 50(6), 1774-1778.
- Shao, E. S., Lin, L., Yao, Y., & Boström, K. I. (2009). Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. *Blood*, 114(10), 2197-2206. doi:10.1182/blood-2009-01-199166
- Shin, E. S., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2014). Diabetes and retinal vascular dysfunction. *J Ophthalmic Vis Res*, 9(3), 362-373. doi:10.4103/2008-322x.143378
- Simo, R., Sundstrom, J. M., & Antonetti, D. A. (2014). Ocular Anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: the role of VEGF in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, 37(4), 893-899. doi:10.2337/dc13-2002
- Singer, M., Kermany, D., Waters, J., Jansen, M., & Tyler, L. (2016). *Diabetic macular edema: it is more than just VEGF [version 1; referees: 2 approved]* (Vol. 5).
- Sukriti, S., Tauseef, M., Yazbeck, P., & Mehta, D. (2014). Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulm Circ*, 4(4), 535-551. doi:10.1086/677356
- Takeda, M., Mori, F., Yoshida, A., Takamiya, A., Nakagomi, S., Sato, E., & Kiyama, H. (2001). Constitutive nitric oxide synthase is associated with retinal vascular permeability in early diabetic rats. *Diabetologia*, 44(8), 1043-1050. doi:10.1007/s001250100588
- Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M. G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D. H., . . . Letarte, M. (2005). A Role for Endoglin in Coupling eNOS Activity and Regulating Vascular Tone Revealed in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Circulation Research*, 96(6), 684-692. doi:10.1161/01.res.0000159936.38601.22
- Townson, S. A., Martinez-Hackert, E., Greppi, C., Lowden, P., Sako, D., Liu, J., . . . Grinberg, A. V. (2012). Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J Biol Chem*, 287(33), 27313-27325. doi:10.1074/jbc.M112.377960
- Urness, L. D., Sorensen, L. K., & Li, D. Y. (2000). Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet*, 26(3), 328-331. doi:10.1038/81634
- Wang, Y. L., Hui, Y. N., Guo, B., & Ma, J. X. (2007). Strengthening tight junctions of retinal microvascular endothelial cells by pericytes under normoxia and hypoxia involving angiopoietin-1 signal way. *Eye (Lond)*, 21(12), 1501-1510. doi:10.1038/sj.eye.6702716
- Warren, C. M., Ziyad, S., Briot, A., Der, A., & Iruela-Arispe, M. L. (2014). A Ligand-Independent VEGFR2 Signaling Pathway Limits Angiogenic Responses in Diabetes. *Sci Signal*, 7(307), ra1-ra1. doi:10.1126/scisignal.2004235
- Weis, S., Shintani, S., Weber, A., Kirchmair, R., Wood, M., Cravens, A., . . . Cheresch, D. (2004). Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation*, 113(6), 885-894. doi:10.1172/JCI200420702
- Wessel, F., Winderlich, M., Holm, M., Frye, M., Rivera-Galdos, R., Vockel, M., . . . Vestweber, D. (2014). Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by



different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol*, 15(3), 223-230.  
doi:10.1038/ni.2824

Williams, G., & Pickup, J. C. (2004). *Handbook of Diabetes*: Wiley.

Willmann, G., Nepomuceno, A. B., Messias, K., Barroso, L., Scott, I. U., Messias, A., & Jorge, R. (2017). Foveal thickness reduction after anti-vascular endothelial growth factor treatment in chronic diabetic macular edema. *Int J Ophthalmol*, 10(5), 760-764.  
doi:10.18240/ijo.2017.05.17

Wu, K. K., & Huan, Y. (2008). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol*, Chapter 5, Unit 5.47. doi:10.1002/0471141755.ph0547s40

Wu, Z., Wang, Z., Dai, F., Liu, H., Ren, W., Chang, J., & Li, B. (2016). Dephosphorylation of Y685-VE-Cadherin Involved in Pulmonary Microvascular Endothelial Barrier Injury Induced by Angiotensin II. *Mediators Inflamm*, 2016, 8696481. doi:10.1155/2016/8696481

Xu, Q., Qaum, T., & Adamis, A. P. (2001). Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(3), 789-794.

Zhang, S. X., Ma, J. X., Sima, J., Chen, Y., Hu, M. S., Ottlecz, A., & Lambrou, G. N. (2005). Genetic difference in susceptibility to the blood-retina barrier breakdown in diabetes and oxygen-induced retinopathy. *Am J Pathol*, 166(1), 313-321. doi:10.1016/s0002-9440(10)62255-9

Zhang, X., Zeng, H., Bao, S., Wang, N., & Gillies, M. C. (2014). Diabetic macular edema: new concepts in patho-physiology and treatment. *Cell Biosci*, 4, 27. doi:10.1186/2045-3701-4-27

## **Chapitre III : Deuxième article**

*Submitted to : Mol Metabol*

## **BMP9 (Bone Morphogenetic Protein-9) non-canonical signaling AKT/FOXO1 inhibits hepatic gluconeogenesis via Alk3**

**Naoufal Akla<sup>1,4</sup>, Przemyslaw Mike Sapiha<sup>1,2,4</sup> and Bruno Larrivée<sup>2,3,4,5\*</sup>**

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

<sup>2</sup>Department of Ophtalmology, University of Montreal, C.P. 6128, succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7.

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

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

<sup>5</sup>Departments of Molecular biology, 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.

### **3.1 Abstract**

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are critical for embryonic and post-natal homeostasis. Secreted by the liver, BMP9 has been implicated in vascular morphogenesis, yet little is known about its roles on hepatic metabolism. Here, we evaluated how BMP9 signaling affects glucose homeostasis in healthy and diabetic animals and investigated the molecular mechanisms underlying these effects. Adenoviral-mediated delivery of BMP9 in diabetic mice resulted in lowered blood glucose levels for up to 4 weeks after treatment. BMP9 decreased hepatic glucose production through inhibition of gluconeogenesis and decreased hepatic expression of gluconeogenic enzymes phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and glucose 6-phosphatase (G6Pase). We found that BMP9, through the receptor Alk3, regulates expression of gluconeogenic enzymes through phosphorylation of AKT, which led to FOXO1 phosphorylation and its subsequent transcriptional activity. Collectively, these data show that BMP9 delivery is a potent suppressor of hepatic gluconeogenesis and improves glucose control in diabetic mice and highlight BMP9/Alk3 signaling as a potential target for the development of diabetes-related metabolic complications.

## 3.2 Introduction

Diabetes is a significant health problem in Western societies and can lead to an array of debilitating complications including neuropathies, nephropathies and vasculopathies. While management of diabetes with insulin has greatly improved in recent years with strategies focusing on aggressive control of blood glucose levels, traditional insulin treatments still do not provide optimal therapy. Insulin delivered exogenously is not subjected to normal physiological feedback regulation, so it may lead to hypoglycemia even in the presence of a proper counterregulatory response (McCrimmon, 2008). Indeed, the average individual with type-1 diabetes can experience several episodes of symptomatic hypoglycemia per year (Frier, 2014). Insulin-induced hypoglycemia is associated with significant morbidity and mortality, and as such, there is a need to identify alternative therapies to control blood glucose levels in patients with diabetes.

Diabetic hyperglycemia is fed by an exaggerated production of hepatic glucose, which can occur either by rapid glycogen breakdown (glycogenolysis) or through a *de novo* glucose synthesis process, termed gluconeogenesis, which generate glucose from non-carbohydrate metabolites such as pyruvate in the liver and kidneys (Aronoff et al., 2004; Gerich et al., 2001). In healthy fasting individuals, the two processes overlap in chronological order and up to 90% of the glucose produced by the liver during the initial 60 to 90 minutes of fasting comes from hepatic glycogenolysis (Winnick et al., 2016). Gluconeogenesis is mainly responsible for postprandial glucose production during the late postabsorptive state (Ayala et al., 2010; Service, 1991). Three rate-limiting gluconeogenic enzymes insure glucose release in circulation, phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose-6-phosphatase (FBPase) and glucose-6-phosphatase (G6Pase). This latter enzyme is present only in the liver and renal cortex, and is therefore crucial for the hydrolysis of G6P to free glucose from its intracellular form (Gerich, 2001; Gerich et al., 2001; Service, 1991). These enzymes are regulated at the transcriptional level by glucoregulatory hormones such as insulin, glucagon and glucocorticoid, and contribute to the maintenance of blood glucose levels in a physiological range. However, chronic hyperglycemia dysregulates gluconeogenic gene normal repression and increases hepatocellular

glucose production (Shao et al., 2005; Sharabi et al., 2015). The identification of molecular effectors that regulate hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis would therefore represent efficient tools to help control blood glycemia in diabetic patients.

Bone morphogenic proteins (BMPs) are group of secreted ligands that belong to the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily and are found in all multicellular organisms (Ramel et al., 2012). In humans, alterations of BMP signaling results in various vascular diseases and bone and skeletal abnormalities (Miyazono et al., 2010). BMP family members have also been associated with several metabolic disorder including obesity and diabetes (Kim et al., 2011). Published studies have identified the circulating hepatic Bone Morphogenetic Protein-9 (BMP9) as an important factor for the maturation and stabilization of blood vessels (Akla et al., 2018; Larrivee et al., 2012). In addition to its roles during vascular morphogenesis, BMP9 has also been shown to regulate-glucose homeostasis (Caperuto et al., 2008; Chen et al., 2003) as well as brown adipogenesis (Kuo et al., 2014) Mechanistically, BMP9 has been shown to inhibit hepatic glucose production and to modulate the expression of key enzymes of glucose and lipid metabolism (Chen et al., 2003)

BMP9 initiates signal transduction through a heterotetrameric receptor complex composed of two type I and type 2 receptors. It has been shown to bind to Alk1 with high affinity but also interacts with Alk2, Alk3 and Alk7 with lower affinity (Brown et al., 2005; Coskuner et al., 2017; David et al., 2007; Mi et al., 2015; Scharpfenecker et al., 2007). In the canonical pathway, the activated type I receptors recruit and phosphorylate the transcription factors Smad1,5,9 which subsequently translocate to the nucleus to regulate target gene transcription (Leblanc et al., 2013). In addition, BMPs are also associated with numerous non-canonical pathways, including Erk, Jnk and PI3K/AKT (Herrera et al., 2017).

While the effects of BMP9 on blood vessel quiescence and bone formation have been relatively well described (Leblanc et al., 2013; Ouarne et al., 2018), its effects on glucose metabolism remain unclear. Using a secreted cDNA library in a functional genomic screen and high-throughput cell-based assays, a 2003 study by Chen and colleagues identified BMP9 as an inhibitor of gluconeogenesis and activator of lipid metabolism (Chen et al., 2003). In this study,

subcutaneous injections of BMP9 lowered blood glucose levels to near-normal levels in freely fed diabetic mice, with maximal reduction observed 24 to 30 hours after treatment and improved glycemic control in normal and diabetic mice. Further links between BMP9, glucose homeostasis have been drawn from studies on diabetic patients where reduced circulating levels of BMP9 were correlated with insulin resistance (Luo et al., 2017) and associated vascular dysfunction (Huang et al., 2018).

We have recently demonstrated that BMP9 prevents vascular dysfunctions in diabetic mice, in part by restricting vascular permeability (Akla et al., 2018). In the present study, we investigated the long-term effects of BMP9 delivery on glucose homeostasis in diabetic mice and investigated the mechanisms underlying these effects. Using adenoviral delivery of BMP9 in diabetic mice, we show that elevated circulating BMP9 consistently lower blood glucose levels. Mechanistically, we demonstrate that BMP9 acts by activating Alk3/AKT signaling in hepatic cells, leading to FOXO1 phosphorylation and inhibition of gluconeogenic enzymes PEPCK and G6Pase. Long-term inhibition of hepatic gluconeogenesis in mice following BMP9 delivery also resulted in decreased hepatic glycogen content and increased levels of glucagon.

### **3.3 Materials and methods**

#### **Antibodies and reagents**

Mouse primary antibodies and primers used in this study are described in supplementary Table 1-2. Primers for Alk1 (*Acvr1l*), Alk2 (*Acvr1*), Alk3 (*Bmpr1a*) and Alk7 (*Acvr1c*) were acquired from Qiagen (Quantitect Primer Assay). Small interfering RNA (siRNA) pre-designed against Alk1; (*acvr1l*; SI0088914), Alk2 (*acvr1*; SI00888867), Alk3 (*BMPR1a*; SI00929971), Alk7 (*acvr1c*; SI00888923) or scrambled control were acquired from Qiagen. BMP9 ELISA kit was purchased from R&D systems (DY5566). Recombinant BMP9 was obtained from R&D systems (3209-BP/CF). Insulin (recombinant DNA origin) was kindly donated by HMR hospital staff (Humulin R; Eli Lilly).

## **Animal experiments**

Male C57BL/6J mice (Charles River) housing, experimental procedures and testing were carried out in accordance with the Canadian council on animal care and approved by the institutional ethics committee. Mice were kept in groups of 5 in temperature and humidity-controlled cages with a reversed 12 hrs light/dark cycle with *ad libitum* access to food (Teklad global 18% protein) and water or subjected to fasting before tolerance tests experiments. Alpha Trak whole-blood glucose monitor was used to acquire multiple sampling in tolerance tests or long-term glucose measurements. Mouse weight and food consumption were measured twice weekly. Food was weighed and replaced with a known amount for each group of mice. The amount of ingested food was calculated by subtraction from total food added and divided by the number of mice per group and number of days.

## **Hepatocyte cell line cultures**

Murine hepatocytes (AML12; ATCC) were cultured in DMEM:F-12 medium supplemented with 10% FBS, ITS (Insulin; 0.005 mg/mL, transferrin; 0.005 mg/mL and selenium; 5 ng/mL), dexamethasone (40 ng/mL) and Penicillin/Streptomycin. Cells were kept in a constant humidified incubator (5% CO<sub>2</sub>; 37°C). When cells reached near confluency, they were starved O/N in basal DMEM:F-12 supplemented with 0.5% FBS) and treated with rhBMP9 (0, 10 or 100 ng/mL).

## **RNA Interference**

Briefly, 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 24 hrs followed by overnight starvation with basal media. The next day, cells were stimulated for 15 minutes with rhBMP9 and lysed in denaturing buffer for protein analysis.

## **Streptozotocin (STZ) induced diabetes**

Six to eight-week old C57BL/6J 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 (Wu et al., 2008)). For non-diabetic controls, mice received citrate buffer injections. Tail blood glucose was monitored 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; (Cerani et al., 2013)).

### **Adenoviral Delivery**

Adenoviral constructs were produced and purified as previously described (Akla et al., 2018). STZ-injected mice groups with stable hyperglycemia were randomly assigned to receive i.p. injections of  $5 \times 10^8$  pfu of Ad-BMP9 or empty vehicle adenovirus (Ad-CTL).

### **Intraperitoneal Glucose tolerance test (IPGTT) and Intraperitoneal Pyruvate tolerance test (IPPTT)**

For glucose tolerance tests, C57BL/6J male mice injected three days prior with control or BMP9 adenoviral particles were denied access to food for 16 hrs, followed by intraperitoneal injections of D-glucose ( $2 \text{ mg g}^{-1}$  body weight) (Ayala et al., 2010). Glucose serum levels were monitored before IP glucose delivery and at 15, 30, 60, 90- and 150-min following glucose injections. Blood glucose was sampled from a drop of blood obtained from an incision in the tail. The area under-curve (A.U.C) was obtained from base line level of glucose. Tolerance tests were all performed on male mice of similar age and weight. For IPPTT, fasting mice (16 hrs) injected three days prior with control or BMP9 adenoviral particles received intraperitoneal injections of sodium pyruvate ( $1 \text{ mg g}^{-1}$ ) in PBS and blood glucose levels were measured at 15, 30, 60, 90- and 150-min following pyruvate injections (Yang et al., 2013).

### **Intraperitoneal Insulin tolerance test (IPITT)**

For insulin tolerance tests, C57BL/6J male mice injected three days prior with control or BMP9 adenoviral particles were fasted for 4 hrs. Immediately before intraperitoneal insulin injections, mice were deprived of water, base line blood glucose was measured (0 min) and then monitored at 15, 30, 45, 60 and 120 min after receiving insulin injections ( $0.5 \text{ U/kg}$  in 0.9% w.v. sterile saline). The IPITT procedures were followed as directed by the NIH-National Mouse metabolic phenotyping center (MMPC).

### **Protein extraction and WB Analysis**

Fragments of the right medial lobe of livers (approx. 300 mg) samples were removed, nitrogen snap-frozen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until time of further processing. Liver tissues were crushed manually and homogenates were prepared in triple detergent lysis buffer (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate) with protease and phosphatase inhibitors and centrifuged to remove particulate matter. Protein samples were denatured in Laemmli buffer, separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose and blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) or 5% skimmed milk in tris buffered saline (PH 7.5) containing 0.1% Tween (TBST) at R/T for 30 min. Membranes were then incubated with appropriate primary antibodies for 1 hr at R/T or O/N at  $4^{\circ}\text{C}$  and then probed for 1hr at R/T with the proper antibody-conjugated horseradish peroxidase secondary antibody in 3% BSA TBST buffer. Densitometric luminescent specific band intensity quantification of detected immunoblotting protein-antibodies complexes was done by image j software.

### **Immunofluorescence**

AML12 cells were stimulated for 16 hours with 100 ng/nl BMP9. Following stimulation, cells were fixed for 10 min with 4% paraformaldehyde, washed and blocked/permeabilized for 30 minutes in TBS-0.3% TritonX-3%BSA. After incubation with primary antibody O/N at  $4^{\circ}\text{C}$ , cells were washed, incubated with secondary antibodies, washed and mounted. Slides were then mounted with fluoromount containing DAPI (Sigma) and visualized by confocal microscopy. The number of FOXO1 nuclear foci were counted using ImageJ.

### **RNA isolation and real time PCR Analysis**

Total RNA was isolated from cells or mouse liver samples using RNeasy Plus kit (Qiagen). First strand cDNA was synthesized with 500 ng of total RNA using iScript reverse transcription kit (Biorad) and gene expression was quantitated by real time PCR (ABI7500:Biorad) using iTaq Universal SYBR Green Dye.

## Metabolic and hormonal measurements

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 x g. Serum or plasma were removed and assayed immediately or stored at -80° C. Extracted plasma was analyzed for insulin (Ultrasensitive ELISA kit from Chrystal Chem; 90080) or Corticosterone (Competitive ELISA kit from Invitrogen; EIACORT). Fructosamine serum levels were measured by a colorimetric assay based on the ability of fructosamine to reduce nitroblue tetrazolium (NBT), forming a colored end-product (formazan) which is a direct proportional determination of fructosamine concentration. Liver samples were immediately frozen after mouse sacrifice and tissue homogenates were used to perform the assays for glycogen content (Colorimetric Assay kit; Abcam) and glucose-6-phosphate (Fluorometric assay kit; Cayman). Pancreatic endocrine glucagon levels were analyzed by western blot.

## Statistical analysis

Differences between groups were calculated using a student's t-test or ANOVA with Tukey's post-hoc test for multiple comparisons using Graphpad Prism 5.01 software. All data represent mean  $\pm$  SEM. P-values of 0.05 or lower were considered significant.

## 3.4 Results

### 3.1 BMP9 delivery ameliorates glucose tolerance in fasted mice.

To assess the effects of BMP9 signaling on glucose metabolism, we injected adenoviral viral vectors, which efficiently transduce hepatic cells, to increase circulating levels of BMP9 (Ad-BMP9). Adenoviral particles produced from the empty vector (Ad-CTL) were used as control. Mice injected three days prior with adenoviral particles were subjected to an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) (Andrikopoulos et al., 2008). Injection of adenoviral particles raised BMP9 serum levels from an average of 13.2 pg/ml (Ad-CTL) to 153.6 pg/ml (Ad-BMP9) (**Figure S3.1A**). Animals were fasted for approximately 16 hours and glucose levels were measured for up to 2hrs following IP injection of 2 g/kg body weight D-Glucose (**Figure 3.1A**)

(Jorgensen et al., 2017). Fasting glucose serum levels were reproducibly and significantly lower in mice injected with Ad-BMP9 (5 mM) than in mice injected with control adenoviral particles (6.3 mM) (**Figure 3.1B**). At 30 min after administering glucose, there was a significant difference in serum blood glucose levels and glucose area under the curve (AUC) between Ad-BMP9 and wild type mice and Ad-CTL-injected mice (**Figure 3.1C,D**). Evaluation of blood insulin levels did not reveal significant differences between control and BMP9-injected animals (**Figure 3.1E**).

To evaluate whether differences in glucose clearance between in BMP9-injected animals could be a consequence of altered sensitivity to insulin, we performed intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT). Control and BMP9-injected animals showed an early decrease in blood glucose concentrations in response to insulin injection (control: 10.6 mmol/l before vs. 7.3 mmol/l 30 min after insulin injection) (BMP9: 11.2 mmol/l before vs 7.2 mmol/l after insulin injection) (**Figure 3.1F**). As BMP9 and control-injected animals responded similarly to insulin injection (0.5 U/kg), these data suggest that BMP9 expression does not alter insulin sensitivity.

### 3.2 BMP9 inhibits hepatic gluconeogenesis in fasted non-diabetic mice.

Blood glucose conversion following pyruvate challenge is known to be altered in mice with liver-specific changes in expression of genes important for gluconeogenesis (Wang et al., 2015). We challenged mice injected three days prior with adenoviral particles with pyruvate to evaluate if chronic BMP9 delivery could alter the metabolic conversion of a gluconeogenic substrate to glucose. As expected, control mice responded strongly to pyruvate by increasing blood glucose, which peaked 30 minutes after pyruvate injections and gradually decreased afterwards (**Figure 3.2A**). However, mice treated with BMP9 adenoviral particles showed little to no response to pyruvate delivery, suggesting impaired gluconeogenesis.

We then analyzed the hepatic expression of proteins involved in gluconeogenesis. The transcription factor FOXO1 has been reported to be a critical regulator of hepatic gluconeogenesis through its induction of the expression of gluconeogenic enzymes, including PEPCK (encoded by *PCK1*) and G6Pase, (encoded by *G6PC*), which are rate-limiting enzymes in hepatic gluconeogenesis (Gross et al., 2009; Lu et al., 2012). It is generally accepted that

FOXO1 is active during fasting and inactivated by AKT-induced phosphorylation, which is the predominant mechanism by which insulin suppresses hepatic gluconeogenesis after a meal (Lu et al., 2012). Liver samples from mice injected three days prior with adenoviral particles were subjected to western blot analysis (**Figure 3.2B-C**). Protein analysis (**Figure 3.2B**) and densitometric quantification (**Figure 3.2C**) revealed a significant increase in FOXO1 phosphorylation which was associated with an overall decrease in total FOXO1 levels. Quantitative PCR analysis of *FOXO1* on liver samples did not show any significant difference between Ad-BMP9 and Ad-CTL fasted mice (**Figure 3.2D**), suggesting that decreased FOXO1 protein levels in BMP9-treated animals are a consequence of posttranslational modifications such as phosphorylation. Increased FOXO1 phosphorylation at Ser256 has been shown to lead to nuclear exclusion, and combined with lower expression of the total protein, suggest decreased transcriptional activity (Matsuzaki et al., 2003; Nakae et al., 2001; OSullivan et al., 2015; Smith et al., 2017). Accordingly, when we performed FOXO1 immunofluorescent staining on AML12 hepatocytes treated O/N with 100ng/ml BMP9, we observed decreased overall FOXO1 fluorescence intensity and nuclear localization (**Figure 3.2E**), which was revealed by quantification of nuclear FOXO1 foci (**Figure 3.2F**).

We also observed a significant reduction in associated downstream hepatic enzymes PEPCK and G6Pase in BMP9-overexpressing animals compared to Ad-CTL (**Figure 3.2B-C**). In contrast to *FOXO1*, analysis of RNA transcripts of gluconeogenic enzymes in mouse liver samples by real time PCR showed a significant decrease of *pepk1*, *g6pc* and *fbp1* in Ad-BMP9 treated mice compared to Ad-CTL (**Figure 3.2G**), consistent with decreased transcriptional activity of FOXO1. These data suggest that BMP9 leads to FOXO1 phosphorylation, which results in its degradation and/or nuclear exclusion, in turn leading to decreased transcription of its targets *pepk1*, *g6pc* and *fbp1*.

We next evaluated whether FOXO1 phosphorylation and degradation could be directly regulated through BMP9 signaling. Immunoblotting of AML12 mouse hepatocytes treated with BMP9 for 20 hrs at different concentrations (0, 10 and 100 ng/mL) revealed a marked dose-dependent phosphorylation of AKT, an important upstream regulator of FOXO1 activity. Indeed, we also observed a significant reduction in FOXO1 protein levels. Importantly, we also

observed a reduction of PEPCK and G6Pase following BMP9 treatment at both concentrations (**Figure 3.2H,I**). Interestingly, as G6Pase plays a central role in releasing free glucose from glucose-6-phosphate, decreased levels of hepatic G6Pase were associated with a significant 3-fold increase in G6P accumulation in mice injected three days prior with Ad-BMP9 compared to Ad-CTL (**Figure 3.3A**). Taken together, these data suggest that BMP9 may be a potent inhibitor of hepatic glucose release through the modulation of FOXO1 hepatic levels and the expression of its downstream targets *pepk1*, *g6pc* and *fbp1*.

### 3.3 BMP9 treatment leads to decreased hepatic glycogen contents and Glucose-6-Phosphate accumulation

Glycogenesis and glycogenolysis in hepatocytes are dependent on the concentrations of circulating glucose levels and gluconeogenic precursors as well as insulin and glucagon production (Aronoff et al., 2004; Roder et al., 2016; Service, 1991) High concentrations of glucose (15-25 mM) and gluconeogenic precursors (lactate and pyruvate) have been shown to have a synergistic effect on glycogen deposition in both periportal and perivenous hepatocytes (Agius et al., 1990) Given that BMP9 blocks gluconeogenesis and leads to decreased fasting glucose levels, we evaluated the consequences of chronic BMP9 delivery on hepatic glycogen storage. Liver glycogen content was measured in fasting mice, and we show that Ad-BMP9 mice had significantly decreased stores compared to Ad-CTL mice (**Figure 3.3B**). To determine whether changes in gluconeogenesis and glycogen contents that were observed with BMP9 overexpression were associated with changes in glucagon release, glucagon levels were evaluated by western blot from pancreatic tissue harvested from control or BMP9-overexpressing mice (**Figure 3.3C**). Quantifications of band intensity revealed a significant increase in glucagon in BMP9-overexpressing mice (**Figure 3.3D**). Increased glucagon levels could represent a counterregulatory consequence of inadequate gluconeogenesis and low blood glucose levels in BMP9-expressing mice.

### 3.4 Long term exposure to BMP9 improves glucose control in diabetic mice

We next evaluated whether chronic BMP9 delivery could regulate blood glucose levels in STZ diabetic mice (**Figure 3.4**). In our standard protocol, elevated blood glucose levels (17 mmol/L) observed post-STZ injections are used to confirm diabetes in mice (Cerani et al., 2013). Two

weeks after STZ induction and stabilization of blood glycemia, (**Figure 3.4A; Figure S3.1B**), mice received intraperitoneal adenoviral particles encoding either BMP9 or empty vector CTL (**Figure 3.4B**). Non-diabetic mice injected with citrate buffer also received injections of adenoviruses and were used as controls (**Figure 3.4C**). Levels of circulating BMP9 following adenovirus injections remained elevated 4 weeks after delivery in diabetic mice (82.7 pg/ml for Ad-BMP9 vs 22.8 for Ad-CTL) (**Figure S.3.1C**). Three days after delivery of BMP9 adenoviral particles, we observed a sharp decrease in blood glucose levels (22,9 mM before vs 12,7 mM after injections) in diabetic mice, which remained lower than CTL mice for up to three weeks (**Figure 3.4B**). Over the course of the experiment, no significant changes in body weight or food intake were noted (**Figure S3.1D-E**). In non-diabetic mice, BMP9 delivery did not significantly alter blood glucose levels (**Figure 3.4C**). Analysis of insulin levels showed a significant decrease in STZ-injected mice compared to citrate-injected mice; in both diabetic and non-diabetic mice, BMP9 adenoviral delivery did not significantly alter insulin levels (**Figure 3.4D**).

Clinical use of advanced glycation end-products (AGE) such as HbA1C and fructosamine levels provide more information about long-term glycemia than do acute measurements of blood glucose concentrations, which reflect only current momentary situation. We measured fructosamine levels (glycated albumin), which are representative of short-term control of blood sugar for the past 1-3 weeks and provide a precise information on glucose control (Callejas et al., 2013). Fructosamine levels, which were significantly higher in STZ-injected mice compared to citrate-injected mice, decreased significantly in Ad-BMP9 diabetic mice compared to Ad-CTL diabetic animals (**Figure 3.4E**). Together, these data confirm that sustained BMP9 expression in diabetic mice leads to an improved control of blood glycemia over longer periods.

### 3.5 Chronic treatment with BMP9 regulates the hepatic gluconeogenic response in STZ-mice

Hepatic gluconeogenesis is increased in mice with type-1 diabetes (Petersen et al., 2017). We examined whether treatment with BMP9 in diabetic mice also led to changes in hepatic gluconeogenic enzymes RNA levels (**Figure 3.5A**). Accordingly, we observed a significant increase in *pepck*, *g6pase* and *fbpase* expression in STZ-treated Ad-CTL mice compared to non-diabetic Ad-CTL treated mice (**Figure 3.5A**). Treatment with Ad-BMP9 resulted in a marked

inhibition of *pepck*, *fbpase* and to a lesser extent of *g6pase*, compared to Ad-CTL, in both non-diabetic and diabetic animals (**Figure 3.5A**).

Given that the expression of these enzymes is modulated through FOXO1, we investigated liver homogenates by western blot to evaluate FOXO1 levels following BMP9 treatments in diabetic animals (**Figure 3.5B-C**). Immunoblotting revealed a reduction in hepatic FOXO1 protein levels in Ad-BMP9 mice compared to Ad-CTL diabetic mice. Taken together, these data show that long-term BMP9 treatment in diabetic animals result in lower FOXO1 protein levels and a significant reduction in the expression of gluconeogenic enzymes.

### 3.6 BMP9 modulates hormonal regulation of glucose homeostasis in diabetic animals.

We evaluated liver glycogen content in control and diabetic mice four weeks after delivery of adenoviral particles. As previously reported, STZ treatment in mice resulted in a significant decrease in hepatic glycogen content (Alkhalidy et al., 2018; Hammad et al., 1982; Rerup et al., 1969). In diabetic mice, treatment with Ad-BMP9 further decreased glycogen content compared to Ad-CTL animals (**Figure 3.6A**). Analysis of pancreatic lysates by western blot revealed a 50% increase in pancreatic glucagon content in Ad-BMP9 compared to Ad-CTL STZ mice (**Figure 3.6B**), although these changes were not significant. Corticosterone is known to have a permissive effect on glucagon, antagonizes insulin and accelerates gluconeogenesis through activation of *pepck* and *g6pase* genes (Yabaluri et al., 2010). We investigated whether serum glucocorticoid corticosterone levels are affected by BMP9 treatment in diabetic mice. While the induction of diabetes did not significantly alter the levels of corticosterone, we found that Ad-BMP9 diabetic mice had significantly lower levels of plasma corticosterone compared to Ad-CTL diabetic animals (**Figure 3.6C**). These data show that BMP9 reduces counterregulatory hormone corticosterone, which may hinder glucose production and contribute to the effects of BMP9 on gluconeogenesis.

### 3.7. BMP9 mediated AKT suppression of gluconeogenesis requires *Alk3*

In endothelial cells, BMP9 mediates vascular quiescence through *Alk1/Smad1,5,9* signaling, but it is unknown which receptors/signaling pathways mediate the effects of BMP9 on gluconeogenesis in hepatic cells. A 15 minutes stimulation of AML12 hepatocytes with BMP9



resulted in rapid phosphorylation of Smad1,5,9 at 10 and 100 ng/ml (**Figure 3.7A-B**). Phosphorylation of non-canonical AKT/FOXO1 in response to BMP9 was also observed. These data suggest that BMP9 directly triggers phosphorylation of these proteins in hepatocytes. BMP9 is a high affinity ligand for Alk1, which mediates most of its effects in the vascular endothelium (David et al., 2007). Studies have also revealed that BMP9 can bind with lower affinity to Alk2, Alk3 and Alk7 (Brown et al., 2005; Coskuner et al., 2017; Mi et al., 2015; Scharpfenecker et al., 2007). To evaluate which receptor mediates BMP9-induced phosphorylation of AKT and FOXO1 in hepatic cells, we assessed the expression of BMP9 receptors in liver samples and AML12 cells by qPCR (Alk1 (*acvr1l*), Alk2 (*acvr1*), Alk3 (*bmpr1a*) and Alk7 (*acvr1c*); **Figure 3.7C**). In both liver samples and cultured hepatocytes, both Alk2 and particularly Alk3 showed robust expression but expression of Alk1 and Alk7 was significantly lower both in vivo and in vitro. To evaluate the contribution of type I BMP receptors in BMP9-mediated phosphorylation of AKT and FOXO1, these receptors were inhibited in cultured hepatocytes using siRNA silencing (**Figure 3.7D-E**; **Figure S3.1F**). Transfection significantly downregulated each type 1 receptor mRNA levels (63%, 70%, 65% and 64% relative to scrambled siRNA for *acvr1l*, *acvr1*, *bmpr1a* and *acvr1c*, respectively (**Figure S3.1F**). As observed previously, a 15-minute stimulation with 100 ng/ml BMP9 resulted in phosphorylation of AKT and FOXO1 in scrambled siRNA-transfected cells. However, the phosphorylation of both AKT and FOXO1 in response to BMP9 was completely abrogated when Alk3 was silenced (**Figure 3.7D**). By contrast, knockdown of Alk1, Alk2 and Alk7 showed no significant alterations in BMP9 signaling. These data suggest that BMP9 signaling may be mediated by Alk3 in hepatocytes, as opposed to endothelial cells, where Alk1 is responsible for most of BMP9 signaling. We also evaluated the contribution of Alk3 in BMP9-induced down-regulation of gluconeogenic enzymes. A 20h stimulation with BMP9 resulted in a significant decrease in FOXO1, PEPCK and G6pase protein levels in scrambled-transfected cells (**Figure 3.7E**). Similarly to what was observed with AKT and FOXO1 phosphorylation, inhibition of Alk3 abrogated the effects of BMP9 on gluconeogenic enzyme expression, whereas knockdown of Alk1, Alk2 and Alk7 did not (**Figure 3.7E**). Taken together, these data show that BMP9 can lead to the phosphorylation and degradation of FOXO1 and the downregulation of gluconeogenic enzymes in cultured hepatocytes through the receptor Alk3.

### 3.5 Discussion

Exacerbated glucose production from hepatic gluconeogenesis is a hallmark of elevated chronic hyperglycemia and is a contributing factor to diabetes-related complications. In the current study, we found that normalization of blood glucose levels following BMP9 overexpression in STZ-diabetic mice correlated with inhibition of gluconeogenesis and the depletion of hepatic glycogen. In addition, chronic overexpression of BMP9 in diabetic mice was associated with increased glucagon and decreased corticosterone serum levels. Mechanistically, we demonstrated that treatment of hepatic cells with BMP9 results in activation of AKT signaling, leading to the phosphorylation of FOXO1, which is directly involved in the transcription of gluconeogenic enzymes, including PEPCK and G6Pase. Indeed, FOXO1 phosphorylation at serine 256 by AKT leads to its degradation and exclusion from the nucleus (Matsuzaki et al., 2003). Our data with BMP9 are therefore consistent with studies that have shown that phosphorylation of FOXO1 is associated with inhibition of gluconeogenesis (Matsuzaki et al., 2003; OSullivan et al., 2015; Smith et al., 2017).

BMP9 strongly decreased levels of gluconeogenic enzymes PEPCK and G6Pase in the liver. Early studies have shown that deficiency in G6Pase results in marked hypoglycemia (Cori et al., 1952; Illingworth, 1965). Considering the pivotal role of G6Pase in producing free glucose from gluconeogenesis and glycogenolysis (Service, 1991), G6Pase inhibition by BMP9 treatments may lead to reduced hepatic conversion of Glucose-6-Phosphate and decreased glucose release. Glucose-6-Phosphate would be segregated at the subcellular level due to G6Pase deficiency in the presence of elevated BMP9 levels (**Figure 3.3A**). Since we found that PEPCK was reduced by BMP9, and would consequently diminish levels of Glucose-6-Phosphate synthesized through gluconeogenesis, Glucose-6-Phosphate accumulation in fasting mice could be a consequence of increased glycogenolysis in link to the observation that BMP9-treated mice display lower hepatic glycogen contents (Yabaluri et al., 2010). Globally these data suggest that the overall reduced glucose output associated with BMP9 overexpression might be principally due through inhibition of liver G6Pase.

The liver is highly responsive to glucagon secretion (Berg et al., 2002) from the pancreas, which stimulates rapid hepatic glucose production from glycogenolysis (Winnick et al., 2016) under fasting normal state (Aronoff et al., 2004). In diabetes, insulin is ineffective at suppressing glucagon secretion which results in elevated hepatic glucose production (Aronoff et al., 2004). BMP9 overexpressing mice showed an increase in pancreatic glucagon levels which could be an indirect regulatory feed-back as a consequence of chronic hypoglycemia secondary to decreased gluconeogenesis (Service, 1991), since its major function is to maintain blood glucose levels in hypoglycemic conditions (Young, 2005). Glucagon might exert an early shift in hormonal counter glucoregulatory mechanisms in postabsorptive metabolic stages in response to glucose lowering effects of BMP9.

While we report data on autocrine or paracrine effects of BMP9 on liver gluconeogenesis, renal gluconeogenesis is also a major contributor to blood glucose production (Gerich, 2001; Gerich et al., 2001). Interestingly, our data show that BMP9 lowers blood glucocorticoid levels, measured by corticosterone which is produced by the renal cortex and is a major site of kidney gluconeogenic enzymatic activity and glucose production. Prolonged exposure to glucocorticoids leads to a diabetic-like state due to the increase in plasma glucose, while low glucocorticoid concentrations lead to hypoglycemia, decreased glycogen stores, and hypersensitivity to insulin (McKay, 2003). In this context, decreases in corticosteroids also suggest reduced glucocorticoid gene induction of PEPCCK and G6Pase through AMPK mediated activation (Cassuto et al., 2005; Kinote et al., 2012). Further studies are required to determine whether corticosteroid regulation by BMP9 is hypothalamic or at the peripheral level.

During vascular development, BMP9 and the closely-related BMP10 mediate vascular development by binding and activating the receptor Alk1, which is predominantly expressed in the vascular endothelium (David et al., 2007; Panchenko et al., 1996; Roelen et al., 1997). Activation of Alk1 results in the recruitment and phosphorylation of Smad1,5,9, which in turn modulate the expression of several genes involved in the angiogenic response (Larrivee et al., 2012; Lux et al., 2006; Orlova et al., 2011). In contrast to its effects on vascular development, relatively little is known of the mechanisms by which BMP9 regulates glucose homeostasis. Our data suggest that Alk1 signaling does not appear to be involved in this process. Indeed, we

detected little expression of this receptor in cultured hepatocytes or liver samples, and further knockdown of Alk1 did not abrogate BMP9-mediated phosphorylation of FOXO1 and inhibition of gluconeogenic enzymes. By contrast, inhibition of the type I BMP receptor Alk3 resulted in complete suppression of the effects of BMP9 on gluconeogenic enzymes expression. Interestingly, it has previously been reported that Alk3 is required for the regulation of glucose levels in a study involving Alk3 heterozygote knockout mice, which exhibited abnormal glucose metabolism and glucose intolerance (Scott et al., 2009). While Alk1 has been presented as the main interacting partner for BMP9, with an EC50 of 50 pg/ml, several studies have shown that it also interacts with Alk3, albeit with a lower affinity with an EC50 of 50 ng/ml (Bidart et al., 2012). BMP9 is constitutively produced by the liver and secreted into the circulation, and serum levels of total active forms of BMP9 in humans are between 2–10 ng/ml as measured by activity and ~300-444 pg/ml by ELISA (Herrera et al., 2009; Kienast et al., 2016; Wei et al., 2014). In mice, the levels of the mature form of BMP9 are lower (~50 pg/mL) relative to the levels described in humans (80-120 pg/mL) (Kienast et al., 2016; Xu et al., 2017). Concentrations of endogenous BMP9 are therefore likely to have a limited effect on liver gluconeogenesis through Alk3 signaling, although it remains possible that local hepatic endogenous concentrations of BMP9, which is produced in the liver, remain higher than those observed in circulation and are sufficient to efficiently activate Alk3 signaling. Indeed, a role for endogenous BMP9 on hepatic gluconeogenesis is supported by recently published data showing that hepatic delivery of shRNA plasmid targeting mouse BMP9 in vivo results in exacerbated glucose tolerance and elevated PEPCK expression (Jia et al., 2019) Our data also suggest that BMP2, BMP4 or BMP6, which are the main physiological ligands for Alk3, may be also efficient at regulating hepatic gluconeogenesis and therapies involving delivery of Alk3 agonists may represent an effective strategy to control hepatic gluconeogenesis.

### 3.6 Conclusion

Taken together, our data show that BMP9 ameliorates glucose control in a model of type 1 diabetes through non-canonical Alk3/AKT/FOXO1 signaling and regulation of gluconeogenic enzymes, and suggest that pharmacological activation of this signaling pathway could be of interest for the development of novel strategies to help maintain glucose homeostasis in diabetic patients.

#### Article Information

**Acknowledgements.** This work was supported by a grant-in-aid from the Heart and Stroke Foundation of Canada 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), 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.

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

**Author contributions.** N.A. and B.L. performed experiments and analyzed data. N.A. and B.L. designed the experiments, reviewed all the data and wrote the manuscript. N.A., B.L. and P.S. reviewed and edited the manuscript.

### 3.7 Figures Article 2

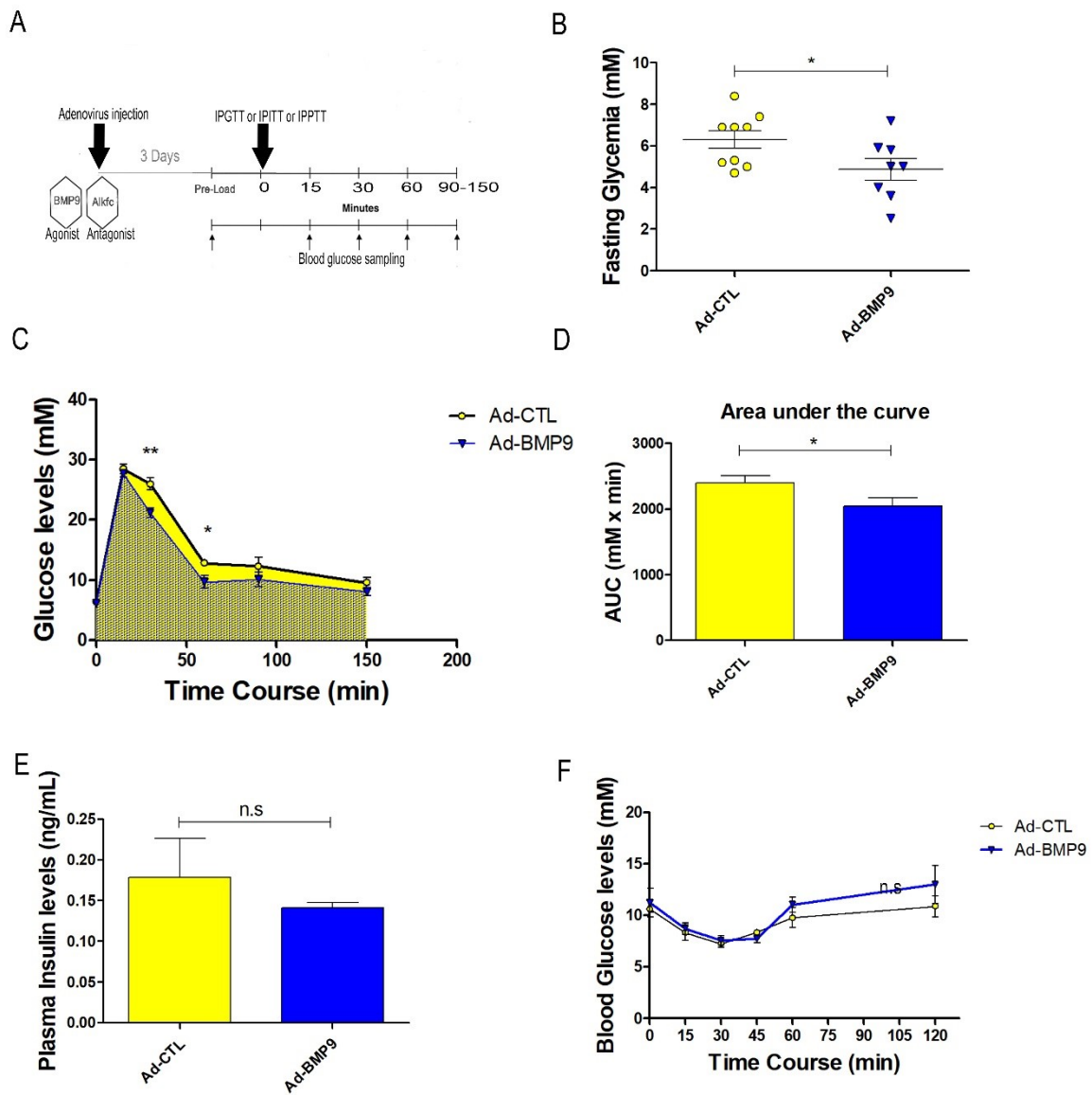


Figure-1

**Figure 3.1. BMP9 overexpression improves glucose tolerance in fasted mice.** (A) Time line for tolerance tests; after a single intraperitoneal injection of adenoviral particles ( $5 \times 10^8$  PFU) encoding BMP9 (Ad-BMP9) or empty vector (Ad-CTL) 3 days prior, IPGTT, IPPTT or IPITT were performed. (B) Blood glucose concentrations in fasting mice (16h) 3 days after injections of adenoviral particles. (C) Intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) in 16h fasting mice following intraperitoneal glucose injections (2 g/kg). Glucose concentrations were measured from blood collected at fixed intervals. (D) Area under the curve (AUC) for each group was calculated. Ad-CTL; n=9; Ad-BMP9; n=6. (E) Blood insulin concentrations in fasting mice (16h) 3 days after injections of adenoviral particles (n=3 mice per group). (F) Intraperitoneal insulin tolerance test (IPITT) in mice following intraperitoneal insulin injections (0.5 units/kg) after 4 hrs of fasting. Glucose concentrations were measured from blood collected at fixed intervals (n= 6 mice per group). Results are expressed means  $\pm$  SEM. Statistically significant differences were measured by Student's t test (\*P<0.05). NS indicates no significance.

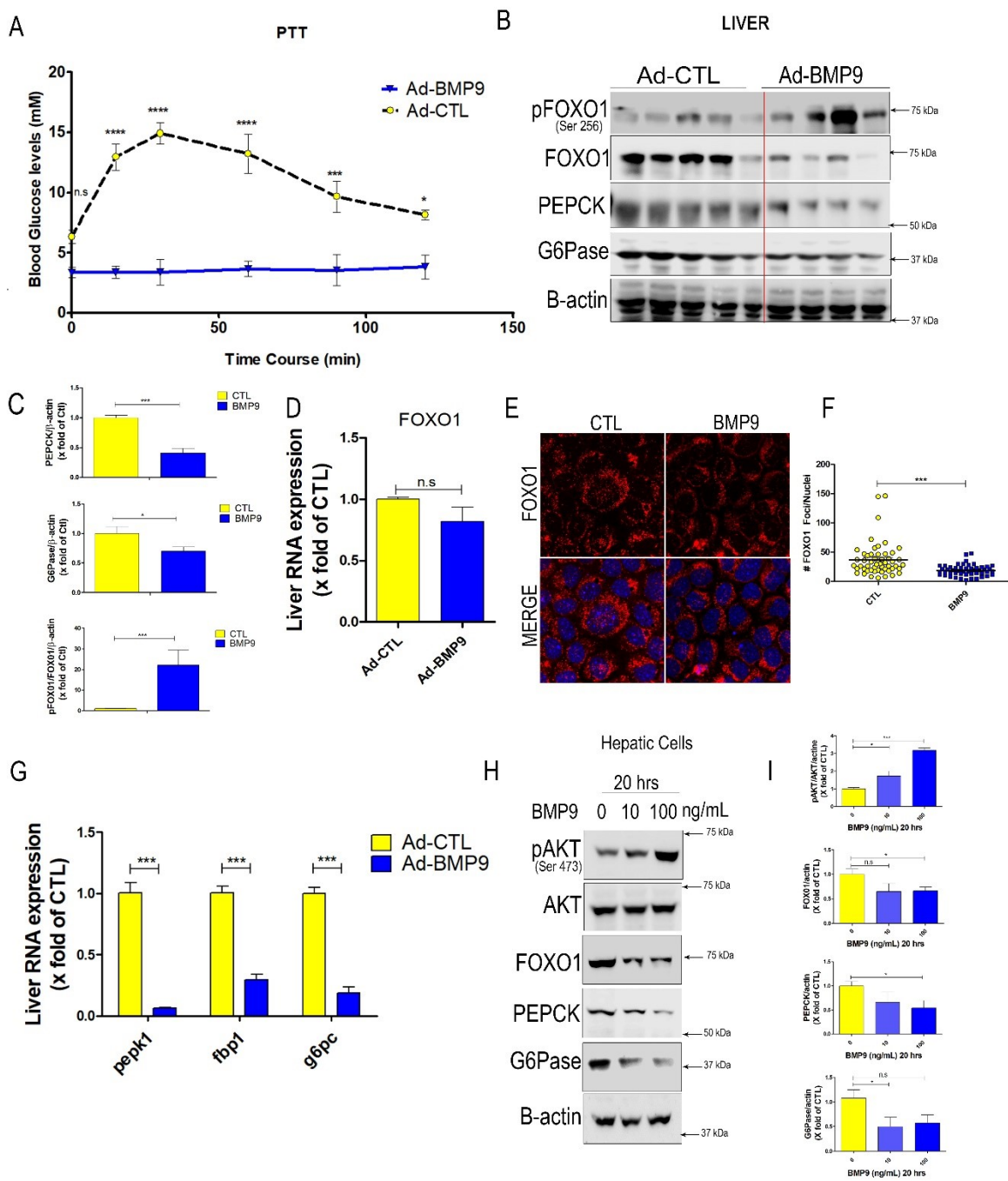


Figure-2



**Figure 3.2. BMP9 regulates liver gluconeogenesis in mice.** (A) Intraperitoneal pyruvate tolerance test (IPPTT). Hepatic gluconeogenesis assessed by blood glucose measurements before (0 min) and after a 2 hrs pyruvate load (1 mg/g body weight) in Ad-BMP9 or Ad-CTL fasting mice. (B) Western blot analysis of liver proteins 3 days after adenoviral delivery of Ad-BMP9 and Ad-CTL. (C) Densitometric analysis of immunoblots shown in figure 2B. (D) Quantitative PCR analysis of *FOXO1* from liver RNA 3 days after adenoviral delivery of Ad-BMP9 and Ad-CTL. n= 3 mice per group. (E) FOXO1 immunofluorescence (red) of starved hepatic cells stimulated for 16 hrs with or without 100 ng/ml BMP9, visualized by confocal microscopy. Cells were counterstained with DAPI (blue). Scale bar: 20  $\mu$ m. (F) Quantitation of FOXO1 foci in hepatocytes nuclei treated with (n=50 cells) or without BMP9 (n=50 cells) as shown in (E). (G) Quantitative PCR analysis of *PEPK1*, *FBP1* and *G6PC* RNA levels in Ad-BMP9 or Ad-CTL-injected mice; n= 3 mice per group. (H) Mouse hepatocytes were treated with rhBMP9 at different concentrations (0, 10, 100 ng/mL) for 20 hrs and analyzed by immunoblotting. Representative blots are shown. (I) Quantification of immunoblots were performed from three independent experiments. All values are expressed as mean $\pm$ SEM. Statistically significant differences were measured by Student's t test \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001. NS indicates no significance.

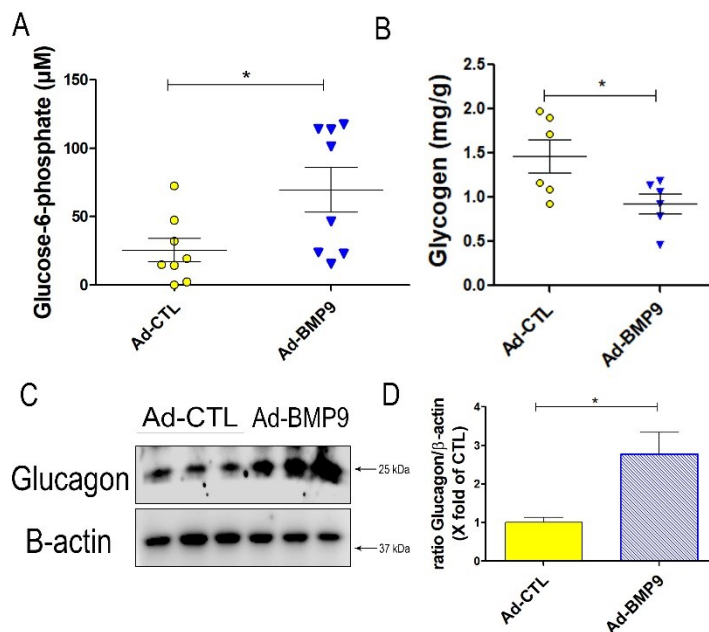


Figure 3

**Figure 3.3. BMP9 overexpression decreases hepatic glycogen content and is associated with increased glucagon production.** (A) Glucose-6-phosphate hepatic content in fasting (16hrs) Ad-BMP9 and Ad-CTL-injected mice. (B) Glycogen hepatic content in fasting (16hrs) Ad-CTL and Ad-BMP9 mice. (C) Western blot analysis of pancreatic glucagon in fasting mice. (D) Densitometric analysis of immunoblots shown in (C). All values are represented as mean $\pm$ SEM with significance starting at \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 using Student's t test.

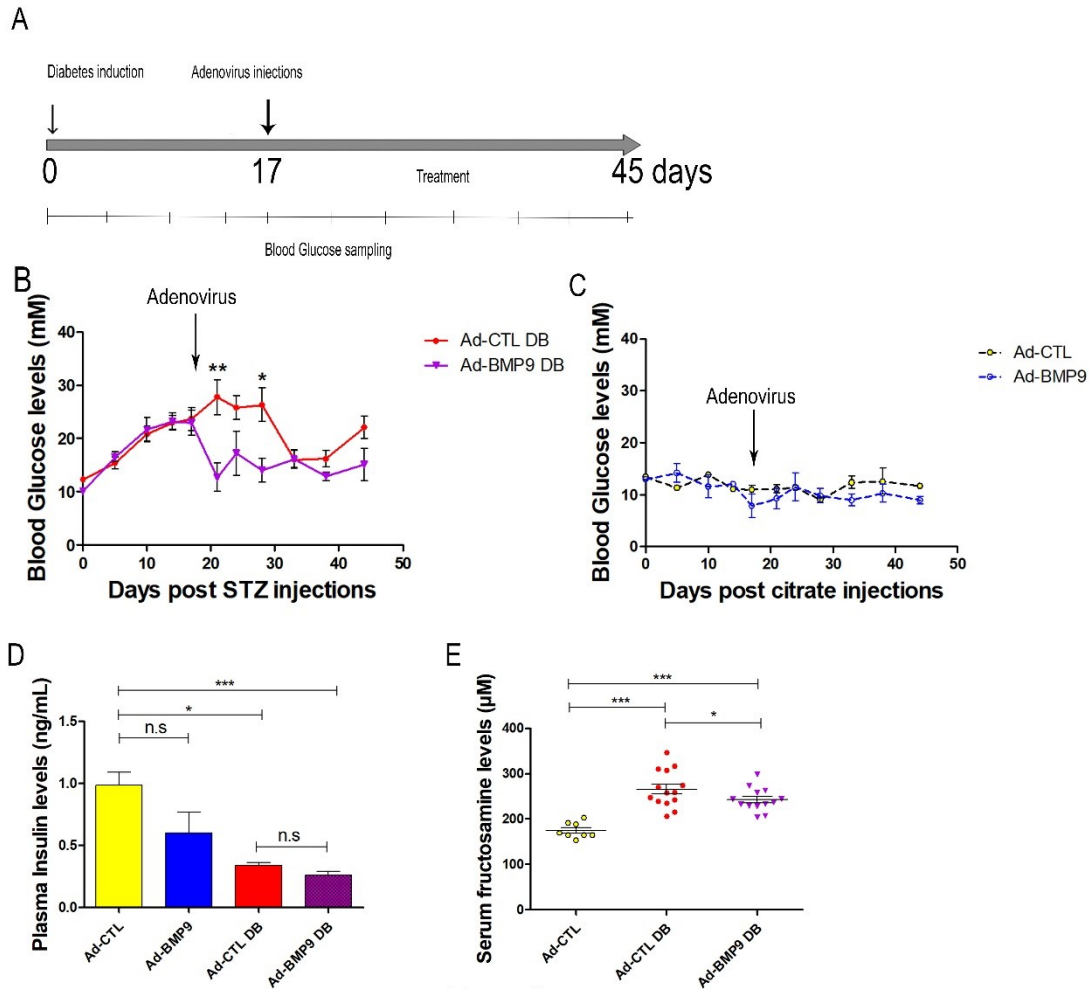


Figure-4

**Figure 3.4. BMP9 expression improves glycemic control in diabetic mice.** (A) Timeline of STZ-induced diabetes experiments: C57/B16 mice were injected with STZ for 5 consecutive days. Once blood glucose levels stabilized after two weeks, adenoviral particles expressing BMP9 (Ad-BMP9) or empty vector (Ad-CTL) were injected intraperitoneally ( $5 \times 10^8$  pfu). Blood glucose levels were measured at different time points for up to 6 weeks, after which mice were sacrificed. (B) Blood glucose levels in STZ diabetic fed mice before and after adenoviral injections. Ad-CTL DB (n=10) and Ad-BMP9 DB (n=9). (C) Blood Glucose levels in sodium citrate-injected fed mice before and after adenoviral injections. Ad-CTL (n=4) and Ad-BMP9 (n=5). (D) Insulin plasma levels in control and STZ-injected mice 4 weeks after adenoviral injections. Ad-CTL (n=4), Ad-BMP9 (n=5), Ad-CTL DB (n=9), Ad-BMP9 DB (n=10). (E) Serum fructosamine levels in control and STZ-injected mice 4 weeks after adenoviral injections. Differences between means were analyzed using Student's t test (B C and D). \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . NS indicates nonsignificant.

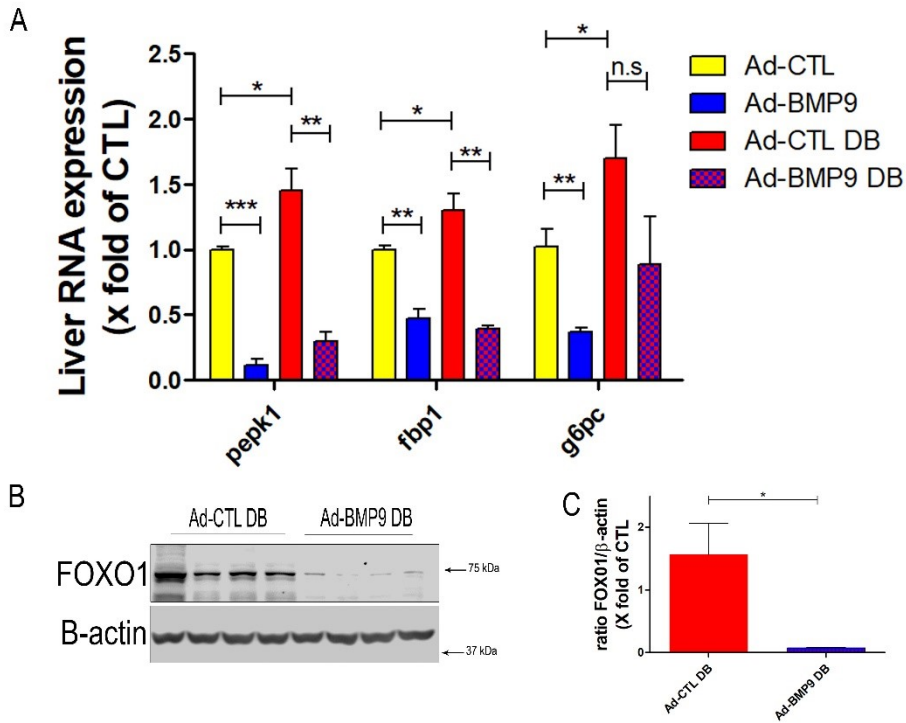


Figure-5

**Figure 3.5. BMP9 regulates expression of gluconeogenic enzymes and FOXO1 protein levels in vivo** (A) Real time quantitative PCR results of hepatic gluconeogenic enzymes in diabetic or non-diabetic Ad-CTL or Ad-BMP9 mice (n=3 experiments). (B) Western blot analysis of liver homogenates probed with anti-total FOXO1 and  $\beta$ -actin. (C) Densitometric quantification of immunoblots shown in (B). Values are shown as mean $\pm$ SEM and significance in between groups calculated by Student's t test. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

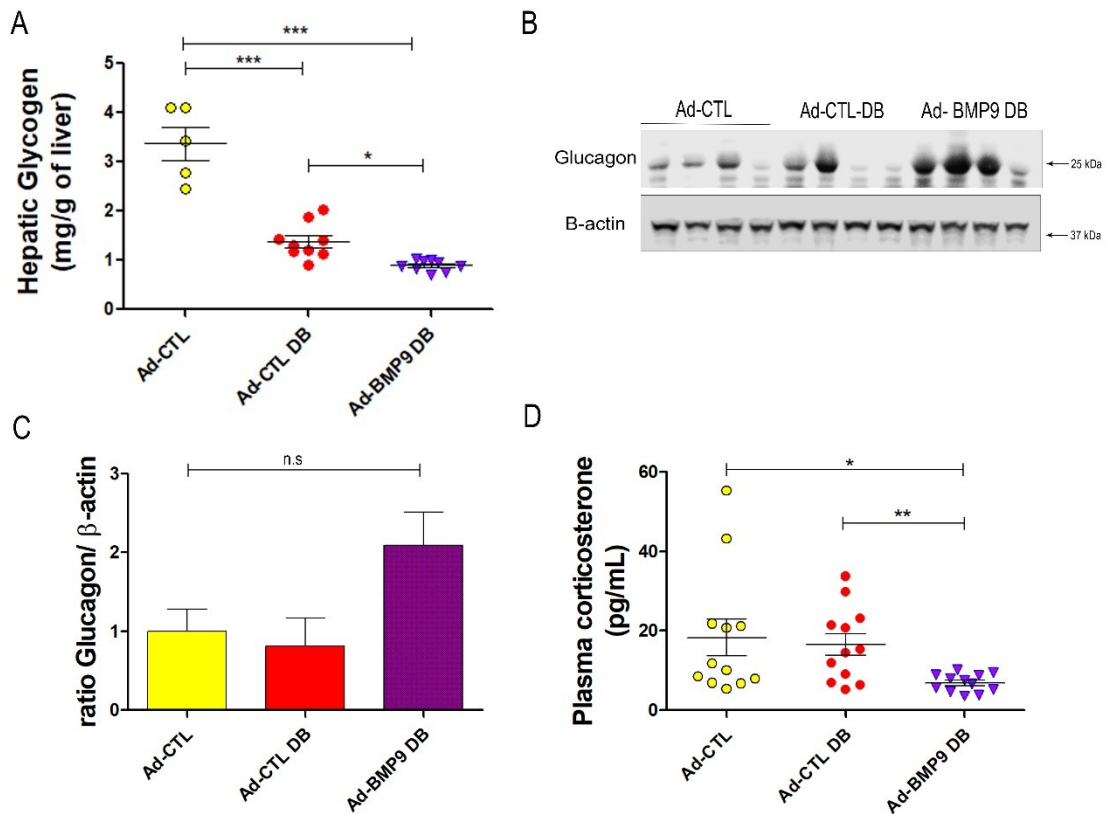


Figure 6

**Figure 3.6. BMP9 expression affects key regulatory hormones and metabolites in diabetic mice.** (A) Glycogen levels in liver homogenates of Ad-CTL, Ad-CTL DB and Ad-CTL DB. (B-C) Western blot analysis of glucagon in pancreatic tissue homogenates and densitometric band analysis (lower panel) (D) Plasma corticosterone was measured by competitive ELISA. Data are represented as mean±SEM and statistical analysis was performed using one-way ANOVA analysis with significant Tukey's post hoc test for comparison between groups. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

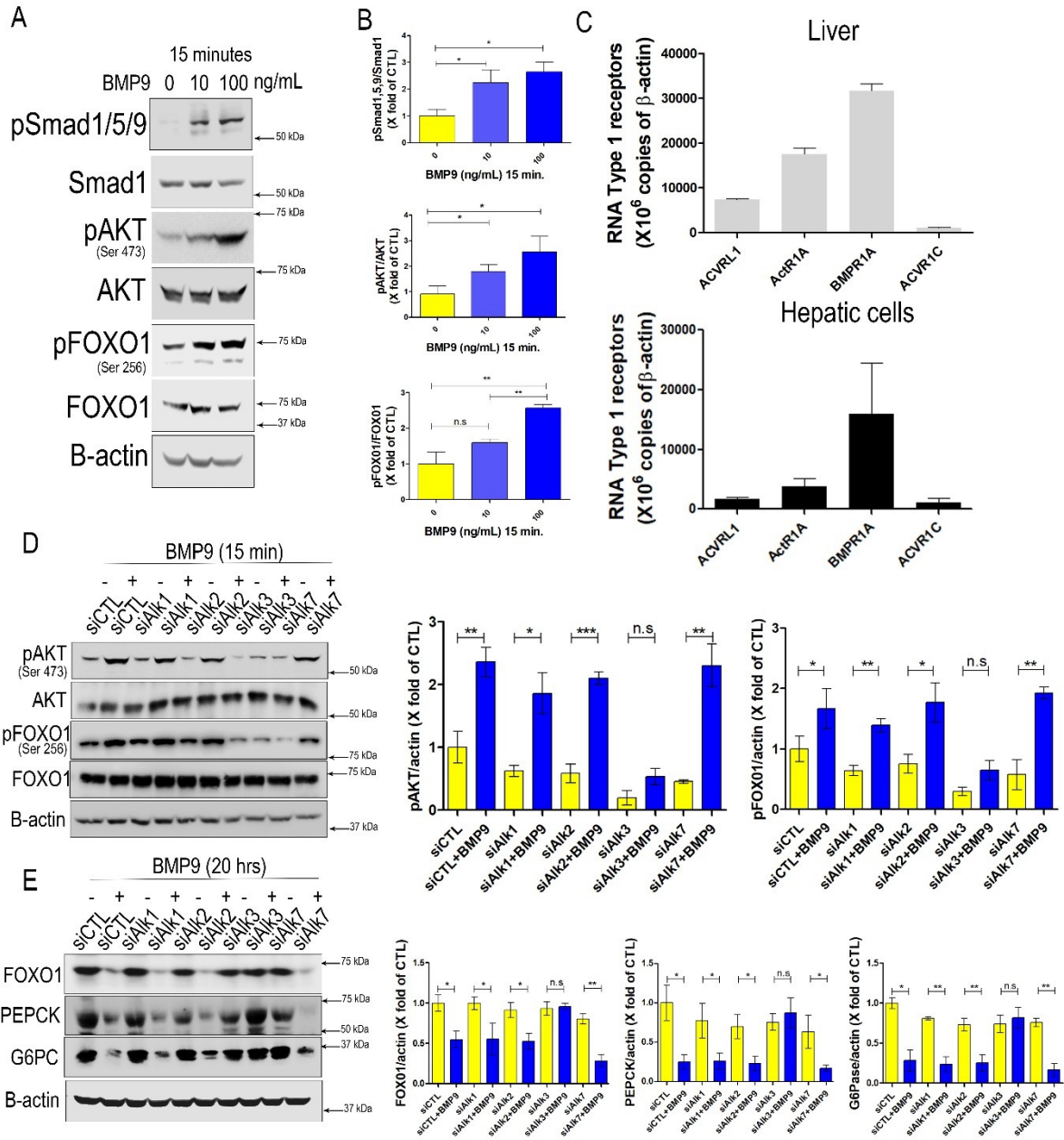
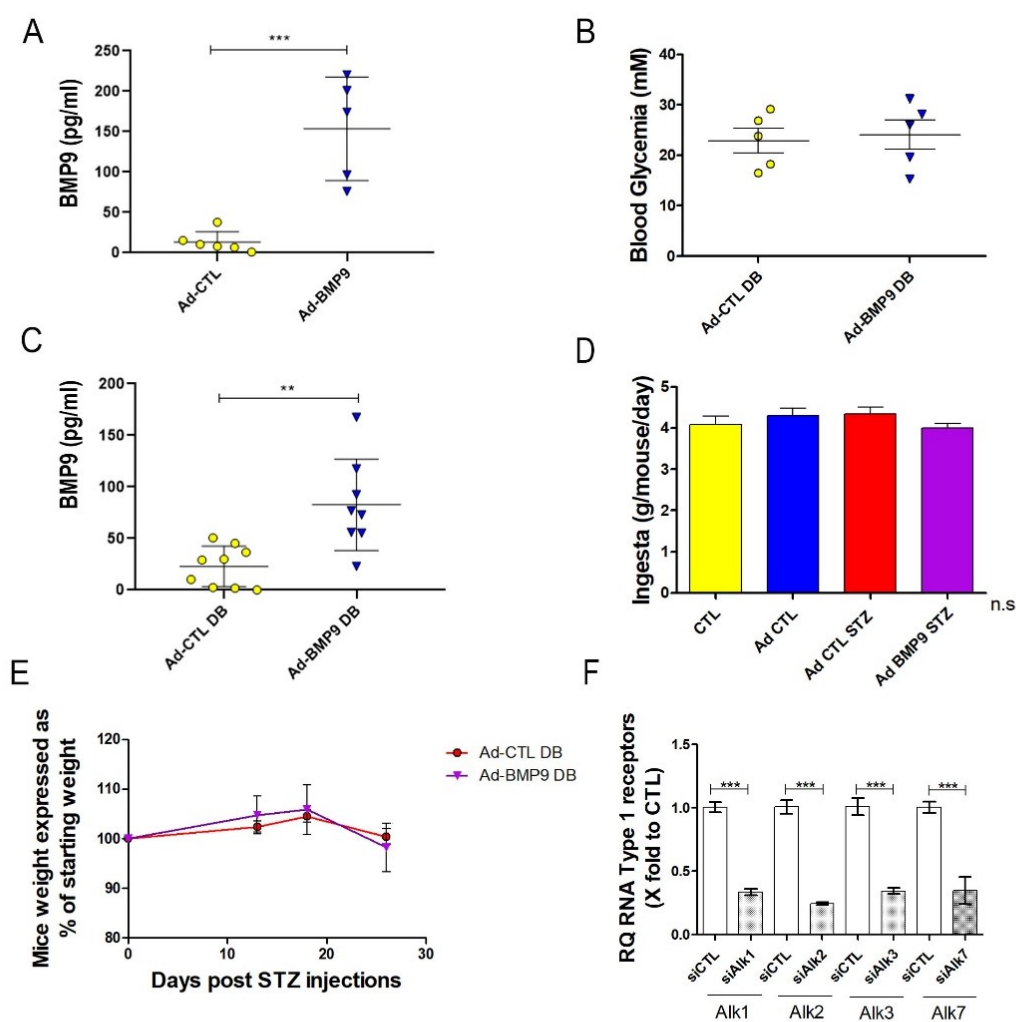


Figure-7

**Figure 3.7. BMP9 signaling and inhibition of gluconeogenic enzymes in hepatic cells is mediated by Alk3.** (A) Mouse hepatocytes were treated with rhBMP9 at different concentrations (0, 10, 100 ng/mL) for 15 min and analyzed by immunoblotting for AKT/FOXO1 signaling. Immunoblot shown is representative of 3 independent experiments. (B) Densitometric analysis of immunoblots. (C) Quantitative analysis of BMP type I receptors in RNA extracted from liver tissue isolated from 12-week-old mice (upper panel) or AML12 hepatocytes (lower panel). Changes in RNA levels of receptors were calculated relative to  $\beta$ -actin copies. (D-E) Immunoblot analysis of hepatocytes stimulated for 15 min (D) or 20 hours (E) with rhBMP9. Phosphorylation of AKT/FOXO1 (D) and expression of gluconeogenic enzymes (E) were assessed using appropriate antibodies. Blots shown are representative of 3 independent experiments. Quantification of blots is shown on corresponding graphs. All values are expressed as mean $\pm$ SEM. \* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01, \*\*\* $p$ <0.001 calculated from Student's t test.

### 3.8 Supplementary Data Article 2



Supp Figure-1

**Supp. Figure S3.1.** (A) ELISA of BMP9 serum concentrations in fasting mice three days after adenoviral delivery. (B) Blood glucose levels measured 14 days after STZ injections in C57/B16 mice, prior to adenoviral delivery. (C) ELISA of BMP9 serum concentrations in diabetic mice 28 days after adenoviral delivery. (D) Average food intake calculated in grams/mouse/day monitored for 6 weeks for CTL (n=8), Ad-CTL (n=4), Ad-CTL DB (n=4) and Ad-BMP9 DB (n=4) mice. (E) Body weights in STZ diabetic mice after adenoviral delivery. CTL (n=8), Ad-CTL (n=4), Ad-CTL DB (n=4) and Ad-BMP9 DB (n=4). (F) Quantitative PCR analysis of type I BMP receptors in AML12 hepatocytes 48 hours after transfection with siRNA. RNA levels were normalized to  $\beta$ -actin and normalized to scrambled siRNA-transfected samples. Results

are shown as means±SEM which represent three separate experiment. Statistical differences assessed by Student's t \*\*\*p<0.001. Values are expressed as mean±SEM, significance was calculated with Student's t test \*\*\*p<0.001; \*\*p<0.01.

**Table S1. List of primary antibodies used in Western Blotting analysis.** Primary antibodies used for Western blotting are listed by antigen target, catalogue ID number, concentrations used and manufacturer.

Antigen	Antibody Id	Concentration	Manufacturer
ALK1	AF770	0,4 µg/mL	R & D
pAKT (Ser <sup>473</sup> )	cs4060	10 µM	Cell Signaling technology
AKT	cs 11E7	10 µM	Cell Signaling technology
pFOXO1 (Ser <sup>256</sup> )	cs9461T	10 µM	Cell Signaling technology
FOXO1	cs2880	10 µM	Cell Signaling technology
pSmad1,5,9	cs5810	10 µM	Cell Signaling technology
Smad1	cs6944	10 µM	Cell Signaling technology
pSmad2/3	csD27F4	10 µM	Cell Signaling technology
Smad2/3	cs3102	10 µM	Cell Signaling technology
PEPCK	sc271029	0.2 µg/mL	Santa Cruz
G6Pase	sc398155	0,2 µg/mL	Santa Cruz
Glucagon	sc514592	0.2 µg/mL	Santa Cruz
Insulin B	sc377071	0.2 µg/mL	Santa Cruz
β-actin	sc1616 or sc8432	0.1 µg/mL	Santa Cruz

**Table S2. Primer pairs used in qPCR analysis.**

Symbol	Forward	Reverse
FOXO1	5'-ACATTTTCGTCCTCGAACCACTCA-3'	5'-ATTTTCAGACAGACTGGGCAGCGTA-3'
PCK1	5'-CCACAGCTGCTGCAGAACA-3'	5'-GAAGGGTCGCATGGCAAA-3'
FBP1	5'-GCTCTGCACCGCGATCA-3'	5'-ACATTGGTTGGTTGAGCCAGCGATA-3'
G6PC	5'-CCGGATCTACCTTGCTGCTCACTTT-3'	5'-TAGCAGGTAGAATCCAAGCGCGAAA-3'
β-actin	5'-GACGGCCAGGTGATATCACTA-3'	5'-CCACACGATTCCATACCCA-3'



### 3.9 References

- Akla, N., Viallard, C., Popovic, N., Lora Gil, C., Sapiha, P., & Larrivee, B. (2018). BMP9 (Bone Morphogenetic Protein-9)/Alk1 (Activin-Like Kinase Receptor Type I) Signaling Prevents Hyperglycemia-Induced Vascular Permeability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38(8), 1821-1836. doi:10.1161/atvbaha.118.310733
- Alkhalidy, H., Moore, W., Wang, Y., Luo, J., McMillan, R. P., Zhen, W., Liu, D. (2018). The Flavonoid Kaempferol Ameliorates Streptozotocin-Induced Diabetes by Suppressing Hepatic Glucose Production. *Molecules*, 23(9). doi:10.3390/molecules23092338
- Agius, L., Peak, M., & Alberti, K. G. (1990). Regulation of glycogen synthesis from glucose and gluconeogenic precursors by insulin in periportal and perivenous rat hepatocytes. *Biochem J*, 266(1), 91-102.
- Andrikopoulos, S., Blair, A. R., Deluca, N., Fam, B. C., & Proietto, J. (2008). Evaluating the glucose tolerance test in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 295(6), E1323-1332. doi:10.1152/ajpendo.90617.2008
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., & Want, L. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, 17(3), 183-190. doi:10.2337/diaspect.17.3.183
- Ayala, J. E., Samuel, V. T., Morton, G. J., Obici, S., Croniger, C. M., Shulman, G. I., McGuinness, O. P. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *J Disease Models & Mechanisms*, 3(9-10), 525-534. doi:10.1242/dmm.006239 %
- Berg, J. N., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Ephiphine and glucagon signal the need for glycogen breakdown. *Biochemistry 5 th edition section 21.3*, NY(WH Freeman), NBK22429.
- Bidart, M., Ricard, N., Levet, S., Samson, M., Mallet, C., David, L., Bailly, S. (2012). BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci*, 69(2), 313-324. doi:10.1007/s00018-011-0751-1
- Brown, M. A., Zhao, Q., Baker, K. A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Choe, S. (2005). Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem*, 280(26), 25111-25118. doi:10.1074/jbc.M503328200
- Callejas, D., Mann, C. J., Ayuso, E., Lage, R., Grifoll, I., Roca, C., Bosch, F. (2013). Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy. *Diabetes*, 62(5), 1718-1729. doi:10.2337/db12-1113
- Caperuto, L. C., Anhe, G. F., Cambiaghi, T. D., Akamine, E. H., do Carmo Buonfiglio, D., Cipolla-Neto, J., Bordin, S. (2008). Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology*, 149(12), 6326-6335. doi:10.1210/en.2008-0655
- Cassuto, H., Kochan, K., Chakravarty, K., Cohen, H., Blum, B., Olswang, Y., Reshef, L. (2005). Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *J Biol Chem*, 280(40), 33873-33884. doi:10.1074/jbc.M504119200

- Cerani, A., Tetreault, N., Menard, C., Lapalme, E., Patel, C., Sitaras, N., Sapieha, P. (2013). Neuron-Derived Semaphorin 3A Is an Early Inducer of Vascular Permeability in Diabetic Retinopathy via Neuropilin-1. *Cell Metabolism*, 18(4), 505-518. doi:https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.003
- Chen, C., Grzegorzewski, K. J., Barash, S., Zhao, Q., Schneider, H., Wang, Q., Birse, C. E. (2003). An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotech*, 21(3), 294-301. doi:http://www.nature.com/nbt/journal/v21/n3/supinfo/nbt795\_S1.html
- Cori, G. T., & Cori, C. F. (1952). Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J Biol Chem*, 199(2), 661-667.
- Coskuner, O., & Uversky, V. N. (2017). BMP-2 and BMP-9 binding specificities with ALK-3 in aqueous solution with dynamics. *J Mol Graph Model*, 77, 181-188. doi:10.1016/j.jmgm.2017.08.005
- David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J., & Bailly, S. (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of orphan activin receptor-like kinase 1 in endothelial cells. *Hemostasis, Thrombosis, and vascular biology*, 109(5), 1953-1961. doi:10.1182/blood2006-07-034124
- Frier, B. M. (2014). Hypoglycaemia in diabetes mellitus: epidemiology and clinical implications. *Nat Rev Endocrinol*, 10(12), 711-722. doi:10.1038/nrendo.2014.170
- Gerich, J. E. (2001). Measurements of renal glucose release. *Diabetes*, 50(4), 905.
- Gerich, J. E., Meyer, C., Woerle, H. J., & Stumvoll, M. (2001). Renal Gluconeogenesis. Its importance in human glucose homeostasis. *Diabetes Care*, 24(2), 382-391. doi:10.2337/diacare.24.2.382
- Gross, D. N., Wan, M., & Birnbaum, M. J. (2009). The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Curr Diab Rep*, 9(3), 208-214.
- Hammad, E. S., Striffler, J. S., & Cardell, R. R., Jr. (1982). Morphological and biochemical observations on hepatic glycogen metabolism in mice on a controlled feeding schedule. II. Streptozotocin-diabetic mice. *Dig Dis Sci*, 27(8), 692-700.
- Herrera, B., Addante, A., & Sánchez, A. (2017). BMP Signalling at the Crossroad of Liver Fibrosis and Regeneration. *Int J Mol Sci*, 19(1), 39. doi:10.3390/ijms19010039
- Herrera, B., & Inman, G. J. (2009). A rapid and sensitive bioassay for the simultaneous measurement of multiple bone morphogenetic proteins. Identification and quantification of BMP4, BMP6 and BMP9 in bovine and human serum. *BMC Cell Biol*, 10, 20. doi:10.1186/1471-2121-10-20
- Huang, H., Wang, W., Yang, G., Zhang, Y., Li, X., Liu, H., Li, L. (2018). Circulating bone morphogenetic protein-9 levels are associated with hypertension and insulin resistance in humans. *J Am Soc Hypertens*, 12(5), 372-380. doi:10.1016/j.jash.2018.02.007
- Illingworth, B. (1965). Enzymatic Defects as Causes of Hypoglycemia. *Diabetes*, 14(6), 333-340. doi:10.2337/diab.14.6.333
- Jia, Y., Niu, D., Li, Q., Huang, H., Li, X., Li, K., . . . Yang, G. (2019). Effective gene delivery of shBMP-9 using polyethyleneimine-based core-shell nanoparticles in an animal model of insulin resistance. *Nanoscale*, 11(4), 2008-2016. doi:10.1039/c8nr08193j
- Jorgensen, M. S., Tornqvist, K. S., & Hvid, H. (2017). Calculation of Glucose Dose for Intraperitoneal Glucose Tolerance Tests in Lean and Obese Mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 56(1), 95-97.

- Kienast, Y., Jucknischke, U., Scheiblich, S., Thier, M., de Wouters, M., Haas, A., . . . Lorenz, S. (2016). Rapid Activation of Bone Morphogenic Protein 9 by Receptor-mediated Displacement of Pro-domains. *J Biol Chem*, 291(7), 3395-3410. doi:10.1074/jbc.M115.680009
- Kim, M., & Choe, S. (2011). BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep*, 44(10), 619-634. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.10.619
- Kinote, A., Faria, J. A., Roman, E. A., Solon, C., Razolli, D. S., Ignacio-Souza, L. M., Anhe, G. F. (2012). Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels. *Endocrinology*, 153(8), 3633-3645. doi:10.1210/en.2012-1341
- Kuo, M. M., Kim, S., Tseng, C. Y., Jeon, Y. H., Choe, S., & Lee, D. K. (2014). BMP-9 as a potent brown adipogenic inducer with anti-obesity capacity. *Biomaterials*, 35(10), 3172-3179. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.063
- Larrivee, B., Prahst, C., Gordon, E., del Toro, R., Mathivet, T., Duarte, A., Eichmann, A. (2012). ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell*, 22(3), 489-500. doi:10.1016/j.devcel.2012.02.005
- Leblanc, E., Drouin, G., Grenier, G., Faucheux, N., & Hamdy, R. (2013). From skeletal to non skeletal: The intriguing roles of BMP-9: A literature review. *J Advances in Bioscience and Biotechnology. Vol.04No.10*, 16. doi:10.4236/abb.2013.410A4004
- Lu, M., Wan, M., Leavens, K. F., Chu, Q., Monks, B. R., Fernandez, S., Birnbaum, M. J. (2012). Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nat Med*, 18(3), 388-395. doi:10.1038/nm.2686
- Luo, Y., Li, L., Xu, X., Wu, T., Yang, M., Zhang, C., Zhang, X. (2017). Decreased circulating BMP-9 levels in patients with Type 2 diabetes is a signature of insulin resistance. *J Clinical Science*, 131(3), 239-246. doi:10.1042/CS20160543 %J Clinical Science
- Lux, A., Salway, F., Dressman, H. K., Kröner-Lux, G., Hafner, M., Day, P. J., . . . Garland, J. (2006). ALK1 signalling analysis identifies angiogenesis related genes and reveals disparity between TGF- $\beta$  and constitutively active receptor induced gene expression. *BMC Cardiovascular Disorders*, 6(1), 13. doi:10.1186/1471-2261-6-13
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., & Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20), 11285-11290. doi:10.1073/pnas.1934283100
- McCrimmon, R. (2008). The mechanisms that underlie glucose sensing during hypoglycaemia in diabetes. *Diabet Med*, 25(5), 513-522. doi:10.1111/j.1464-5491.2008.02376.x
- McKay, L. (2003). Pharmacologic effects of corticosteroids. *Holland-Frei Cancer Medicine*. Hamilton Ontario: BC Decker.
- Mi, L. Z., Brown, C. T., Gao, Y., Tian, Y., Le, V. Q., Walz, T., & Springer, T. A. (2015). Structure of bone morphogenetic protein 9 procomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(12), 3710-3715. doi:10.1073/pnas.1501303112
- Miyazono, K., Kamiya, Y., & Morikawa, M. (2010). Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*, 147(1), 35-51. doi:10.1093/jb/mvp148
- Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D. L., & Accili, D. (2001). The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest*, 108(9), 1359-1367. doi:10.1172/JCI12876

- Orlova, V. V., Liu, Z., Goumans, M. J., & ten Dijke, P. (2011). Controlling angiogenesis by two unique TGF-beta type I receptor signaling pathways. *Histol Histopathol*, 26(9), 1219-1230. doi:10.14670/hh-26.1219
- OSullivan, I., Zhang, W., Wasserman, D. H., Liew, C. W., Liu, J., Paik, J., Unterman, T. G. (2015). FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization. *Nat Commun*, 6, 7079. doi:10.1038/ncomms8079
- Ouarne, M., Bouvard, C., Boneva, G., Mallet, C., Ribeiro, J., Desroches-Castan, A., . . . Bailly, S. (2018). BMP9, but not BMP10, acts as a quiescence factor on tumor growth, vessel normalization and metastasis in a mouse model of breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1), 209. doi:10.1186/s13046-018-0885-1
- Panchenko, M. P., Williams, M. C., Brody, J. S., & Yu, Q. (1996). Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. *Am J Physiol*, 270(4 Pt 1), L547-558. doi:10.1152/ajplung.1996.270.4.L547
- Petersen, M. C., Vatner, D. F., & Shulman, G. I. (2017). Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease. *Nat Rev Endocrinol*, 13(10), 572-587. doi:10.1038/nrendo.2017.80
- Ramel, M.-C., & Hill, C. S. (2012). Spatial regulation of BMP activity. *Febslet*, 586(14), 1929-1941. doi:doi:10.1016/j.febslet.2012.02.035
- Rerup, C., & Tarding, F. (1969). Streptozotocin- and alloxan-diabetes in mice. *European Journal of Pharmacology*, 7(1), 89-96. doi:https://doi.org/10.1016/0014-2999(69)90169-1
- Roelen, B. A., van Rooijen, M. A., & Mummery, C. L. (1997). Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn*, 209(4), 418-430. doi:10.1002/(sici)1097-0177(199708)209:4<418::aid-aja9>3.0.co;2-1
- Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R. L., Zhao, Q., Pukac, L., . . . ten Dijke, P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*, 120(Pt 6), 964-972. doi:10.1242/jcs.002949
- Scott, G. J., Ray, M. K., Ward, T., McCann, K., Peddada, S., Jiang, F. X., & Mishina, Y. (2009). Abnormal glucose metabolism in heterozygous mutant mice for a type I receptor required for BMP signaling. *Genesis*, 47(6), 385-391. doi:10.1002/dvg.20513
- Service, J. (1991). Hypoglycemias. *Conferences and Reviews*(1), 442-454. doi:https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)30081-5
- Shao, J., Qiao, L., Janssen, R. C., Pagliassotti, M., & Friedman, J. E. (2005). Chronic hyperglycemia enhances PEPCK gene expression and hepatocellular glucose production via elevated liver activating protein/liver inhibitory protein ratio. *Diabetes*, 54(4), 976-984.
- Sharabi, K., Tavares, C. D., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2015). Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol Aspects Med*, 46, 21-33. doi:10.1016/j.mam.2015.09.003
- Smith, G. C., & Turner, N. (2017). FOXO1 Is the Headline Akt Regulating Hepatic Glucose Metabolism. *Endocrinology*, 158(8), 2436-2438. doi:10.1210/en.2017-00525
- Wang, Q., Guo, T., Portas, J., & McPherron, A. C. (2015). A soluble activin receptor type IIB does not improve blood glucose in streptozotocin-treated mice. *Int J Biol Sci*, 11(2), 199-208. doi:10.7150/ijbs.10430

- Wei, Z., Salmon, R. M., Upton, P. D., Morrell, N. W., & Li, W. (2014). Regulation of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) by redox-dependent proteolysis. *J Biol Chem*, 289(45), 31150-31159. doi:10.1074/jbc.M114.579771
- Winnick, J. J., Kraft, G., Gregory, J. M., Edgerton, D. S., Williams, P., Hajizadeh, I. A., Cherrington, A. D. (2016). Hepatic glycogen can regulate hypoglycemic counterregulation via a liver-brain axis. *J Clin Invest*, 126(6), 2236-2248. doi:10.1172/jci79895
- Wu, K. K., & Huan, Y. (2008). Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc Pharmacol, Chapter 5, Unit 5.47*. doi:10.1002/0471141755.ph0547s40
- Xu, X., Li, X., Yang, G., Li, L., Hu, W., Zhang, L., Zhu, D. (2017). Circulating bone morphogenetic protein-9 in relation to metabolic syndrome and insulin resistance. *Scientific Reports*, 7(1), 17529. doi:10.1038/s41598-017-17807-y
- Yabaluri, N., & Bashyam, M. D. (2010). Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci*, 35(3), 473-484.
- Yang, Y., Tarabra, E., Yang, G.-S., Vaitheesvaran, B., Palacios, G., Kurland, I. J., Bastie, C. C. (2013). Alteration of de novo glucose production contributes to fasting hypoglycaemia in Fyn deficient mice. *PLoS One*, 8(11), e81866-e81866. doi:10.1371/journal.pone.0081866
- Young, A. (2005). Inhibition of glucagon secretion. *Adv Pharmacol*, 52, 151-171. doi:10.1016/s1054-3589(05)52008-8

## **Chapitre IV : Discussion**

## **4.1 Sommaire des résultats**

La préservation de l'intégrité de la barrière hémato-rétinienne interne est essentielle pour un approvisionnement sanguin adéquat permettant de maintenir la fonction visuelle. En plus d'inhiber plusieurs facteurs protecteurs vasculaires, l'hyperglycémie chronique durant le diabète mène à l'activation de plusieurs voies intracellulaires qui induisent l'expression de plusieurs médiateurs pathogéniques rétiens, dont le VEGF, qui affecte l'intégrité des jonctions endothéliales menant à l'hyperperméabilité de la iBHR. L'extravasation de fluides dans le tissu interstitiel rétinien en conséquence d'une hyperperméabilité des vaisseaux rétiens est l'une des principales causes de la perte de vision chez les personnes atteintes d'OMD. Globalement, cette recherche identifie deux modes d'actions de la signalisation BMP9 qui peuvent contribuer à protéger l'endothélium rétinien dans le diabète : en contrecarrant i) l'effet de l'hyperglycémie et ii) l'hyperperméabilité endothéliale rétinienne.

### **4.1.1 L'effet de l'hyperglycémie sur les jonctions et la perméabilité endothéliale**

L'endothélium vasculaire de la BHR est un tissu fonctionnel complexe qui régule la frontière entre la circulation sanguine et les tissus. Le maintien de l'intégrité de cette monocouche est essentiel dans le contrôle de la perméabilité des substances potentiellement toxiques de la neurorétine. En concordance avec des données publiées, nous avons trouvé que la distribution

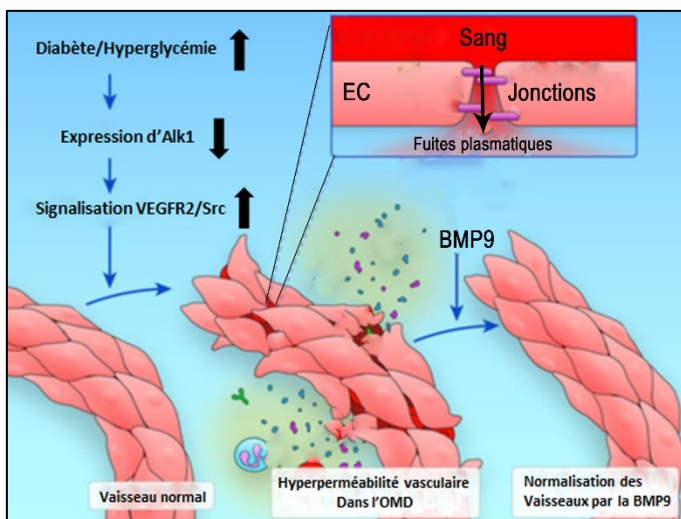
de la VE-cadhérine et de l'occludine aux jonctions est désorganisée et réduite dans les cellules endothéliales exposées à l'hyperglycémie, et que la voie VEGF/VEGFR2/Src était suractivée provoquant une phosphorylation excessive de la VE-cadhérine (Dejana et al., 2008; Esser et al., 1998; Peng et al., 2013). De plus, comme il a déjà été documenté (Esser et al., 1998), nous avons trouvé que l'hyperperméabilité de la monocouche de HUVEC était associée à ces altérations des jonctions interendothéliales. Bien que moins sensibles à l'hyperglycémie, les cellules endothéliales microvasculaires rétinienne humaines (HRMEC) démontrent aussi ces altérations fonctionnelles en conditions hyperglycémiques. Ces résultats sont consistants avec plusieurs études *in vitro* et *in vivo* qui supportent le concept que les cellules endothéliales microvasculaires (HRMEC) ou macrovasculaires (HUVEC) et leurs jonctions sont affectées en hyperglycémie, qui est une condition sous-jacente à plusieurs autres conditions telles que le stress oxydatif, l'hypoxie et la création d'un environnement pro-inflammatoire (Antonetti et al., 1998; Behzadian et al., 2001; Esser et al., 1998; Gavard et al., 2006; Giebel et al., 2005; Matsuda et al., 2015; Rangasamy et al., 2011; Rochfort et al., 2014; Saker et al., 2014; Scheppke et al., 2008; Stewart et al., 2016). Ces observations présentent des implications pour le développement de l'OMD, puisque la modification des protéines aux jonctions endothéliales menant à la dysfonction et la dégradation de la iBHR implique l'accumulation de fluides rétiens d'origine vasogénique. Ceci a d'ailleurs été démontré dans plusieurs études, où l'hyperglycémie chronique est associée à une perméabilité accrue de la iBHR (Cerani et al., 2013; Xu et al., 2001). Bien que l'hyperglycémie seule puisse causer des altérations dégradant les jonctions étanches et d'ancrage, menant à l'hyperperméabilité, les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce processus ne sont pas encore bien compris. Nous avons trouvé que ces altérations moléculaires des protéines jonctionnelles et la perte d'intégrité de la barrière endothéliale



menant à l'hyperperméabilité rétinienne hyperglycémique étaient associées à une perte de fonction de la voie BMP9/Alk1.

#### **4.1.2 Perte de fonction de la voie Alk1 en hyperglycémie**

Bien que la signalisation BMP9/Alk1 soit connue pour ses contributions dans la morphogenèse vasculaire, son rôle dans l'hyperperméabilité endothéliale induite par le diabète reste inconnu. Dans nos études, nous avons démontré que la voie de quiescence BMP9/Alk1/Smad1,5,9 est inhibée *in vivo* et *in vitro* dans l'endothélium hyperglycémique/diabétique ainsi que dans le tissu rétinien. Cela suggère que cette voie jouerait un rôle dans la stabilité de l'endothélium et contribuerait à préserver l'intégrité et la fonction de la iBHR. Nous avons démontré que l'inactivation d'Alk1 mime l'effet de l'hyperglycémie dans l'OMD, menant à une hyperperméabilité de la iBHR. Nous avons montré que l'haploinsuffisance d'Alk1 en hyperglycémie exacerbe l'hyperperméabilité de l'endothélium rétinien, qui serait associé à une réduction des niveaux de protéines des jonctions ocludines et VE-cadhérines. Ces observations ont consistantes avec les données empiriques et théoriques sur les pertes de plusieurs fonctions vasculaires de cette signalisation à l'échelle humaine et animale, qui incluent les dilatations et l'hyperperméabilité de l'endothélium pouvant rappeler les altérations vasculaires observées dans l'OMD (Abdalla et al., 2006; Bourdeau et al., 2000; David et al., 2009; Frank et al., 2008; Johnson et al., 1996; Lowery et al., 2010; McAllister et al., 1994; Oh et al., 2000; Park et al., 2009; Srinivasan et al., 2003; Tual-Chalot et al., 2015; Zhou et al., 2016). En somme, ces observations d'inhibitions concordent avec le fait que plusieurs facteurs protecteurs vasculaires sont inhibés dans le diabète, dont la voie BMP9/Alk1 pourrait faire partie.



**Figure 4.1. La perte de la signalisation Alk1 dans le diabète exacerbe la signalisation VEGFR2/Src et l'hyperperméabilité rétinienne.** (Modifié de Claesson-Welsh 2018)

Mécanistiquement, 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 (**Figure 4.1**) (Scheppke et al., 2008). Ces résultats corroborent une étude qui a démontré que la perte d'Alk1 menait à la diminution des composantes de la voie Notch, une augmentation de la phosphorylation du VEGFR2 et la diminution du VEGFR1, un régulateur négatif de la voie VEGF (Ola et al., 2016). De plus, il a été montré que la voie BMP9 régula négativement l'expression du VEGF et qu'une déplétion d'Alk1 augmentait l'expression de VEGF (Shao, E. S. et al., 2009). Des études ont démontré que la VE-cadhérine pouvait optimiser la signalisation Smad1,5 par son interaction avec Alk1 (Rudini 2008). Combinant ces mécanismes d'études publiées à nos résultats in vivo et in vitro en conditions physiologiques ou hyperglycémiques, les mécanismes confirmeraient un effet des interactions bilatérales fonctionnelles entre Alk1 et VE-cadhérine. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la diminution des niveaux d'Alk1 dans l'endothélium hyperglycémique

déstabiliserait les jonctions endothéliales par la diminution des niveaux d'occludine et de VE-cadhérine, ce qui atténuerait davantage la signalisation Alk1/Smad1,5,9 et la transcription de gènes de quiescence modulée par les VE-cadhérines (Rudini et al., 2008). Cette régulation négative de l'interaction Alk1/VE-cadhérine mènerait à une levée d'inhibition et à l'activation de la voie VEGFR2/Src (Lampugnani et al., 2006; Lampugnani et al., 2003) amplifiant la phosphorylation, l'internalisation et la dégradation de la VE-cadhérine. Ceci causerait une boucle négative amplificatrice progressive de dégradation de la barrière de l'endothélium vasculaire, menant à une hyperperméabilité vasculaire. Bien que les conditions hyperglycémiques et/ou le VEGF puissent dégrader les jonctions occludines des cellules endothéliales rétiniennes (Antonetti et al., 1998), il est à préciser que dans notre étude, l'ablation d'Alk1 par des siRNA sur une monocouche de cellules endothéliales ou chez les souris Alk1 $\Delta$ EC suggère que la régulation des jonctions occludines par Alk1 s'effectue indépendamment de la voie VEGF. Ainsi, la perte d'Alk1 et de sa signalisation en hyperglycémie démontre qu'il pourrait jouer un rôle crucial dans le développement et la progression de l'OMD.

La diminution d'Alk1 en conditions hyperglycémiques pourrait être régulée par plusieurs processus incluant une réduction de son expression transcriptionnelle ou par endocytose et dégradation post-traductionnelle au niveau de la protéine (Gonzalez-Nunez et al., 2013; Itoh et al., 2007). Plusieurs facteurs de transcriptions sont connus pour réguler l'expression d'Alk1 dont principalement Sp1 (Garrido-Martin et al., 2010) et TCF7L2 (Araoka et al., 2010). Par la voie d'activation des hexosamines, les modifications post-traductionnelles durant le diabète par glycosylation O-linked  $\beta$ -N-Acetylglucosamine (O-GlcNAcylation) de plusieurs protéines dans

les plexus internes réiniens sont d'importance dans la pathophysiologie de la RD (Semba et al., 2014). La glycosylation de Sp1 (Jackson et al., 1988) peut réprimer ou altérer sa fonction de transcription de gènes et favoriser la transactivation de gènes médiateurs proathérogéniques et proinflammatoires (Hammes et al., 2003; Madamanchi et al., 2005; Xue et al., 2008; Yang et al., 2001; Zhang, X. et al., 2014) incluant l'augmentation du VEGF dans les cellules réiniennes (Donovan et al., 2014). Ces types de modifications peuvent même s'effectuer aux séquences CpG aux sites d'initiation de la transcription du promoteur d'Alk1, cruciaux pour l'activité transcriptionnelle Sp1 du gène *ACVRL1* et ainsi réprimer sa transcription (Gambetta et al., 2015; Garrido-Martin et al., 2010). Il est de plus probable que la perte d'activité du facteur de transcription TCF7L2 (Facchinello et al., 2017) soit aussi une cause de cette réduction des niveaux d'Alk1 en hyperglycémie. Il est intéressant de noter qu'une déficience fonctionnelle du TCF7L2 chez l'humain est aussi associée à l'augmentation de susceptibilité au diabète (Grant et al., 2006). En effet, les souris hétérozygotes TCF7L2<sup>+/-</sup> sont caractérisées par l'augmentation du glucose sanguin, une diminution de la sécrétion d'insuline, une dysfonction de l'endothélium au niveau des capillaires (Cintra et al., 2016; Facchinello et al., 2017) et la dérégulation de plusieurs autres hormones impliquées dans l'homéostasie du glucose (Chiang et al., 2012).

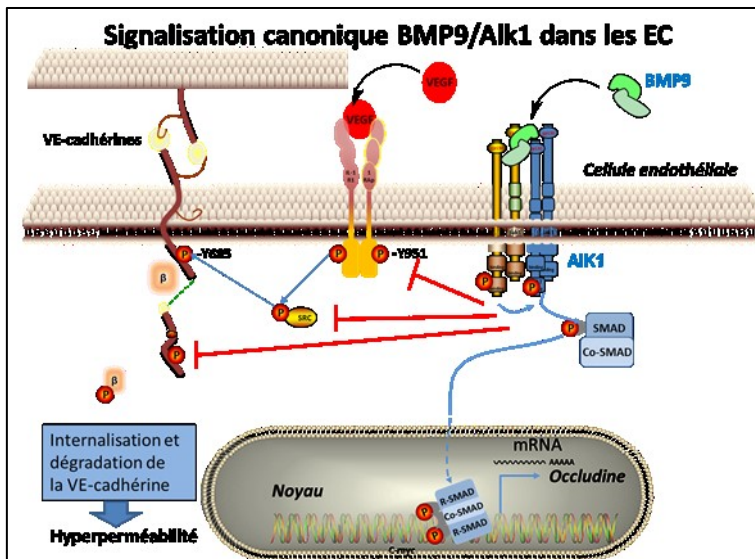
L'activation des complexes de récepteurs de type I, II et III mène normalement à leur internalisation par endocytose, pour être de façon subséquente recyclés à la surface membranaire (Dyer et al., 2014). Notre étude suggère que l'hyperglycémie réduit les niveaux du récepteur Alk1 à la surface cellulaire, tout en prévenant son internalisation en réponse à l'activation par la BMP9. Ceci pourrait être une conséquence du fait que l'hyperglycémie et le diabète peuvent mener à un dysfonctionnement et à l'activation aberrante du système ubiquitine-protéasome

réтинien, qui peut être un facteur dans la pathophysiologie de la RD (Aghdam et al., 2013). L'induction de la perte des niveaux d'Alk1 est peut-être trop rapide pour être expliquée complètement par un intermédiaire transcriptionnel. L'ubiquitination protéasomale sur du court terme pourrait mieux expliquer nos résultats cinétiques, puisque nous avons observé une diminution d'Alk1 totale dans les HRMEC entre 2 et 6 heures suite à une exposition hyperglycémique de 11 mM de glucose, qui est concomitante à une perte de la signalisation Smad1,5,9. Les protéases extracellulaires MMP, qui sont exprimées de façon aberrantes dans le diabète, pourraient aussi être impliquées dans la dégradation d'Alk1 et de VE-cadhérines (Navaratna et al., 2007).

### **4.1.3 Effet restaurateur sur l'endothélium par l'activation de la voie BMP9/Alk1**

Dans cette étude nous avons démontré une contribution essentielle de la voie BMP9/Alk1 pour contrer le développement de l'OMD par l'inhibition de la voie VEGF/VEGFR2/Src et l'hyperperméabilité de l'endothélium hyperglycémique (**Figure 4.1 et 4.2**). L'activation d'Alk1 par la BMP9 en hyperglycémie renforce la barrière interendothéliale, par la stabilisation des niveaux de protéines VE-cadhérine et occludine, ainsi que leurs colocalisations jonctionnelles. Cette restauration de la voie BMP9/Alk1, mène à l'induction de gènes stabilisateurs de l'endothélium spécifiques à la voie Smad1,5,9 (e.g Id1, Id2), à des gènes associés à la voie Dll4/Notch (e.g Hey, Hes), à l'augmentation des inhibiteurs MMP (TIMP), ainsi que la répression de plusieurs gènes pro-inflammatoires et angiogéniques ( VEGF, VEGFR2, HIF-1, Ang2, et MMP) (David et al., 2009; David et al., 2008; Larrivee et al., 2012; Oh et al., 2000; Ota et al., 2002; Ruiz et al., 2016; Shao, E. S. et al., 2009). Bien que la perte des péricytes

puisse être provoquée par l'hyperglycémie, l'effet restaurateur sur l'endothélium semble indépendant de l'effet stabilisateur des péricytes, puisque nous n'avons pas observé de différences significatives dans leur couverture des capillaires rétiens de la iBHR.



**Figure 4.2. Signalisation BMP9/Alk1 limitant la signalisation VEGF/VEGFR2 dans l'endothélium.**

Les mécanismes pour la récupération des protéines jonctionnelles inhibant l'hyperperméabilité de l'endothélium en hyperglycémie peuvent s'effectuer à plusieurs niveaux et sont multifactoriels. Notre étude démontre que cette restauration médiée par l'activation d'Alk1 par la BMP9 augmente la transcription des occludines et stabilise la protéine aux jonctions. Par contraste, nous n'avons pas observé d'augmentation transcriptionnelle de la VE-cadhérine, qui serait plutôt régulée au niveau post-traductionnel par l'inhibition de sa phosphorylation en présence de BMP9. Ceci est consistant avec des études qui ont montré que l'activation d'Alk1 dans l'endothélium ne changeait pas les niveaux mRNA de VE-cadhérine (Ota et al., 2002). De plus dans notre étude, la stabilisation de la VE-cadhérine est associée en partie à l'augmentation

des niveaux de protéines d'échafaudage  $\beta$ -caténine par la BMP9 principalement en hyperglycémie, ce qui par conséquent favoriserait le maintien du complexe VE-cadhérine/ $\beta$ -caténine aux jonctions interendothéliales (Schulte et al., 2011).

Durant cette première étude, nous avons observé un autre effet documenté de la BMP9 (Anhe et al., 2010; Caperuto et al., 2008; Chen et al., 2003), une régulation des niveaux de glucose sanguin des souris diabétiques. Cette modulation des niveaux de glycémie pourrait aussi contribuer au maintien de l'intégrité jonctionnelle de la iBHR et à l'inhibition de l'hyperperméabilité interendothéliale.

#### **4.1.4 L'effet restaurateur de la glycémie par l'activation de la voie BMP9/AIk3**

La production excessive de glucose hépatique associée à l'hyperglycémie chronique est un contributeur important au dysfonctionnement vasculaire diabétique. Les études du Diabetes Clinical Control Trial et la U.K. et Prospective Diabetes Study (DCCT et l'UKPDS) ont démontré que le contrôle strict de la glycémie chez les diabétiques diminue la fréquence de plusieurs complications vasculaires (Willard et al., 2012). Bien que les vertus protectrices de la voie canonique BMP9 sur l'endothélium vasculaire ont été largement documentées, ses effets sur l'homéostasie du glucose restent peu documentés. Il a déjà été reporté que la BMP9 pouvait inhiber la gluconéogenèse chez les souris diabétiques, associé à une diminution de la PEPCCK dans les hépatocytes (Chen et al., 2003). De plus, d'autres indications ont aussi associé à la voie PI3K/AKT au niveau de l'absorption du glucose musculaire (Anhe et al., 2010; Chen et al., 2003). De plus, certains ont attribué indirectement les effets de la BMP9 sur la tolérance au

glucose par l'augmentation de la sensibilité à l'insuline ou son expression (Caperuto et al., 2008).

Cependant, l'effet hypoglycémiant de la BMP9 demeure à être étudié, ce qui permettrait de nouvelles alternatives dans le traitement systémique et local des complications vasculaires. Notre deuxième étude met en lumière le rôle de la signalisation non canonique BMP9/AKT/FOXO1 dans la régulation de la gluconéogenèse hépatique via Alk3. En effet, une seule injection d'adénovirus permettant une expression hépato-spécifique soutenue de BMP9 (Ad-BMP9) chez les souris diabétiques (DB) a permis d'améliorer le contrôle glycémique sur plusieurs semaines.

Nous avons pu observer que les souris Ad-BMP9 à jeun démontraient une meilleure tolérance au glucose en réponse à une hyperglycémie aiguë induite par une dose intrapéritonéale de glucose (IPGTT). De plus, nous avons observé que les souris Ad-BMP9 ne pouvaient convertir le pyruvate en glucose selon le test de tolérance au pyruvate, ce qui suggère une inhibition fonctionnelle de la gluconéogenèse. Ceci nous a mené à mesurer l'expression des niveaux de protéines des enzymes clés gluconéogéniques, et nous avons observé une nette diminution du niveau d'expression des PEPCCK et G6Pase. En aval de la signalisation d'AKT, FOXO1 est connue pour son rôle dans l'activation de la gluconéogenèse via l'activation transcriptionnelle des enzymes gluconéogéniques (Ennequin et al., 2015; Gross et al., 2009; Lu et al., 2012). Nous avons pu démontrer que le mécanisme sous-jacent à cet effet implique la phosphorylation et l'activation des kinase AKT et la phosphorylation subséquente de FOXO1, qui mène à la diminution des niveaux des enzymes gluconéogéniques dans le foie ainsi que dans les cellules primaires hépatiques. Une des explications de cette régulation négative enzymatique pourrait



être associée directement aux niveaux totaux de FOXO1 ou à sa phosphorylation en position S256, qui mènent à son exclusion du noyau ou à sa dégradation. Ceci est aussi supporté par l'activation d'AKT en S473 puisque des études ont montré que la phosphorylation S473 d'AKT dans le foie menait à une inhibition de la gluconéogenèse hépatique (Matsuzaki et al., 2003; Nakae et al., 2001; OSullivan et al., 2015; Smith et al., 2017). Par l'invalidation des récepteurs de type I de la BMP9 par des ARN interférants (siRNA) chez les cellules hépatiques primaires, nous avons démontré que cette cascade de signalisation BMP9/AKT-FOXO1 menant à l'inhibition de la gluconéogenèse est modulée par le récepteur Alk3 (**Figure 13**). La perte de la signalisation BMP9 via Alk3 mène à une augmentation des enzymes gluconéogéniques, associée à l'augmentation des niveaux totaux de FOXO1 qui est concomitante avec une diminution de sa phosphorylation et de celle d'AKT. Fait intéressant, Il a été publié que le récepteur de type 1, Alk3 était requis pour la signalisation des BMP dans la régulation des niveaux de glucose. En effet cette étude avait démontré que les souris hétérozygotes pour Alk3 démontraient un métabolisme du glucose anormal et une intolérance au glucose (Scott et al., 2009). Plus récemment, au moment de la correction de ce manuscrit, une étude corroborant nos recherches ont été publié par Min Yang et collègues. Cette étude utilisant aussi le modèle surexprimant la BMP9 hépatique par vecteur adénoviral a démontré une amélioration de la tolérance au glucose chez les souris traitées relativement au souris contrôles (Yang et al., 2019). Intéressamment, cette étude a aussi révélé que les enzyme G6Pase et PEPCK hépatiques étaient réduites significativement chez les souris surexprimant la BMP9, avec en parallèle une augmentation de la phosphorylation d'AKT. De plus, dans cette étude, cet effet sur AKT est abrogé dans les cellules HepG2 in vitro par l'utilisation d'un inhibiteur spécifique d'Alk2 et

Alk3. Cela démontre que cette régulation métabolique de la BMP9 est médiée par les récepteurs aux BMP de type 1.

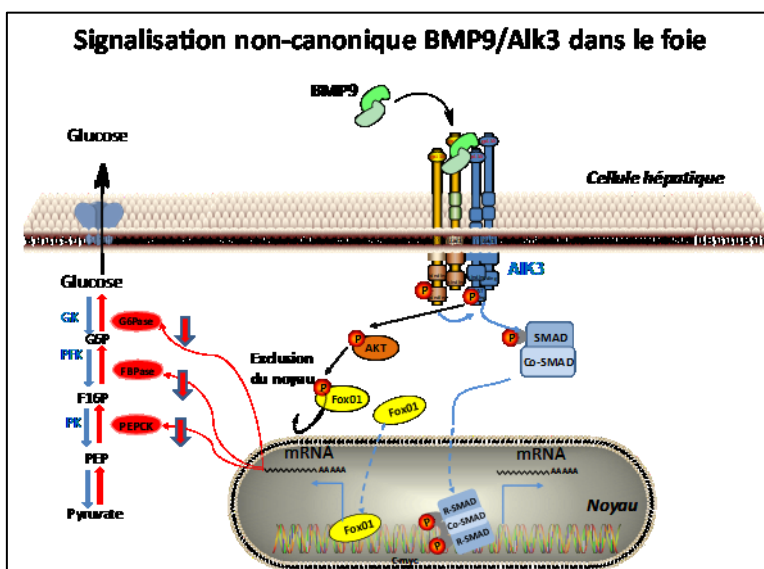


Figure 4.3. Signalisation BMP9/Alk3 inhibant la gluconéogenèse hépatique.

Nous avons testé le potentiel de ce modèle d'inhibition de la gluconéogenèse par la BMP9 à long terme sur des souris diabétiques STZ et démontré qu'une seule injection d'adénovirus Ad-BMP9 réduisait les niveaux de glucose sanguins avec un meilleur contrôle glycémique mesuré sur un intervalle de 4 semaines. La surexpression de la BMP9 était associée à une régulation négative des niveaux de FOXO1 dans le foie de souris diabétiques STZ. Selon nos résultats nous proposons un modèle d'inhibition de la gluconéogenèse hépatique médié par la BMP9 via Alk3/AKT/FOXO1.

Des niveaux faibles d'insuline dans un état à jeun ont très peu d'effets dans la suppression de la glycolyse et de la gluconéogenèse (Aronoff et al., 2004). Puisque la portion descendante

de l'amélioration de la tolérance au glucose par la BMP9 coïncide théoriquement avec la portion ascendante de la réponse de l'insuline physiologiquement, cela nous a mené à déduire que la BMP9 pourrait augmenter les niveaux d'insuline ou sa sensibilité. Cependant, en conditions de jeûne ou de non jeûne, les niveaux d'insuline ou l'augmentation de son action attestée lors de l'IPITT n'ont pas démontré de différences ni dans les niveaux ni dans la sensibilité à l'insuline en réponse à la BMP9. Ceci suggère que la transduction du signal BMP9/Alk3/AKT est indépendante de l'action à l'insuline et pourrait être d'intérêt thérapeutique pour atténuer les cas spécifiques de résistance à l'insuline rencontrés lors de sa signalisation aberrante impliquant son récepteur, particulièrement dans les cas où il y a des modifications par la PKC aux résidus sérines du récepteurs IRS2 ou des sous-unités de PI3K, en amont de AKT (Rask-Madsen et al., 2013). Des publications ont noté que les propriétés observées qu'exerce la BMP9 de façon locale et systémique ressemblent à l'effet physiologique de l'insuline en conditions hyperglycémique et diabétique (Caperuto et al., 2008; Saltiel et al., 2001; Sosa et al., 2011).

Il est à considérer que les tests de tolérances (pyruvate et glucose) que nous avons utilisés sont faits dans la phase post-prandiale et dans la phase postabsorptive avancée avec un approvisionnement de glucose qui est principalement fournit par la gluconéogenèse, puisqu'un jeûne de nuit épuise significativement les réserves de glycogène (Ayala et al., 2010). Comme attendu selon les publications, la BMP9 régule fortement les niveaux de l'enzyme PEPCK, mais réduit remarquablement la G6Pase. Des études antérieures ont montré que des déficiences de G6Pase résultent en une hypoglycémie (Cori et al., 1952; Illingworth, 1965). La G6Pase a un rôle pivot dans la production de glucose par les voies de gluconéogenèse et glycogénolyse (Service, J. F., 1991). Nos observations précédentes sur l'inhibition de la G6Pase par la BMP9

ont mené au questionnement sur le pool hépatique de Glucose-6-phosphate (G6P), qui est le métabolite convergeant terminal de la gluconéogenèse et de la glycogénolyse requis dans la libération du glucose catalysé par l'enzyme G6Pase, et qui serait confiné au niveau subcellulaire suite à une déficience de la G6Pase. La PEPCCK étant réduite par la BMP9 par conséquent bloquerait appréciablement le G6P synthétisé par la voie gluconéogénique, l'accumulation du G6P observé chez les souris à jeun serait due à la glycogénolyse en lien avec nos observations sur la déplétion des niveaux de glycogène (Yabaluri et al., 2010). Comme observé à jeun, l'effet de la BMP9 dans la réduction des réserves de glycogène a été aussi observée dans le foie des souris non à jeun, mais dans ce cas, nous n'avons pas observé une accumulation du G6P (résultats non-publié). En effet, une explication serait que l'état diabétique est connu pour augmenter l'expression des enzymes gluconéogéniques dans le foie diabétique, tel qu'observé dans nos résultats chez les souris diabétiques, en particulier sur la G6Pase (**figure 3.5A**). Globalement ces résultats suggèrent que les effets de la BMP9 sur la réduction de la production du glucose seraient principalement dus à l'inhibition de la G6Pase. L'accumulation de G6P pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas observé de pic d'augmentation de la glycémie durant la chronologie expérimentale, mais est aussi supportée par plusieurs études publiées qui montrent que jusqu'à 90% du glucose dérivant du glycogène hépatique est produit tôt durant les premières heures de jeûne (Winnick et al., 2016).

Bien que l'épinéphrine stimule le catabolisme du glycogène, le foie est plus sensible aux sécrétions pancréatiques de glucagon (Berg et al., 2002) qui stimule une production rapide de glucose hépatique par glycogénolyse (Winnick et al., 2016) dans un état de jeûne (Aronoff et al., 2004). Dans le diabète, l'insuline est inefficace dans la répression de la sécrétion de glucagon

résultant en une surproduction hépatique de glucose (Aronoff et al 2004). Bien que nous n'ayons pas observé d'augmentation des niveaux de glucagon entre les souris diabétiques et contrôles, nos résultats ont montré que les souris à jeun ou non à jeun diabétiques surexprimant la BMP9 démontrent une augmentation des niveaux de glucagon pancréatique, qui pourrait être due à un effet rétroactif protecteur (Young, 2005). Ajoutant à cet effet contre-régulateur, l'hypergluconémie peut survenir dans plusieurs états physiologiques ou pathologiques incluant les conditions hyperglycémiques diabétiques, durant les jeûnes excessifs ou même en conditions euglycémiques (Kabadi, 1993). Ces états ont souvent une déplétion des niveaux de glycogène hépatique comme environnement métabolique commun (Kabadi, 1992). Ce qui concorde avec nos observations et montre un lien étroit entre les niveaux réduits de glucose et la déplétion hépatique de glycogène par la BMP9 et l'hypergluconémie en conséquence. Ainsi, la BMP9 pourrait exercer un décalage précoce des mécanismes i) hormonaux de contre-régulation dans le stage post-absorptif en réponse à ces effet hypoglycémiant et ii) de déplétion des réserves en glycogène hépatique. Des études futures permettraient aussi d'élucider si l'élévation du glucagon pancréatique exercé par la BMP9 se transpose dans les niveaux de glucagon dans la circulation sanguine.

Bien que cette recherche met l'emphase sur l'effet autocrine/paracrine de la BMP9 sur la gluconéogenèse hépatique, la gluconéogenèse rénale est aussi une contributrice importante dans la production du glucose mis en circulation (~40%) (Gerich, 2001; Gerich et al., 2001) et il est ne serait pas exclu que la BMP9 agisse aussi sur la gluconéogenèse rénale . Un des effets significatifs de la BMP9 consiste en la réduction des niveaux de glucocorticoïdes, produits par le cortex surrénalien. L'exposition prolongée aux glucocorticoïdes mène à un phénotype de type

diabétique associé à une augmentation du glucose plasmatique, bien que des concentrations faible en glucocorticoïdes provoquent l'hypoglycémie, une diminution des réserves de glycogène et une hypersensibilité à l'insuline (Cassuto et al., 2005; Kinote et al., 2012). D'autres études sont nécessaires afin de déterminer si l'effet de la BMP9 sur la régulation des glucocorticoïdes serait hypothalamique ou au niveau hépatique. Ainsi, cet effet sur les glucostéroïdes pourrait ralentir la réponse gluconéogénique et contribuer indirectement à nos observations d'inhibition des enzymes gluconéogéniques et de diminution de la production de glucose.

Notre étude sur le contrôle glycémique de la BMP9 a permis d'approfondir notre compréhension des mécanismes régulateurs de l'homéostasie du glucose impliquant la voie non canonique BMP9/AKT hépatique. Cette voie a été identifiée comme ayant un potentiel dans l'absorption périphérique du glucose musculaire (Anhe et al., 2010; Chen et al., 2003). Ainsi, cet aspect régulateur pourrait être aussi un contributeur additionnel sur les niveaux de glucose sanguin observés dans cette recherche.

Finalement, bien que les propriétés protectrices vasculaires de la signalisation canonique BMP9 aient été appréciablement documentées, ses effets en conditions diabétiques restent encore non élucidés. Nos résultats de surexpression de la BMP9 ont démontré une amélioration du contrôle glycémique dans un modèle de diabète de type 1 par la signalisation non canonique Alk3/AKT/FOXO1 par la régulation de la gluconéogenèse hépatique. L'activation de cette voie pourrait être d'intérêt dans une nouvelle approche pour le traitement de l'hyperglycémie chronique des patients diabétiques et dans la prévention de complications vasculaires.

#### **4.1.5 Principales limitations expérimentales**

Les recherches sur des modèles murins sont d'une grande utilité et ont considérablement contribué aux développements de nouvelles thérapies et améliorés nos connaissances sur plusieurs pathologies. Cependant ces modèles d'études ont leurs limitations et ne peuvent être entièrement comparables aux maladies humaines. À l'instar du modèle murin qui présente une diversité neuronale et attributs rétinien qui sont distinct (Marc, 2008), la rétine de souris ne comporte pas de macula. De plus, l'OMD chez l'humain se développe sur plusieurs années en conséquence à de nombreux mécanismes et facteurs de risques. L'induction de la perméabilité vasculaire selon notre approche avec le modèle STZ ou le système CRE-LOX de délétion spécifique dans l'endothélium d'Alk1 se fait sur des temps beaucoup plus courts.

L'injection de STZ par exemple est une méthode efficace qui est d'une grande utilité par sa simplicité pour induire chimiquement diabète de type I et l'hyperglycémie chronique en quelques jours. Le modèle STZ, provoquant une toxicité aux cellules  $\beta$  du pancréas par son transport via GLUT2 qui est hautement exprimé dans le modèle murin dans ces cellules, mène à une déficience d'insuline (Hosokawa et al., 2001) mais n'est cependant pas le résultat d'une destruction auto-immune rencontrée chez l'humain diabétique de type 1. Cependant l'importance de ces études et leurs stratégies pourront devenir évidentes lors d'essais clinique chez les patients avec l'OMD.

En considérant notre modèle expérimental de livraison par vecteurs adénoviraux de la BMP9, les deux effets généraux étaient à considérer. L'effet systémique sur l'homéostasie du glucose en plus d'un effet sur l'homéostasie vasculaire. Bien que ces observations se rapprochent d'une

réalité physiologique de la BMP9 qui est mise en circulation par le foie, dans une perspective thérapeutique, nous aurions aimé atteindre un effet local plus restreint au réseaux vasculaire rétinienne. Par exemple une injection intravitréenne de BMP9 avec une comparaison jumelée pour chaque œil (e.g. chaque œil reçoit un composé, le traitement BMP9 pour l'œil droit vs le véhicule contrôle pour l'œil gauche). Ceci pourrait discriminer plus directement in vivo les contributions respectives de la BMP9 entre son effet hypoglycémiant et son effet direct sur les jonctions et la perméabilité rétinienne vasculaire.

Bien que les modèles murins soient parmi les mieux caractérisés, une des limitations est leur petite taille, ce qui fait en sorte que l'obtention de CE primaire rétiniennes est problématique (Wilhelm et al., 2011). Bien que nous ayons pu en extraire en petits nombres par triage cellulaire, leur division s'est montrée lente, ce qui a compromis leur survie une fois extraites. Nous avons donc opté pour les HUVECs, qui sont des cellules endothéliales macrovasculaire primaires d'origine humaine. Bien que ce modèle soit approprié pour répondre à certaines questions spécifiques de la fonction de la BHR, il n'est pas considéré comme un véritable modèle endothélial de BHR. Nous avons par conséquent comblé cette lacune par la culture in vitro d'un autre type cellulaire pour compléter notre étude, les cellules humaines microvasculaire rétiniennes HRMEC, qui ont donné principalement les même résultats.

Les études de la mesure de la dégradation de la BHR par l'extravasation d'Evans Blue-Albumine sont en augmentation constantes depuis les dernières années (Xu et al., 2001). Dans nos essais in vitro, la quantité d'extravasation d'EB-albumine n'a été mesuré que sur des CE en monocultures. Bien que cette simulation d'une barrière endothéliale in vitro soit relativement



plus facile que les manipulations *in vivo*, ils présentent d'importantes limitations. Entre autres, les cellules endothéliales cultivées en monocouche ont généralement peu de vésicules cytoplasmiques et de vacuoles, structures qui sont nombreuses dans ces mêmes cellules *in vivo* et fournissent les moyens par lesquels les solutés, et en particulier les protéines, traversent l'endothélium *in vivo*. De plus, les cultures en monocouches de CE isolées d'origine macro ou microvasculaires sont généralement plus perméable que la paroi normale des vaisseaux sanguins *in vivo*. Dans ce contexte, pour se rapprocher de l'état physiologique, des modèles de barrières endothéliales en co-culture avec des cellules murales aurait été avantageux puisqu'elles sont connues pour interagir et contribuer à la fonction de l'endothélium vasculaire (Nagy, 2008). Cependant il aurait été plus difficile dans ce contexte de mesurer la résistance spécifique interendothéliale.

## 4.2 Perspectives

### Perspectives en recherches fondamentales

Il est important de préciser que près de 40 % des patients présentant un diabète pendant plus de 50 ans sont exempts de complications rétinienne ou rénale. Cela suggère la présence de facteurs protecteurs endogènes (Rask-Madsen, C. et al., 2013). Suite à nos études, plusieurs questions pourraient être soulevées, parmi celles-ci, il serait intéressant de savoir si la signalisation de la BMP9 pourrait être inhibée chez les diabétiques. Bien que nos résultats chez les souris diabétiques n'aient pas démontré de différences dans les niveaux circulants de BMP9 dans un modèle de type I, plusieurs études récentes suggèrent une diminution des niveaux de BMP9

plasmatiques chez les prédiabétiques (Xu et al., 2017) et les sujets diabétiques de type II (Luo et al., 2017), et l'ont associée à la résistance à l'insuline et potentiellement à une dysfonction de l'endothélium (Huang et al., 2018). Cela démontre que la signalisation BMP9 pourrait être inhibée chez l'humain dans ce contexte et pourrait contribuer à l'inhibition de l'activation des récepteur Alk1 dans l'endothélium, et Alk3 au niveau hépatique, contribuant ainsi à une surproduction de glucose et une déstabilisation des vaisseaux chez l'humain au cours du diabète. Il serait dès lors intéressant de déterminer si des niveaux bas de BMP9 sont associés à un mauvais pronostic chez les patients diabétiques. Aucune étude n'a cependant évalué les niveaux de BMP10, qui pourrait avoir un potentiel compensatoire. En effet des études récentes ont démontré que la forme hétérodimériques BMP9-10 est la principale forme circulante dans une forme bioactive (Tillet et al., 2018).

### Perspectives thérapeutiques de la BMP9 pour l'OMD

Jusqu'à tout récemment les options dans le traitement de l'OMD étaient restreintes à la photocoagulation par laser et aux corticoïdes. Les injections d'inhibiteurs ciblant la voie VEGF, qui ont récemment été développées, ont aussi prouvé leur efficacité pour le traitement de l'OMD. Cependant des études ont démontrés que près de 75% des patients répondent peu ou pas, et ceux qui répondent peuvent développer des effets secondaires à long terme (~20%) (Blinder et al., 2017; Falavarjani et al., 2013). Nous avons démontré que la surexpression de la BMP9, tout en améliorant le contrôle glycémique via la voie hépatique Alk3/AKT/FOXO1, pourrait ainsi aider à prévenir les altérations biochimiques dans l'endothélium (e.g. Stress oxydatif, AGE, PKC), en renforçant l'interconnectivité de la monocouche endothéliale médiée par l'activation du récepteur spécifique à l'endothélium d'Alk1. Ensemble, ces deux effets

permettraient non seulement de protéger l'endothélium rétinien contre la dégradation de la iBHR menant à l'hyperperméabilité rétinienne qui mène à l'OMD, mais pourraient aussi procurer des bénéfices pour plusieurs autres pathologies présentant une hyperperméabilité microvasculaire et macrovasculaire.

L'utilisation d'injection intraoculaire de BMP9 ou de peptides ayant la capacité d'activer le récepteurs Alk1 pourrait procurer des avantages thérapeutiques, dû à l'expression préférentielle d'Alk1 dans l'endothélium vasculaire. Des thérapies basées sur l'activation d'Alk1 pourraient présenter des avantages aux anti-VEGF présentement utilisés en clinique. Une des principales est la spécificité d'expression d'Alk1, qui est beaucoup plus restreinte à l'endothélium que VEGFR2, qui se retrouve aussi dans plusieurs types neuronaux. Un autre avantage est que cette voie est déjà potentiellement inhibée en hyperglycémie/diabète, contrairement à la signalisation VEGF, d'où une action possible d'activation récupératrice.

Une des altérations fonctionnelles affectant la stabilité de la barrière endothéliale pouvant mener à la dégradation de la iBHR est la perte des EC et des péricytes en hyperglycémie. Les anti-VEGF pourrait accentuer cet effet, puisque les signalisations VEGF et PDGF sont primordiales dans la voie pro-survie des cellules EC et péricytes (Rask-Madsen, Christian et al., 2013). Favorisant leurs survies, l'activation d'Alk1 dans la rétine permettrait l'induction non seulement du gène PDGF (Gonzalez-Nunez et al., 2013), mais pourrait aussi permettre d'équilibrer les niveaux de VEGF (Shao 2009).

De plus, les injections thérapeutiques intraoculaires d'anti-VEGF sont associées à plusieurs effets secondaires, tels l'élévation de la pression intraoculaire, des hémorragies massives et l'infarctus maculaire. En effet, les anti-VEGF peuvent se retrouver dans la circulation à des concentrations importantes (Falavarjani, K. Ghasemi et al., 2013), et sont reconnus comme pouvant causer des effets systémiques secondaires (e.g. hémorragies non oculaires) (Schmucker et al., 2012). À l'opposé, l'administration systémique d'activateurs analogues de la BMP9 pourraient avoir des avantages, puisque Alk3, qui médie l'inhibition de la gluconéogenèse hépatique dans notre étude, pourrait être activé et pourrait mener à un contrôle glycémique. De plus, la BMP9 circulante pourrait aussi améliorer l'absorption du glucose dans les tissus périphériques, tel que le muscle (Anhe et al., 2010). D'autres effets potentiels bénéfiques systémiques incluraient une meilleure perfusion, puisque l'activation d'Alk1/Eng peut améliorer la perfusion tissulaire et le couplage d'eNOS (Toporsian et al., 2005), dont l'activité est inhibée dans le diabète. En effet, il a aussi été montré que la voie ALK1, pouvait avoir des effets limitant le calibre des vaisseaux (i.e. par rapport aux dilatations) (Corti et al., 2011; Jerkic et al., 2004; Toporsian et al., 2005). Or, dans notre étude, bien que nous n'ayons pas observé des variations des niveaux d'endogline par l'hyperglycémie, nous avons vu que la BMP9 augmentait la phosphorylation d'eNOS en conditions hyperglycémiques.

D'autres effets systémiques potentiellement bénéfiques dans un contexte diabétique pourraient être évoqué par l'activation d'Alk1, en particulier dans les complications diabétiques telles l'artériosclérose (Kraehling et al., 2016) ou les neuropathies, et dans le traitement de maladies impliquant le SNC dont la plupart des médicaments ne peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) (Pardridge, 2005). Dans cette optique problématique l'inhibition de la voie

BMP9/Alk1 permettrait un relâchement des jonctions et améliorerait la livraison de médicaments à travers les barrières hémato-neurales. Bien que la perspective d'une application thérapeutique éventuelle d'activateurs ou d'inhibiteurs de la voie BMP9/Alk1 semble intéressante et prometteuse, l'utilisation de telles thérapies demande prudence et spécificité avec un dosage optimal puisque, comme souligné par des spécialistes en biologie vasculaire (Claesson-Welsh, 2015, 2018), la BMP9 influence de nombreux processus directement et indirectement tel que noté aussi dans notre étude dans la régulation hormonale.

## Conclusion

Présentement le diabète est une pandémie à l'échelle mondiale et sa prévalence est en augmentation. Les complications diabétiques sont associées à la mortalité d'une personne sur dix au Canada (PHAC, 2011). Malgré l'arrivée de plusieurs agents permettant le contrôle de l'hyperglycémie, très peu sont destinés à traiter directement les complications vasculaires diabétiques et l'inverse est aussi vrai pour les traitements locaux, qui ne présentent pas d'avantages pour le contrôle de la glycémie. L'OMD est la conséquence clinique principale de la perméabilité induite par l'altération de la BHR (Klaassen et al., 2013). Les traitements de l'OMD ayant leurs limites, la présente recherche met en lumière une alternative permettant de traiter l'œdème diabétique d'origine vasogénique par un ciblage direct des vaisseaux qui favoriserait leur stabilité. Ce rétablissement de la signalisation Alk1, qui semble faire défaut en hyperglycémie, pourrait permettre le développement d'analogues de la BMP9, pouvant atteindre non seulement ces effets biologiques vasculaires d'activation d'Alk1, mais aussi les combiner à des effets sur l'homéostasie du glucose via Alk3. Ainsi cette complémentation permettrait une correction des altérations biochimiques hyperglycémiques vers une réhabilitation des conditions de quiescence et de stabilité vasculaire réduisant l'hyperperméabilité de la iBHR, atténuant la progression de l'OMD et ses complications visuelles.

## Bibliographie

- Abdalla, S. A., & Letarte, M. (2006). Hereditary haemorrhagic telangiectasia: current views on genetics and mechanisms of disease. *J Med Genet*, 43(2), 97-110. doi:10.1136/jmg.2005.030833
- Abràmoff, M. D., Garvin, M. K., & Sonka, M. (2010). Retinal imaging and image analysis. *IEEE reviews in biomedical engineering*, 3, 169-208. doi:10.1109/RBME.2010.2084567
- Adam, A. P. (2015). Regulation of Endothelial Adherens Junctions by Tyrosine Phosphorylation. *Mediators Inflamm*, 2015, 24. doi:10.1155/2015/272858
- Aghdam, S. Y., & Sheibani, N. (2013). The ubiquitin-proteasome system and microvascular complications of diabetes. *J Ophthalmic Vis Res*, 8(3), 244-256.
- Aiello, L. P. (2002). The potential role of PKC beta in diabetic retinopathy and macular edema. *Surv Ophthalmol*, 47 Suppl 2, S263-269.
- Aird William, C. (2007a). Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circulation Research*, 100(2), 174-190. doi:10.1161/01.RES.0000255690.03436.ae
- Aird William, C. (2007b). Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium. *Circulation Research*, 100(2), 158-173. doi:10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a
- Al Ahmad, A., Gassmann, M., & Ogunshola, O. O. (2009). Maintaining blood-brain barrier integrity: pericytes perform better than astrocytes during prolonged oxygen deprivation. *J Cell Physiol*, 218(3), 612-622. doi:10.1002/jcp.21638
- Alastalo, T. P., Li, M., Perez Vde, J., Pham, D., Sawada, H., Wang, J. K., Koskenvuo, M., Wang, L., Freeman, B. A., Chang, H. Y., & Rabinovitch, M. (2011). Disruption of PPARgamma/beta-catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *J Clin Invest*, 121(9), 3735-3746. doi:10.1172/jci43382
- Alsahli, M., Shrayyef, M. Z., & Gerich, J. E. (2017). Normal Glucose Homeostasis. In L. Poretsky (Ed.), *Principles of Diabetes Mellitus* (pp. 23-42). Cham: Springer International Publishing.
- Anderson, B., Jr, & Saltzman, H. A. (1964). Retinal oxygen utilization measured by hyperbaric blackout. *Archives of Ophthalmology*, 72(6), 792-795. doi:10.1001/archophth.1964.00970020794009
- Anhe, F. F., Lellis-Santos, C., Leite, A. R., Hirabara, S. M., Boschero, A. C., Curi, R., Anhe, G. F., & Bordin, S. (2010). Smad5 regulates Akt2 expression and insulin-induced glucose uptake in L6 myotubes. *Mol Cell Endocrinol*, 319(1-2), 30-38. doi:10.1016/j.mce.2010.01.003
- Antcliff, R. J., & Marshall, J. (1999). The pathogenesis of edema in diabetic maculopathy. *Semin Ophthalmol*, 14(4), 223-232. doi:10.153/soph01400197
- Antonetti, D. A., Barber, A. J., Hollinger, L. A., Wolpert, E. B., & Gardner, T. W. (1999). 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*, 274(33), 23463-23467.
- Antonetti, D. A., Barber, A. J., Khin, S., Lieth, E., Tarbell, J. M., & Gardner, T. W. (1998). Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*, 47(12), 1953-1959.

- Antonetti, D. A., Lieth, E., Barber, A. J., & Gardner, T. W. (1999). Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol*, *14*(4), 240-248. doi:10.3109/08820539909069543
- Araoka, T., Abe, H., Tominaga, T., Mima, A., Matsubara, T., Murakami, T., Kishi, S., Nagai, K., & Doi, T. (2010). Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) regulates activin receptor-like kinase 1 (ALK1)/Smad1 pathway for development of diabetic nephropathy. *Mol Cells*, *30*(3), 209-218. doi:10.1007/s10059-010-0109-9
- Arden, G. B., & Ramsey, D. J. (2015). Diabetic retinopathy and a novel treatment based on the biophysics of rod photoreceptors and dark adaptation. In H. Kolb, E. Fernandez, & R. Nelson (Eds.), *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Armulik, A., Genove, G., Mae, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*, *468*(7323), 557-561. doi:10.1038/nature09522
- Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B., & Want, L. (2004). Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, *17*(3), 183-190. doi:10.2337/diaspect.17.3.183
- Arshavsky, V. Y., & Burns, M. E. (2014). Current understanding of signal amplification in phototransduction. *Cellular logistics*, *4*, e29390-e29390. doi:10.4161/cl.29390
- Asnaghi, V., Gerhardinger, C., Hoehn, T., Adeboje, A., & Lorenzi, M. (2003). A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. *Diabetes*, *52*(2), 506-511.
- Attisano, L., Carcamo, J., Ventura, F., Weis, F. M., Massague, J., & Wrana, J. L. (1993). Identification of human activin and TGF beta type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell*, *75*(4), 671-680.
- Austin, E. D., & Loyd, J. E. (2014). The genetics of pulmonary arterial hypertension. *Circulation Research*, *115*(1), 189-202. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.303404
- Ayala, J. E., Samuel, V. T., Morton, G. J., Obici, S., Croniger, C. M., Shulman, G. I., Wasserman, D. H., & McGuinness, O. P. (2010). Standard operating procedures for describing and performing metabolic tests of glucose homeostasis in mice. *Dis Model Mech*, *3*(9-10), 525-534. doi:10.1242/dmm.006239
- Balda, M. S., Whitney, J. A., Flores, C., Gonzalez, S., Cereijido, M., & Matter, K. (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol*, *134*(4), 1031-1049.
- Bamforth, S. D., Kniesel, U., Wolburg, H., Engelhardt, B., & Risau, W. (1999). A dominant mutant of occludin disrupts tight junction structure and function. *J Cell Sci*, *112* ( Pt 12), 1879-1888.
- Bandello, F., Querques, G., & Loewenstein, A. (2017). Medical Retina : Update 2017.
- Barthel, A., & Schmoll, D. (2003). Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *285*(4), E685-692. doi:10.1152/ajpendo.00253.2003



- Bazzoni, G., & Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*, 84(3), 869-901. doi:10.1152/physrev.00035.2003
- Behl, Y., Krothapalli, P., Desta, T., DiPiazza, A., Roy, S., & Graves, D. T. (2008). Diabetes-enhanced tumor necrosis factor-alpha production promotes apoptosis and the loss of retinal microvascular cells in type 1 and type 2 models of diabetic retinopathy. *The American Journal of Pathology*, 172(5), 1411-1418. doi:10.2353/ajpath.2008.071070
- Behzadian, M. A., Wang, X. L., Windsor, L. J., Ghaly, N., & Caldwell, R. B. (2001). TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(3), 853-859.
- Behzadian, M. A., Windsor, L. J., Ghaly, N., Liou, G., Tsai, N. T., & Caldwell, R. B. (2003). VEGF-induced paracellular permeability in cultured endothelial cells involves urokinase and its receptor. *Faseb j*, 17(6), 752-754. doi:10.1096/fj.02-0484fje
- Berg, J. N., Tymoczko, J. L., & Stryer, L. (2002). Ephrin and glucagon signal the need for glycogen breakdown. *Biochemistry 5 th edition section 21.3*, NY(WH Freeman), NBK22429.
- Bergers, G., & Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*, 7(4), 452-464. doi:10.1215/s1152851705000232
- Bernabéu, C., Blanco, F. J., Langa, C., Garrido-Martin, E. M., & Botella, L. M. (2010). Involvement of the TGF- $\beta$  superfamily signalling pathway in hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Journal of Applied Biomedicine*, 8(3), 169-177. doi:<https://doi.org/10.2478/v10136-009-0020-x>
- Berthiaume, A.-A., Hartmann, D. A., Majesky, M. W., Bhat, N. R., & Shih, A. Y. (2018). Pericyte Structural Remodeling in Cerebrovascular Health and Homeostasis. *Frontiers in aging neuroscience*, 10, 210-210. doi:10.3389/fnagi.2018.00210
- Betts-Obregon, B. S., Mondragon, A. A., Mendiola, A. S., LeBaron, R. G., Asmis, R., Zou, T., Gonzalez-Fernandez, F., & Tsin, A. T. (2016). TGF $\beta$  induces BIGH3 expression and human retinal pericyte apoptosis: a novel pathway of diabetic retinopathy. *Eye (Lond)*, 30(12), 1639-1647. doi:10.1038/eye.2016.179
- Bi, J., & Ge, S. (2014). Potential roles of BMP9 in liver fibrosis. *Int J Mol Sci*, 15(11), 20656-20667. doi:10.3390/ijms151120656
- Bidart, M., Ricard, N., Levet, S., Samson, M., Mallet, C., David, L., Subileau, M., Tillet, E., Feige, J. J., & Bailly, S. (2012). BMP9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. *Cell Mol Life Sci*, 69(2), 313-324. doi:10.1007/s00018-011-0751-1
- Bilous, R., & Donnelly, R. (2014). Diabetic Eye disease. *Handbook of Diabetes, Chapter 15*(14 th Edition), 109-118.
- Biswas, S., & Chakrabarti, S. (2017). Pathogenetic Mechanisms in Diabetic Retinopathy: From Molecules to Cells to Tissues. In C. C. Kartha, S. Ramachandran, & R. M. Pillai (Eds.), *Mechanisms of Vascular Defects in Diabetes Mellitus* (pp. 209-247). Cham: Springer International Publishing.
- Blaschuk, O. W., Oshima, T., Gour, B. J., Symonds, J. M., Park, J. H., Kevil, C. G., Trocha, S. D., Michaud, S., Okayama, N., Elrod, J. W., Alexander, J. S., & Sasaki, M. (2002).

- Identification of an occludin cell adhesion recognition sequence. *Inflammation*, 26(4), 193-198.
- Blasig, I. E., Bellmann, C., Cording, J., Del Vecchio, G., Zwanziger, D., Huber, O., & Haseloff, R. F. (2011). Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions. *Antioxid Redox Signal*, 15(5), 1195-1219. doi:10.1089/ars.2010.3542
- Blinder, K. J., Dugel, P. U., Chen, S., Jumper, J. M., Walt, J. G., Hollander, D. A., & Scott, L. C. (2017). Anti-VEGF treatment of diabetic macular edema in clinical practice: effectiveness and patterns of use (ECHO Study Report 1). *Clin Ophthalmol*, 11, 393-401. doi:10.2147/oph.s128509
- BMJ. (1995). United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS) 13: relative efficacy of randomly allocated diet, sulphonylurea, insulin, or metformin in patients with newly diagnosed non-insulin dependent diabetes followed for three years. *BMJ*, 310(6972), 83-88. doi:10.1136/bmj.310.6972.83
- Bourdeau, A., Cymerman, U., Paquet, M. E., Meschino, W., McKinnon, W. C., Guttmacher, A. E., Becker, L., & Letarte, M. (2000). Endoglin expression is reduced in normal vessels but still detectable in arteriovenous malformations of patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia type 1. *Am J Pathol*, 156(3), 911-923. doi:10.1016/s0002-9440(10)64960-7
- Brasch, J., Harrison, O. J., Ahlsen, G., Carnally, S. M., Henderson, R. M., Honig, B., & Shapiro, L. (2011). Structure and binding mechanism of vascular endothelial cadherin: a divergent classical cadherin. *Journal of molecular biology*, 408(1), 57-73. doi:10.1016/j.jmb.2011.01.031
- Brown, M. A., Zhao, Q., Baker, K. A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A., Roschke, V., Sanyal, I., & Choe, S. (2005). Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. *J Biol Chem*, 280(26), 25111-25118. doi:10.1074/jbc.M503328200
- Cai, J., Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G., & ten Dijke, P. (2012). BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett*, 586(14), 1993-2002. doi:10.1016/j.febslet.2012.04.030
- Caldwell, R. B., Bartoli, M., Behzadian, M. A., El-Remessy, A. E. B., Al-Shabrawey, M., Platt, D. H., & Caldwell, R. W. (2003). Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 19(6), 442-455. doi:10.1002/dmrr.415
- Calvo, P., Abadia, B., Ferreras, A., Ruiz-Moreno, O., Verdes, G., & Pablo, L. E. (2015). Diabetic Macular Edema: Options for Adjunct Therapy. *Drugs*, 75(13), 1461-1469. doi:10.1007/s40265-015-0447-1
- Campbell, J. P., Zhang, M., Hwang, T. S., Bailey, S. T., Wilson, D. J., Jia, Y., & Huang, D. (2017). Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Scientific Reports*, 7, 42201. doi:10.1038/srep42201
- Campbell, M., Cassidy, P. S., O'Callaghan, J., Crosbie, D. E., & Humphries, P. (2018). Manipulating ocular endothelial tight junctions: Applications in treatment of retinal disease pathology and ocular hypertension. *Prog Retin Eye Res*, 62, 120-133. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.09.003

- Campbell, M., Hanrahan, F., Gobbo, O. L., Kelly, M. E., Kiang, A.-S., Humphries, M. M., Nguyen, A. T. H., Ozaki, E., Keaney, J., Blau, C. W., Kerskens, C. M., Cahalan, S. D., Callanan, J. J., Wallace, E., Grant, G. A., Doherty, C. P., & Humphries, P. (2012). Targeted suppression of claudin-5 decreases cerebral oedema and improves cognitive outcome following traumatic brain injury. *Nat Commun*, 3, 849. doi:10.1038/ncomms1852
- <https://www.nature.com/articles/ncomms1852#supplementary-information>
- Caperuto, L. C., Anhe, G. F., Cambiaghi, T. D., Akamine, E. H., do Carmo Buonfiglio, D., Cipolla-Neto, J., Curi, R., & Bordin, S. (2008). Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. *Endocrinology*, 149(12), 6326-6335. doi:10.1210/en.2008-0655
- Carmeliet, P., Lampugnani, M. G., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F., de Ruiter, M. C., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J. M., Collen, D., & Dejana, E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*, 98(2), 147-157.
- Cassuto, H., Kochan, K., Chakravarty, K., Cohen, H., Blum, B., Olswang, Y., Hakimi, P., Xu, C., Massillon, D., Hanson, R. W., & Reshef, L. (2005). Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit. *J Biol Chem*, 280(40), 33873-33884. doi:10.1074/jbc.M504119200
- Castonguay, R., Werner, E. D., Matthews, R. G., Presman, E., Mulivor, A. W., Solban, N., Sako, D., Pearsall, R. S., Underwood, K. W., Sehra, J., Kumar, R., & Grinberg, A. V. (2011). Soluble endoglin specifically binds bone morphogenetic proteins 9 and 10 via its orphan domain, inhibits blood vessel formation, and suppresses tumor growth. *J Biol Chem*, 286(34), 30034-30046. doi:10.1074/jbc.M111.260133
- Cébe-Suarez, S., Zehnder-Fjällman, A., & Ballmer-Hofer, K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 63(5), 601. doi:10.1007/s00018-005-5426-3
- Celeste, A. J., Iannazzi, J. A., Taylor, R. C., Hewick, R. M., Rosen, V., Wang, E. A., & Wozney, J. M. (1990). Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(24), 9843-9847.
- Cerani, A., Tetreault, N., Menard, C., Lapalme, E., Patel, C., Sitaras, N., Beaudoin, F., Leboeuf, D., De Guire, V., Binet, F., Dejda, A., Rezende, Flavio A., Miloudi, K., & Sapiéha, P. (2013). Neuron-Derived Semaphorin 3A Is an Early Inducer of Vascular Permeability in Diabetic Retinopathy via Neuropilin-1. *Cell Metabolism*, 18(4), 505-518. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.003>
- Chan-Ling, T., Koina, M. E., McColm, J. R., Dahlstrom, J. E., Bean, E., Adamson, S., Yun, S., & Baxter, L. (2011). Role of CD44+ stem cells in mural cell formation in the human choroid: evidence of vascular instability due to limited pericyte ensheathment. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(1), 399-410. doi:10.1167/iovs.10-5403

- Channa, R., Sophie, R., Khwaja, A. A., Do, D. V., Hafiz, G., Nguyen, Q. D., & Campochiaro, P. A. (2014). Factors affecting visual outcomes in patients with diabetic macular edema treated with ranibizumab. *Eye (Lond)*, *28*(3), 269-278. doi:10.1038/eye.2013.245
- Chawla, A., Chawla, R., & Jaggi, S. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian J Endocrinol Metab*, *20*(4), 546-551. doi:10.4103/2230-8210.183480
- Chen, C., Grzegorzewski, K. J., Barash, S., Zhao, Q., Schneider, H., Wang, Q., Singh, M., Pukac, L., Bell, A. C., Duan, R., Coleman, T., Duttaroy, A., Cheng, S., Hirsch, J., Zhang, L., Lazard, Y., Fischer, C., Barber, M. C., Ma, Z.-D., Zhang, Y.-Q., Reavey, P., Zhong, L., Teng, B., Sanyal, I., Ruben, S. M., Blondel, O., & Birse, C. E. (2003). An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. *Nat Biotech*, *21*(3), 294-301. doi:[http://www.nature.com/nbt/journal/v21/n3/supinfo/nbt795\\_S1.html](http://www.nature.com/nbt/journal/v21/n3/supinfo/nbt795_S1.html)
- Chen, H., Brady Ridgway, J., Sai, T., Lai, J., Warming, S., Chen, H., Roose-Girma, M., Zhang, G., Shou, W., & Yan, M. (2013). Context-dependent signaling defines roles of BMP9 and BMP10 in embryonic and postnatal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(29), 11887-11892. doi:10.1073/pnas.1306074110
- Chen, H., Shi, S., Acosta, L., Li, W., Lu, J., Bao, S., Chen, Z., Yang, Z., Schneider, M. D., Chien, K. R., Conway, S. J., Yoder, M. C., Haneline, L. S., Franco, D., & Shou, W. (2004). BMP10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis. *Development*, *131*(9), 2219-2231. doi:10.1242/dev.01094
- Chen, J., Chiang, C.-W., Zhang, H., & Song, S.-K. (2012). Cell swelling contributes to thickening of low-dose N-methyl-D-aspartate-induced retinal edema. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *53*(6), 2777-2785. doi:10.1167/jovs.11-8827
- Chen, W., Guo, Y., Walker, E. J., Shen, F., Jun, K., Oh, S. P., Degos, V., Lawton, M. T., Tihan, T., Davalos, D., Akassoglou, K., Nelson, J., Pile-Spellman, J., Su, H., & Young, W. L. (2013). Reduced mural cell coverage and impaired vessel integrity after angiogenic stimulation in the Alk1-deficient brain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *33*(2), 305-310. doi:10.1161/atvbaha.112.300485
- Chen, W., Sun, Z., Han, Z., Jun, K., Camus, M., Wankhede, M., Mao, L., Arnold, T., Young, W. L., & Su, H. (2014). De novo cerebrovascular malformation in the adult mouse after endothelial Alk1 deletion and angiogenic stimulation. *Stroke*, *45*(3), 900-902. doi:10.1161/strokeaha.113.003655
- Chen, Y.-h., Merzdorf, C., Paul, D. L., & Goodenough, D. A. (1997). COOH Terminus of Occludin Is Required for Tight Junction Barrier Function in Early *Xenopus* Embryos. *138*(4), 891-899. doi:10.1083/jcb.138.4.891 %J The Journal of Cell Biology
- Cheung, N., Wong, I. Y., & Wong, T. Y. (2014). Ocular anti-VEGF therapy for diabetic retinopathy: overview of clinical efficacy and evolving applications. *Diabetes Care*, *37*(4), 900-905. doi:10.2337/dc13-1990
- Chiang, Y.-t., Ip, W., & Jin, T. (2012). The role of the Wnt signaling pathway in incretin hormone production and function. *Frontiers in Physiology*, *3*(273). doi:10.3389/fphys.2012.00273
- Choi, Y. K., & Kim, K. W. (2008). Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Rep*, *41*(5), 345-352.

- Chou, M. T., Wang, J., & Fujita, D. J. (2002). Src kinase becomes preferentially associated with the VEGFR, KDR/Flk-1, following VEGF stimulation of vascular endothelial cells. *BMC Biochem*, 3, 32.
- Chua, C. C., Hamdy, R. C., & Chua, B. H. (1998). Upregulation of vascular endothelial growth factor by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 25(8), 891-897.
- Cintra, R., Moura, F. A., Carvalho, L. S. F., Daher, M., Santos, S. N., Costa, A. P. R., Figueiredo, V. N., Andrade, J. M., Neves, F. A. R., Silva, J. C. Q. e., Sposito, A. C., & on behalf of the Brasília Heart Study, G. (2016). TCF7L2 polymorphism is associated with low nitric oxide release, endothelial dysfunction and enhanced inflammatory response after myocardial infarction(). *BBA Clinical*, 5, 159-165. doi:10.1016/j.bbaci.2016.03.010
- Ciulla, T. A., Amador, A. G., & Zinman, B. (2003). Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema. *Pathophysiology, screening, and novel therapies*, 26(9), 2653-2664. doi:10.2337/diacare.26.9.2653
- Claesson-Welsh, L. (2015). Vascular permeability—the essentials. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 120(3), 135-143. doi:10.3109/03009734.2015.1064501
- Claesson-Welsh, L. (2018). Alk1 (Activin Receptor-Like Kinase 1) and Vascular Hyperpermeability in Diabetic Retinopathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38(8), 1673-1675. doi:doi:10.1161/ATVBAHA.118.311365
- Coelho, S., Carilho, P., Inchaustegui, L. (2013). Management of hyperglycaemia in type 2 diabetic patients with Chronic kidney Disease. *Portuguese Journal of Nephrology & Hypertension*, 27(2), 91-100.
- Cogan, D. G., & Kuwabara, T. (1984). Comparison of retinal and cerebral vasculature in trypsin digest preparations. *Br J Ophthalmol*, 68(1), 10-12.
- Collins, J., & Fleming, T. (1995). Specific mRNA detection in single lineage-marked blastomeres from preimplantation embryos. *Trends Genet*, 11(1), 5-7.
- Corada, M., Liao, F., Lindgren, M., Lampugnani, M. G., Breviario, F., Frank, R., Muller, W. A., Hicklin, D. J., Bohlen, P., & Dejana, E. (2001). Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability. *Blood*, 97(6), 1679-1684.
- Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, M. G., Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., McDonald, D. M., Ward, P. A., & Dejana, E. (1999). Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(17), 9815-9820. doi:10.1073/pnas.96.17.9815
- Corada, M., Nyqvist, D., Orsenigo, F., Caprini, A., Giampietro, C., Taketo, M. M., Iruela-Arispe, M. L., Adams, R. H., & Dejana, E. (2010). The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev Cell*, 18(6), 938-949. doi:10.1016/j.devcel.2010.05.006
- Cori, G. T., & Cori, C. F. (1952). Glucose-6-phosphatase of the liver in glycogen storage disease. *J Biol Chem*, 199(2), 661-667.
- Corti, P., Young, S., Chen, C. Y., Patrick, M. J., Rochon, E. R., Pekkan, K., & Roman, B. L. (2011). Interaction between alk1 and blood flow in the development of arteriovenous malformations. *Development*, 138(8), 1573-1582. doi:10.1242/dev.060467

- Coscas, G., Cunha-Vaz, J., & Soubrane, G. (2010). Macular edema: definition and basic concepts. *Dev Ophthalmol*, 47, 1-9. doi:10.1159/000320070
- Coscas, G., Loewenstein, A., Cunha-Vaz, J. G., & Soubrane, G. (2017). *Macular edema*. Retrieved from <http://public.eblib.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=4832502>
- Coskuner, O., & Uversky, V. N. (2017). BMP-2 and BMP-9 binding specificities with ALK-3 in aqueous solution with dynamics. *J Mol Graph Model*, 77, 181-188. doi:10.1016/j.jmgm.2017.08.005
- Country, M. W. (2017). Retinal metabolism: A comparative look at energetics in the retina. *Brain Res*, 1672, 50-57. doi:10.1016/j.brainres.2017.07.025
- Creager, M. A., Luscher, T. F., Cosentino, F., & Beckman, J. A. (2003). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*, 108(12), 1527-1532. doi:10.1161/01.cir.0000091257.27563.32
- Cummins, P. M. (2012). Occludin: One Protein, Many Forms. 32(2), 242-250. doi:10.1128/MCB.06029-11 %J Molecular and Cellular Biology
- Cunha-Vaz, J. (2017). The Blood-Retinal Barrier in the Management of Retinal Disease: EURETINA Award Lecture. *Ophthalmologica*, 237(1), 1-10. doi:10.1159/000455809
- Cunha-Vaz, J., Bernardes, R., & Lobo, C. (2011). Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*, 21 Suppl 6, S3-9. doi:10.5301/ejo.2010.6049
- Cunha-Vaz, J., Faria de Abreu, J. R., & Campos, A. J. (1975). Early breakdown of the blood-retinal barrier in diabetes. *Br J Ophthalmol*, 59(11), 649-656.
- Cunha-Vaz, J. G. (1976). The blood-retinal barriers. *Doc Ophthalmol*, 41(2), 287-327.
- Cunha-Vaz, J. G. (1983). Studies on the pathophysiology of diabetic retinopathy. The blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes*, 32 Suppl 2, 20-27.
- Cunha, S. I., Magnusson, P. U., Dejana, E., & Lampugnani, M. G. (2017). Deregulated TGF-beta/BMP Signaling in Vascular Malformations. *Circ Res*, 121(8), 981-999. doi:10.1161/circresaha.117.309930
- Cunha, S. I., & Pietras, K. (2011). ALK1 as an emerging target for antiangiogenic therapy of cancer. *Blood*, 117(26), 6999-7006. doi:10.1182/blood-2011-01-330142
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(1), a020412. doi:10.1101/cshperspect.a020412
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 468(7323), 562-566. doi:10.1038/nature09513
- Daruich, A., Matet, A., Moulin, A., Kowalczyk, L., Nicolas, M., Sellam, A., Rothschild, P.-R., Omri, S., Gélizé, E., Jonet, L., Delaunay, K., De Kozak, Y., Berdugo, M., Zhao, M., Crisanti, P., & Behar-Cohen, F. (2018). Mechanisms of macular edema: Beyond the surface. *Prog Retin Eye Res*, 63, 20-68. doi:<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.10.006>
- Das, A. (2016). Diabetic Retinopathy: Battling the Global Epidemic. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2016(57), 6669-6682.
- Das, A., McGuire, P. G., & Rangasamy, S. (2015). Diabetic Macular Edema: Pathophysiology and Novel Therapeutic Targets. *Ophthalmology*, 122(7), 1375-1394. doi:10.1016/j.ophtha.2015.03.024



- David, L., Feige, J. J., & Bailly, S. (2009). Emerging role of bone morphogenetic proteins in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev*, *20*(3), 203-212. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.05.001
- David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamande, N., Gasc, J. M., Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J. J., & Bailly, S. (2008). Bone morphogenetic protein-9 is a circulating vascular quiescence factor. *Circ Res*, *102*(8), 914-922. doi:10.1161/circresaha.107.165530
- David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J., & Bailly, S. (2007). Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of orphan activin receptor-like kinase 1 in endothelial cells. *Hemostasis, Thrombosis, and vascular biology*, *109*(5), 1953-1961. doi:10.1182/blood2006-07-034124
- de Guia, R. M., Rose, A. J., & Herzig, S. (2014). Glucocorticoid hormones and energy homeostasis. *Horm Mol Biol Clin Investig*, *19*(2), 117-128. doi:10.1515/hmbci-2014-0021
- Dejana, E., Orsenigo, F., & Lampugnani, M. G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*, *121*(13), 2115-2122. doi:10.1242/jcs.017897
- Di Lorenzo, A., Lin, M. I., Murata, T., Landskroner-Eiger, S., Schleicher, M., Kothiya, M., Iwakiri, Y., Yu, J., Huang, P. L., & Sessa, W. C. (2013). eNOS-derived nitric oxide regulates endothelial barrier function through VE-cadherin and Rho GTPases. *J Cell Sci*, *126*(Pt 24), 5541-5552. doi:10.1242/jcs.115972
- Diago, T., McCannel, C. A., Bakri, S. J., Pulido, J. S., Edwards, A. O., & Pach, J. M. (2009). Infectious endophthalmitis after intravitreal injection of antiangiogenic agents. *Retina*, *29*(5), 601-605. doi:10.1097/IAE.0b013e31819d2591
- Díaz-Coránguez, M., Ramos, C., & Antonetti, D. A. (2017). The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Research*, *139*, 123-137. doi:<https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.05.009>
- Dietze, G., Wicklmayr, M., Hepp, K. D., Bogner, W., Mehnert, H., Czempel, H., & Henftling, H. G. (1976). On gluconeogenesis of human liver. Accelerated hepatic glucose formation induced by increased precursor supply. *Diabetologia*, *12*(6), 555-561.
- Donaldson, C. J., Mathews, L. S., & Vale, W. W. (1992). Molecular cloning and binding properties of the human type II activin receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, *184*(1), 310-316.
- Donovan, K., Alekseev, O., Qi, X., Cho, W., & Azizkhan-Clifford, J. (2014). O-GlcNAc modification of transcription factor Sp1 mediates hyperglycemia-induced VEGF-A upregulation in retinal cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(12), 7862-7873. doi:10.1167/iovs.14-14048
- Duh, E. J., Sun, J. K., & Stitt, A. W. (2017). Diabetic retinopathy: current understanding, mechanisms, and treatment strategies. *JCI Insight*, *2*(14). doi:10.1172/jci.insight.93751
- Duran, W. N., Breslin, J. W., & Sanchez, F. A. (2010). The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. *Cardiovasc Res*, *87*(2), 254-261. doi:10.1093/cvr/cvq139

- Dyer, L. A., Pi, X., & Patterson, C. (2014). The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction. *Trends Endocrinol Metab*, 25(9), 472-480. doi:10.1016/j.tem.2014.05.003
- Ejaz, S., Chekarova, I., Ejaz, A., Sohail, A., & Lim, C. W. (2008). Importance of pericytes and mechanisms of pericyte loss during diabetes retinopathy. *Diabetes Obes Metab*, 10(1), 53-63. doi:10.1111/j.1463-1326.2007.00795.x
- Ekberg, K., Landau, B. R., Wajngot, A., Chandramouli, V., Efendic, S., Brunengraber, H., & Wahren, J. (1999). Contributions by kidney and liver to glucose production in the postabsorptive state and after 60 h of fasting. *Diabetes*, 48(2), 292-298.
- Ennequin, G., Boisseau, N., Caillaud, K., Chavanelle, V., Etienne, M., Li, X., & Sirvent, P. (2015). Neuregulin 1 Improves Glucose Tolerance in db/db Mice. *PLoS One*, 10(7), e0130568. doi:10.1371/journal.pone.0130568
- Erickson, G. F., & Shimasaki, S. (2003). The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol*, 1, 9.
- Erickson, K. K., Sundstrom, J. M., & Antonetti, D. A. (2007). Vascular permeability in ocular disease and the role of tight junctions. *Angiogenesis*, 10(2), 103-117. doi:10.1007/s10456-007-9067-z
- Esser, S., Lampugnani, M. G., Corada, M., Dejana, E., & Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine. *J Cell Sci*, 111(13), 1853-1865.
- Ewing, F. M., Deary, I. J., Strachan, M. W., & Frier, B. M. (1998). Seeing beyond retinopathy in diabetes: electrophysiological and psychophysical abnormalities and alterations in vision. *Endocr Rev*, 19(4), 462-476. doi:10.1210/edrv.19.4.0340
- Facchinello, N., Tarifeño-Saldivia, E., Grisan, E., Schiavone, M., Peron, M., Mongera, A., Ek, O., Schmitner, N., Meyer, D., Peers, B., Tiso, N., & Argenton, F. (2017). Tcf7l2 plays pleiotropic roles in the control of glucose homeostasis, pancreas morphology, vascularization and regeneration. *Scientific Reports*, 7, 9605. doi:10.1038/s41598-017-09867-x
- Falavarjani, K. G., & Nguyen, Q. D. (2013). Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye (Lond)*, 27(7), 787-794. doi:10.1038/eye.2013.107
- Falavarjani, K. G., & Nguyen, Q. D. (2013). Adverse events and complications associated with intravitreal injection of anti-VEGF agents: a review of literature. *Eye (Lond)*, 27(7), 787-794. doi:10.1038/eye.2013.107
- Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18(1), 4-25. doi:10.1210/edrv.18.1.0287
- Fletcher, E. L., Downie, L. E., Ly, A., Ward, M. M., Batcha, A. H., Puthussery, T., Yee, P., & Hatzopoulos, K. M. (2008). A review of the role of glial cells in understanding retinal disease. *Clin Exp Optom*, 91(1), 67-77. doi:10.1111/j.1444-0938.2007.00204.x
- Fletcher, E. L., Downie, L. E., Ly, A., Ward, M. M., Batcha, A. H., Puthussery, T., Yee, P., & Hatzopoulos, K. M. (2008). A review of the role of glial cells in understanding retinal disease. *Clinical and Experimental Optometry*, 91(1), 67-77. doi:doi:10.1111/j.1444-0938.2007.00204.x



- Fonsatti, E., Del Vecchio, L., Altomonte, M., Sigalotti, L., Nicotra, M. R., Coral, S., Natali, P. G., & Maio, M. (2001). Endoglin: An accessory component of the TGF-beta-binding receptor-complex with diagnostic, prognostic, and bioimmunotherapeutic potential in human malignancies. *J Cell Physiol*, *188*(1), 1-7. doi:10.1002/jcp.1095
- Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and cell biology*, *130*(1), 55-70. doi:10.1007/s00418-008-0424-9
- Frank, D. B., Lowery, J., Anderson, L., Brink, M., Reese, J., & de Caestecker, M. (2008). Increased susceptibility to hypoxic pulmonary hypertension in Bmpr2 mutant mice is associated with endothelial dysfunction in the pulmonary vasculature. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *294*(1), L98-109. doi:10.1152/ajplung.00034.2007
- Frank, R. N., & Glybina, I. (2017). Macular Edema ☆ *Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology*: Elsevier.
- Fu, S., Dong, S., Zhu, M., Sherry, D. M., Wang, C., You, Z., Haigh, J. J., & Le, Y. Z. (2015). Muller Glia Are a Major Cellular Source of Survival Signals for Retinal Neurons in Diabetes. *Diabetes*, *64*(10), 3554-3563. doi:10.2337/db15-0180
- Funatsu, H., Noma, H., Mimura, T., Eguchi, S., & Hori, S. (2009). Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema. *Ophthalmology*, *116*(1), 73-79. doi:10.1016/j.ophtha.2008.09.037
- Funatsu, H., Yamashita, H., Sakata, K., Noma, H., Mimura, T., Suzuki, M., Eguchi, S., & Hori, S. (2005). Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule 1 are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*, *112*(5), 806-816. doi:10.1016/j.ophtha.2004.11.045
- Furuse, M. (2009). Knockout animals and natural mutations as experimental and diagnostic tool for studying tight junction functions in vivo. *Biochim Biophys Acta*, *1788*(4), 813-819. doi:10.1016/j.bbamem.2008.07.017
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiragi, T., Fujimoto, K., & Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*, *141*(7), 1539-1550.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., & Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*, *123*(6 Pt 2), 1777-1788.
- Gaengel, K., Niaudet, C., Hagikura, K., Lavina, B., Muhl, L., Hofmann, J. J., Ebarasi, L., Nystrom, S., Rymo, S., Chen, L. L., Pang, M. F., Jin, Y., Raschperger, E., Roswall, P., Schulte, D., Benedito, R., Larsson, J., Hellstrom, M., Fuxe, J., Uhlen, P., Adams, R., Jakobsson, L., Majumdar, A., Vestweber, D., Uv, A., & Betsholtz, C. (2012). The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Dev Cell*, *23*(3), 587-599. doi:10.1016/j.devcel.2012.08.005
- Gambetta, M. C., & Müller, J. (2015). A critical perspective of the diverse roles of O-GlcNAc transferase in chromatin. *Chromosoma*, *124*(4), 429-442. doi:10.1007/s00412-015-0513-1
- Garrido-Martin, E. M., Blanco, F. J., Fernandez, L. A., Langa, C., Vary, C. P., Lee, U. E., Friedman, S. L., Botella, L. M., & Bernabeu, C. (2010). Characterization of the human Activin-A receptor type II-like kinase 1 (ACVRL1) promoter and its regulation by Sp1. *BMC Mol Biol*, *11*, 51. doi:10.1186/1471-2199-11-51

- Garrido-Martin, E. M., Nguyen, H. L., Cunningham, T. A., Choe, S. W., Jiang, Z., Arthur, H. M., Lee, Y. J., & Oh, S. P. (2014). Common and distinctive pathogenetic features of arteriovenous malformations in hereditary hemorrhagic telangiectasia 1 and hereditary hemorrhagic telangiectasia 2 animal models--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *34*(10), 2232-2236. doi:10.1161/atvbaha.114.303984
- Gavard, J. (2014). Endothelial permeability and VE-cadherin: a wacky comradeship. *Cell Adh Migr*, *8*(2), 158-164.
- Gavard, J., & Gutkind, J. S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat Cell Biol*, *8*(11), 1223-1234. doi:10.1038/ncb1486
- Ge, M., Du, C., Li, Z., Liu, Y., Xu, S., Zhang, L., & Pang, Q. (2017). Association of ACVRL1 Genetic Polymorphisms with Arteriovenous Malformations: A Case-Control Study and Meta-Analysis. *World Neurosurg*, *108*, 690-697. doi:10.1016/j.wneu.2017.09.047
- Geraldes, P., Hiraoka-Yamamoto, J., Matsumoto, M., Clermont, A., Leitges, M., Marette, A., Aiello, L. P., Kern, T. S., & King, G. L. (2009). Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med*, *15*(11), 1298-1306. doi:10.1038/nm.2052
- Gerich, J. E. (2001). Measurements of renal glucose release. *Diabetes*, *50*(4), 905.
- Gerich, J. E. (2010). Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabet Med*, *27*(2), 136-142. doi:10.1111/j.1464-5491.2009.02894.x
- Gerich, J. E., Meyer, C., Woerle, H. J., & Stumvoll, M. (2001). Renal Gluconeogenesis. *Its importance in human glucose homeostasis*, *24*(2), 382-391. doi:10.2337/diacare.24.2.382
- Giacco, F., & Brownlee, M. (2010). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, *107*(9), 1058-1070. doi:10.1161/circresaha.110.223545
- Giebel, S. J., Menicucci, G., McGuire, P. G., & Das, A. (2005). Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Lab Invest*, *85*(5), 597-607. doi:10.1038/labinvest.3700251
- Gille, H., Kowalski, J., Li, B., LeCouter, J., Moffat, B., Zioncheck, T. F., Pelletier, N., & Ferrara, N. (2001). Analysis of biological effects and signaling properties of Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). A reassessment using novel receptor-specific vascular endothelial growth factor mutants. *J Biol Chem*, *276*(5), 3222-3230. doi:10.1074/jbc.M002016200
- Gonzalez-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., & Jaramillo, B. E. (2003). Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol*, *81*(1), 1-44.
- Gonzalez-Nunez, M., Munoz-Felix, J., & JM., L.-N. (2013). The ALK-1/Smad1 pathway in cardiovascular physiopathology. A new target for therapy. *Biochim Biophys Acta*, *1832*(10), 1492-1410.
- Gory, S., Vernet, M., Laurent, M., Dejana, E., Dalmon, J., & Huber, P. (1999). The vascular endothelial-cadherin promoter directs endothelial-specific expression in transgenic mice. *Blood*, *93*(1), 184-192.

- Gougos, A., & Letarte, M. (1988). Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line. *J Immunol*, *141*(6), 1925-1933.
- Goumans, M. J., Valdimarsdottir, G., Itoh, S., Rosendahl, A., Sideras, P., & ten Dijke, P. (2002). Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *Embo j*, *21*(7), 1743-1753. doi:10.1093/emboj/21.7.1743
- Grant, S. F., Thorleifsson, G., Reynisdottir, I., Benediktsson, R., Manolescu, A., Sainz, J., Helgason, A., Stefansson, H., Emilsson, V., Helgadóttir, A., Styrkarsdóttir, U., Magnusson, K. P., Walters, G. B., Palsdóttir, E., Jonsdóttir, T., Gudmundsdóttir, T., Gylfason, A., Saemundsdóttir, J., Wilensky, R. L., Reilly, M. P., Rader, D. J., Bagger, Y., Christiansen, C., Gudnason, V., Sigurdsson, G., Thorsteinsdóttir, U., Gulcher, J. R., Kong, A., & Stefansson, K. (2006). Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*, *38*(3), 320-323. doi:10.1038/ng1732
- Gross, D. N., Wan, M., & Birnbaum, M. J. (2009). The role of FOXO in the regulation of metabolism. *Curr Diab Rep*, *9*(3), 208-214.
- Gundogan, F. C., Yolcu, U., Akay, F., Ilhan, A., Ozge, G., & Uzun, S. (2016). Diabetic Macular Edema. *Pak J Med Sci*, *32*(2), 505-510. doi:10.12669/pjms.322.8496
- Hammes, H.-P. (2013). Optimal treatment of diabetic retinopathy. *Ther Adv Endocrinol Metab*, *4*(2), 61-71. doi:10.1177/2042018813477886
- Hammes, H.-P., Du, X., Edelstein, D., Taguchi, T., Matsumura, T., Ju, Q., Lin, J., Bierhaus, A., Nawroth, P., Hannak, D., Neumaier, M., Bergfeld, R., Giardino, I., & Brownlee, M. (2003). Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nature Medicine*, *9*, 294. doi:10.1038/nm834
- Hammes, H.-P., Feng, Y., Pfister, F., & Brownlee, M. (2011). Diabetic retinopathy: targeting vasoregression. *Diabetes*, *60*(1), 9-16. doi:10.2337/db10-0454
- Han, H.-S., Kang, G., Kim, J. S., Choi, B. H., & Koo, S.-H. (2016). Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. *Experimental & Molecular Medicine*, *48*, e218. doi:10.1038/emm.2015.122
- Hanson, R. W., & Reshef, L. (1997). Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene expression. *Annu Rev Biochem*, *66*, 581-611. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.581
- Harhaj, N. S., Felinski, E. A., Wolpert, E. B., Sundstrom, J. M., Gardner, T. W., & Antonetti, D. A. (2006). VEGF activation of protein kinase C stimulates occludin phosphorylation and contributes to endothelial permeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *47*(11), 5106-5115. doi:10.1167/iovs.06-0322
- Harris, A. L., & Generali, D. (2014). Chapter 10 - Inhibitors of Tumor Angiogenesis. In S. Neidle (Ed.), *Cancer Drug Design and Discovery (Second Edition)* (pp. 275-317). San Diego: Academic Press.
- He, Z., Mitteer, R. A., Mou, Y., & Fan, Y. (2016). Chapter 5 - Multimodality Targeting of Glioma Cells *Glioblastoma* (pp. 55-72): Elsevier.
- Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., & Betsholtz, C. (2001). Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular

- Morphogenesis. *The Journal of Cell Biology*, 153(3), 543-554. doi:10.1083/jcb.153.3.543
- Hellström, M., Phng, L.-K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.-K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalén, M., Gerhardt, H., & Betsholtz, C. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 445, 776. doi:10.1038/nature05571
- <https://www.nature.com/articles/nature05571#supplementary-information>
- Herrera, B., Dooley, S., & Breitkopf-Heinlein, K. (2014). Potential roles of bone morphogenetic protein (BMP)-9 in human liver diseases. *Int J Mol Sci*, 15(4), 5199-5220. doi:10.3390/ijms15045199
- Hewat, E. A., Durmort, C., Jacquamet, L., Concord, E., & Gulino-Debrac, D. (2007). Architecture of the VE-cadherin hexamer. *J Mol Biol*, 365(3), 744-751. doi:10.1016/j.jmb.2006.10.052
- Hildebrand, G. D., & Fielder, A. R. (2011). Anatomy and Physiology of the Retina. In J. Reynolds & S. Olitsky (Eds.), *Pediatric Retina* (pp. 39-65). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Hirase, T., Staddon, J. M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., Itoh, M., Furuse, M., Fujimoto, K., Tsukita, S., & Rubin, L. L. (1997). Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci*, 110 ( Pt 14), 1603-1613.
- Holderfield, M. T., & Hughes, C. C. (2008). Crosstalk between vascular endothelial growth factor, notch, and transforming growth factor-beta in vascular morphogenesis. *Circ Res*, 102(6), 637-652. doi:10.1161/circresaha.107.167171
- Hombrebueno, J. R., Ali, I. H. A., Xu, H., & Chen, M. (2015). Sustained intraocular VEGF neutralization results in retinal neurodegeneration in the Ins2(Akita) diabetic mouse. *Scientific Reports*, 5, 18316-18316. doi:10.1038/srep18316
- Homme, R. P., Singh, M., Majumder, A., George, A. K., Nair, K., Sandhu, H. S., Tyagi, N., Lominadze, D., & Tyagi, S. C. (2018). Remodeling of Retinal Architecture in Diabetic Retinopathy: Disruption of Ocular Physiology and Visual Functions by Inflammatory Gene Products and Pyroptosis. *Frontiers in Physiology*, 9(1268). doi:10.3389/fphys.2018.01268
- Horowitz, M., Wishart, J. M., Jones, K. L., & Hebbard, G. S. (1996). Gastric emptying in diabetes: an overview. *Diabet Med*, 13(9 Suppl 5), S16-22.
- Hosokawa, M., Dolci, W., & Thorens, B. (2001). Differential sensitivity of GLUT1- and GLUT2-expressing beta cells to streptozotocin. *Biochem Biophys Res Commun*, 289(5), 1114-1117. doi:10.1006/bbrc.2001.6145
- Hosoya, K., & Tachikawa, M. (2012). The inner blood-retinal barrier: molecular structure and transport biology. *Adv Exp Med Biol*, 763, 85-104.
- Hsu, S. C., & Molday, R. S. (1991). Glycolytic enzymes and a GLUT-1 glucose transporter in the outer segments of rod and cone photoreceptor cells. *J Biol Chem*, 266(32), 21745-21752.
- Hu-Lowe, D. D., Chen, E., Zhang, L., Watson, K. D., Mancuso, P., Lappin, P., Wickman, G., Chen, J. H., Wang, J., Jiang, X., Amundson, K., Simon, R., Erbersdobler, A., Bergqvist, S., Feng, Z., Swanson, T. A., Simmons, B. H., Lippincott, J., Casperson, G. F., Levin, W. J.,

- Stampino, C. G., Shalinsky, D. R., Ferrara, K. W., Fiedler, W., & Bertolini, F. (2011). Targeting activin receptor-like kinase 1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis through a mechanism of action complementary to anti-VEGF therapies. *Cancer Res*, *71*(4), 1362-1373. doi:10.1158/0008-5472.can-10-1451
- Huang, H., Wang, W., Yang, G., Zhang, Y., Li, X., Liu, H., Zhang, L., Zheng, H., & Li, L. (2018). Circulating bone morphogenetic protein-9 levels are associated with hypertension and insulin resistance in humans. *J Am Soc Hypertens*, *12*(5), 372-380. doi:10.1016/j.jash.2018.02.007
- Illingworth, B. (1965). Enzymatic Defects as Causes of Hypoglycemia. *Diabetes*, *14*(6), 333-340. doi:10.2337/diab.14.6.333
- Itoh, S., & ten Dijke, P. (2007). Negative regulation of TGF- $\beta$  receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*, *19*(2), 176-184. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.015>
- Jackson, S. P., & Tjian, R. (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell*, *55*(1), 125-133.
- Jakobsson, L., Franco, C. A., Bentley, K., Collins, R. T., Ponsioen, B., Aspalter, I. M., Rosewell, I., Busse, M., Thurston, G., Medvinsky, A., Schulte-Merker, S., & Gerhardt, H. (2010). Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol*, *12*(10), 943-953. doi:10.1038/ncb2103
- Jarad, M., Kuczynski, E. A., Morrison, J., Vilorio-Petit, A. M., & Coomber, B. L. (2017). Release of endothelial cell associated VEGFR2 during TGF- $\beta$  modulated angiogenesis in vitro. *BMC Cell Biol*, *18*(1), 10. doi:10.1186/s12860-017-0127-y
- Jerkic, M., Rivas-Elena, J. V., Prieto, M., Carron, R., Sanz-Rodriguez, F., Perez-Barriocanal, F., Rodriguez-Barbero, A., Bernabeu, C., & Lopez-Novoa, J. M. (2004). Endoglin regulates nitric oxide-dependent vasodilatation. *Faseb j*, *18*(3), 609-611. doi:10.1096/fj.03-0197fje
- Johnson, D. W., Berg, J. N., Baldwin, M. A., Gallione, C. J., Marondel, I., Yoon, S. J., Stenzel, T. T., Speer, M., Pericak-Vance, M. A., Diamond, A., Guttmacher, A. E., Jackson, C. E., Attisano, L., Kucherlapati, R., Porteous, M. E., & Marchuk, D. A. (1996). Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2. *Nat Genet*, *13*(2), 189-195. doi:10.1038/ng0696-189
- Jonker, L., & Arthur, H. M. (2002). Endoglin expression in early development is associated with vasculogenesis and angiogenesis. *Mechanisms of Development*, *110*(1), 193-196. doi:[https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(01\)00562-7](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(01)00562-7)
- Kabadi, U. M. (1992). Is hepatic glycogen content a regulator of glucagon secretion? *Metabolism*, *41*(2), 113-115.
- Kabadi, U. M. (1993). Hepatic regulation of pancreatic  $\alpha$ -cell function. *Metabolism*, *42*(5), 535-543. doi:[https://doi.org/10.1016/0026-0495\(93\)90208-6](https://doi.org/10.1016/0026-0495(93)90208-6)
- Kaji, Y., Usui, T., Ishida, S., Yamashiro, K., Moore, T. C., Moore, J., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., & Adamis, A. P. (2007). Inhibition of diabetic leukostasis and blood-retinal barrier breakdown with a soluble form of a receptor for advanced glycation end products. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *48*(2), 858-865. doi:10.1167/iovs.06-0495
- Karpanen, T., & Alitalo, K. (2008). Molecular biology and pathology of lymphangiogenesis. *Annu Rev Pathol*, *3*, 367-397. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151515

- Kaufman, P. L., Alm, A., & Adler, F. H. (2003). *Adler's physiology of the eye : clinical application*. St. Louis: Toronto : Mosby.
- Kazuomi, N. (2010). Vascular Endothelial-Cadherin Stabilizes at Cell-Cell junctions by Anchoring to circumferential Actin Bundles through alpha and beta-catenins in Cyclic AMP-Epac-Rap1 Signal-activated Endothelial cells. *Mol Biol Cell*, *21*(4), 584-596.
- Ketema, E. B., & Kibret, K. T. (2015). Correlation of fasting and postprandial plasma glucose with HbA1c in assessing glycemic control; systematic review and meta-analysis. *Archives of public health = Archives belges de sante publique*, *73*, 43-43. doi:10.1186/s13690-015-0088-6
- Kevil, C. G., Okayama, N., Trocha, S. D., Kalogeris, T. J., Coe, L. L., Specian, R. D., Davis, C. P., & Alexander, J. S. (1998). Expression of zonula occludens and adherens junctional proteins in human venous and arterial endothelial cells: role of occludin in endothelial solute barriers. *Microcirculation*, *5*(2-3), 197-210.
- Kim, C. W., Song, H., Kumar, S., Nam, D., Kwon, H. S., Chang, K. H., Son, D. J., Kang, D. W., Brodie, S. A., Weiss, D., Vega, J. D., Alberts-Grill, N., Griendling, K., Taylor, W. R., & Jo, H. (2013). Anti-inflammatory and antiatherogenic role of BMP receptor II in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *33*(6), 1350-1359. doi:10.1161/atvbaha.112.300287
- Kim, J., Lee, Y. M., Kim, C. S., Sohn, E., Jo, K., Shin, S. D., & Kim, J. S. (2013). Ethyl pyruvate prevents methylglyoxal-induced retinal vascular injury in rats. *J Diabetes Res*, *2013*, 460820. doi:10.1155/2013/460820
- Kim, J. H., Kim, J. H., Park, J. A., Lee, S. W., Kim, W. J., Yu, Y. S., & Kim, K. W. (2006). Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol*, *39*(4), 339-345.
- Kim, M., & Choe, S. (2011). BMPs and their clinical potentials. *BMB Rep*, *44*(10), 619-634. doi:10.5483/BMBRep.2011.44.10.619
- Kinote, A., Faria, J. A., Roman, E. A., Solon, C., Razolli, D. S., Ignacio-Souza, L. M., Sollon, C. S., Nascimento, L. F., de Araujo, T. M., Barbosa, A. P., Lellis-Santos, C., Velloso, L. A., Bordin, S., & Anhe, G. F. (2012). Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels. *Endocrinology*, *153*(8), 3633-3645. doi:10.1210/en.2012-1341
- Kitada, M., Zhang, Z., Mima, A., & King, G. L. (2010). Molecular mechanisms of diabetic vascular complications. *Journal of diabetes investigation*, *1*(3), 77-89. doi:10.1111/j.2040-1124.2010.00018.x
- Klaassen, I., Van Noorden, C. J., & Schlingemann, R. O. (2013). Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Prog Retin Eye Res*, *34*, 19-48. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.02.001
- Knels, L., Worm, M., Wendel, M., Roehlecke, C., Kniep, E., & Funk, R. H. (2008). Effects of advanced glycation end products-inductor glyoxal and hydrogen peroxide as oxidative stress factors on rat retinal organ cultures and neuroprotection by UK-14,304. *J Neurochem*, *106*(4), 1876-1887. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05540.x
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., & Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *437*(2), 169-183. doi:10.1042/BJ20110301 %J Biochemical Journal

- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., & Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J*, 437(2), 169-183. doi:10.1042/bj20110301
- Kolluru, G. K., Bir, S. C., & Kevil, C. G. (2012). Endothelial Dysfunction and Diabetes: Effects on Angiogenesis, Vascular Remodeling, and Wound Healing. *International Journal of Vascular Medicine*, 2012, 30. doi:10.1155/2012/918267
- Komarova, Y. A., Huang, F., Geyer, M., Daneshjou, N., Garcia, A., Idalino, L., Kreutz, B., Mehta, D., & Malik, A. B. (2012). VE-cadherin signaling induces EB3 phosphorylation to suppress microtubule growth and assemble adherens junctions. *Mol Cell*, 48(6), 914-925. doi:10.1016/j.molcel.2012.10.011
- Komarova Yulia, A., Kruse, K., Mehta, D., & Malik Asrar, B. (2017). Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circulation Research*, 120(1), 179-206. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.306534
- Koyanagi, Y., Yoshida, S., Kobayashi, Y., Kubo, Y., Nakama, T., Ishikawa, K., Nakao, S., Hisatomi, T., Ikeda, Y., Oshima, Y., Ishibashi, T., & Sonoda, K. H. (2018). Visual Outcomes Based on Early Response to Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment for Diabetic Macular Edema. *Ophthalmologica*, 239(2-3), 94-102. doi:10.1159/000481711
- Kraehling, J. R., Chidlow, J. H., Rajagopal, C., Sugiyama, M. G., Fowler, J. W., Lee, M. Y., Zhang, X., Ramirez, C. M., Park, E. J., Tao, B., Chen, K., Kuruvilla, L., Larrivee, B., Folta-Stogniew, E., Ola, R., Rotllan, N., Zhou, W., Nagle, M. W., Herz, J., Williams, K. J., Eichmann, A., Lee, W. L., Fernandez-Hernando, C., & Sessa, W. C. (2016). Genome-wide RNAi screen reveals ALK1 mediates LDL uptake and transcytosis in endothelial cells. *Nat Commun*, 7, 13516. doi:10.1038/ncomms13516
- Kumagai, A. K. (1999). Glucose transport in brain and retina: implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 15(4), 261-273. doi:doi:10.1002/(SICI)1520-7560(199907/08)15:4<261::AID-DMRR43>3.0.CO;2-Z
- Kumagai, A. K., Glasgow, B. J., & Pardridge, W. M. (1994). GLUT1 glucose transporter expression in the diabetic and nondiabetic human eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 35(6), 2887-2894.
- Kumar, S., Pan, C. C., Bloodworth, J. C., Nixon, A. B., Theuer, C., Hoyt, D. G., & Lee, N. Y. (2014). Antibody-directed coupling of endoglin and MMP-14 is a key mechanism for endoglin shedding and deregulation of TGF-beta signaling. *Oncogene*, 33(30), 3970-3979. doi:10.1038/onc.2013.386
- Kurebayashi, Y., Baba, Y., Minowa, A., Nadya, N. A., Azuma, M., Yoshimura, A., Koyasu, S., & Nagai, S. (2016). TGF-beta-induced phosphorylation of Akt and Foxo transcription factors negatively regulates induced regulatory T cell differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*, 480(1), 114-119. doi:10.1016/j.bbrc.2016.09.153
- Kuwabara, H., Kokai, Y., Kojima, T., Takakuwa, R., Mori, M., & Sawada, N. (2001). Occludin regulates actin cytoskeleton in endothelial cells. *Cell Struct Funct*, 26(2), 109-116.
- Kuwabara, T., & Cogan, D. G. (1963). Retinal vascular patterns. VI. Mural cells of the retinal capillaries. *Arch Ophthalmol*, 69, 492-502.



- Lamouille, S., Mallet, C., Feige, J. J., & Bailly, S. (2002). Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis. *Blood*, *100*(13), 4495-4501. doi:10.1182/blood.V100.13.4495
- Lamplot, J. D., Qin, J., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., Tomal, J., Li, R., Shui, W., Zhang, H., Kim, S. H., Zhang, W., Zhang, J., Kong, Y., Denduluri, S., Rogers, M. R., Pratt, A., Haydon, R. C., Luu, H. H., Angeles, J., Shi, L. L., & He, T. C. (2013). BMP9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. *Am J Stem Cells*, *2*(1), 1-21.
- Lampugnani, M. G., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B., & Dejana, E. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *J Cell Biol*, *129*(1), 203-217.
- Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C., & Dejana, E. (2006). Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments. *The Journal of Cell Biology*, *174*(4), 593-604. doi:10.1083/jcb.200602080
- Lampugnani, M. G., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., Orsenigo, F., Cattelino, A., Kemler, R., Daniel, T. O., & Dejana, E. (2003). Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin,  $\beta$ -catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *The Journal of Cell Biology*, *161*(4), 793-804. doi:10.1083/jcb.200209019
- Landau, B. R., Wahren, J., Chandramouli, V., Schumann, W. C., Ekberg, K., & Kalhan, S. C. (1996). Contributions of gluconeogenesis to glucose production in the fasted state. *J Clin Invest*, *98*(2), 378-385. doi:10.1172/jci118803
- Larger, E., Lemoine, A. Y., & Faucher, P. (2015). Mémoire métabolique : Comment l'expliquer ? Quelles sont les preuves ? *Médecine des Maladies Métaboliques*, *9*(1), 36-44. doi:[https://doi.org/10.1016/S1957-2557\(15\)30008-0](https://doi.org/10.1016/S1957-2557(15)30008-0)
- Larrivee, B., Prahst, C., Gordon, E., del Toro, R., Mathivet, T., Duarte, A., Simons, M., & Eichmann, A. (2012). ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway. *Dev Cell*, *22*(3), 489-500. doi:10.1016/j.devcel.2012.02.005
- Lautt, W. W. (1999). The HISS story overview: a novel hepatic neurohumoral regulation of peripheral insulin sensitivity in health and diabetes. *Can J Physiol Pharmacol*, *77*(8), 553-562.
- Lautt, W. W. (2007). Postprandial insulin resistance as an early predictor of cardiovascular risk. *Ther Clin Risk Manag*, *3*(5), 761-770.
- Lauzon, M. A., Drevelle, O., Daviau, A., & Faucheux, N. (2016). Effects of BMP-9 and BMP-2 on the PI3K/Akt Pathway in MC3T3-E1 Preosteoblasts. *Tissue Eng Part A*, *22*(17-18), 1075-1085. doi:10.1089/ten.TEA.2016.0151
- Leblanc, E., Drouin, G., Grenier, G., Faucheux, N., & Hamdy, R. (2013). From skeletal to non skeletal: The intriguing roles of BMP-9: A literature review %J Advances in Bioscience and Biotechnology. *Vol.04No.10*, 16. doi:10.4236/abb.2013.410A4004
- Leblanc, E., Drouin, G., Grenier, G., Faucheux, N., Hamdy, R. (2013). From skeletal to non skeletal: The intriguing roles of BMP-9: A literature Review. *Advances in Biosciences and Biotechnology*, *4*, 31-46. doi:10.4236/abb.2013.410A4004
- Lebrin, F., Goumans, M. J., Jonker, L., Carvalho, R. L., Valdimarsdottir, G., Thorikay, M., Mummery, C., Arthur, H. M., & ten Dijke, P. (2004). Endoglin promotes endothelial



- cell proliferation and TGF-beta/ALK1 signal transduction. *Embo j*, 23(20), 4018-4028. doi:10.1038/sj.emboj.7600386
- Lechner, J., O'Leary, O. E., & Stitt, A. W. (2017). The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Res*, 139, 7-14. doi:10.1016/j.visres.2017.04.003
- Lee, R., Wong, T. Y., & Sabanayagam, C. (2015). Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss. *Eye and Vision*, 2(1), 17. doi:10.1186/s40662-015-0026-2
- Lee, W. J., Kang, M. H., Seong, M., & Cho, H. Y. (2012). Comparison of aqueous concentrations of angiogenic and inflammatory cytokines in diabetic macular oedema and macular oedema due to branch retinal vein occlusion. *Br J Ophthalmol*, 96(11), 1426-1430. doi:10.1136/bjophthalmol-2012-301913
- Lembong, J., Yakoby, N., & Shvartsman, S. Y. (2008). Spatial regulation of BMP signaling by patterned receptor expression. *Tissue Eng Part A*, 14(9), 1469-1477. doi:10.1089/ten.tea.2008.0098
- Leslie, R. D. (1993). Metabolic changes in diabetes. *Eye (Lond)*, 7 ( Pt 2), 205-208. doi:10.1038/eye.1993.49
- Levet, S. (2013). *BMP9 et BMP10 dans le remodelage vasculaire périnatal*. (Doctorat), Université de Grenoble. (NNT:2013GRENV037. tel-01062446)
- Li, B., Yin, W., Hong, X., Shi, Y., Wang, H. S., Lin, S. F., & Tang, S. B. (2008). Remodeling retinal neovascularization by ALK1 gene transfection in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(10), 4553-4560. doi:10.1167/iovs.07-0995
- Li, F., Lan, Y., Wang, Y., Wang, J., Yang, G., Meng, F., Han, H., Meng, A., Wang, Y., & Yang, X. (2011). Endothelial Smad4 Maintains Cerebrovascular Integrity by Activating N-Cadherin through Cooperation with Notch. *Dev Cell*, 20(3), 291-302. doi:<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.01.011>
- Lin, Y., & Sun, Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *J Endocrinol*, 204(1), 1-11. doi:10.1677/JOE-09-0260
- Lin, Y., & Sun, Z. (2010). Current views on type 2 diabetes. *J Endocrinol*, 204(1), 1-11. doi:10.1677/joe-09-0260
- Liu, C.-H., Wang, Z., Sun, Y., & Chen, J. (2017). Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies. *Faseb j*, 31(11), 4665-4681. doi:10.1096/fj.201700336R
- Liu, F., Koval, M., Ranganathan, S., Fanayan, S., Hancock, W. S., Lundberg, E. K., Beavis, R. C., Lane, L., Duek, P., McQuade, L., Kelleher, N. L., & Baker, M. S. (2016). Systems Proteomics View of the Endogenous Human Claudin Protein Family. *J Proteome Res*, 15(2), 339-359. doi:10.1021/acs.jproteome.5b00769
- Lobov, I. B., Renard, R. A., Papadopoulos, N., Gale, N. W., Thurston, G., Yancopoulos, G. D., & Wiegand, S. J. (2007). Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9), 3219-3224. doi:10.1073/pnas.0611206104
- Loriaux, D. L. (2006). Diabetes and The Ebers Papyrus: 1552 B.C. *The Endocrinologist*, 16(2), 55-56 10.1097/1001.ten.0000202534.0000283446.0000202569.
- Lowery, J. W., & de Caestecker, M. P. (2010). BMP signaling in vascular development and disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21(4), 287-298. doi:10.1016/j.cytogfr.2010.06.001

- Lu, M., Wan, M., Leavens, K. F., Chu, Q., Monks, B. R., Fernandez, S., Ahima, R. S., Ueki, K., Kahn, C. R., & Birnbaum, M. J. (2012). Insulin regulates liver metabolism in vivo in the absence of hepatic Akt and Foxo1. *Nat Med*, *18*(3), 388-395. doi:10.1038/nm.2686
- Luo, X., Wu, J., Jing, S., & Yan, L. J. (2016). Hyperglycemic Stress and Carbon Stress in Diabetic Glucotoxicity. *Aging Dis*, *7*(1), 90-110. doi:10.14336/ad.2015.0702
- Luo, Y., Li, L., Xu, X., Wu, T., Yang, M., Zhang, C., Mou, H., Zhou, T., Jia, Y., Cai, C., Liu, H., Yang, G., & Zhang, X. (2017). Decreased circulating BMP-9 levels in patients with Type 2 diabetes is a signature of insulin resistance. *131*(3), 239-246. doi:10.1042/CS20160543 %J Clinical Science
- Luo, Y., Xiao, W., Zhu, X., Mao, Y., Liu, X., Chen, X., Huang, J., Tang, S., & Rizzolo, L. J. (2011). Differential expression of claudins in retinas during normal development and the angiogenesis of oxygen-induced retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *52*(10), 7556-7564. doi:10.1167/iovs.11-7185
- Luscher, T. F., Creager, M. A., Beckman, J. A., & Cosentino, F. (2003). Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *Circulation*, *108*(13), 1655-1661. doi:10.1161/01.cir.0000089189.70578.e2
- Lux, A., Attisano, L., & Marchuk, D. A. (1999). Assignment of transforming growth factor beta1 and beta3 and a third new ligand to the type I receptor ALK-1. *J Biol Chem*, *274*(15), 9984-9992.
- Machado, R. D., Aldred, M. A., James, V., Harrison, R. E., Patel, B., Schwalbe, E. C., Gruenig, E., Janssen, B., Koehler, R., Seeger, W., Eickelberg, O., Olschewski, H., Gregory Elliott, C., Glissmeyer, E., Carlquist, J., Kim, M., Torbicki, A., Fijalkowska, A., Szewczyk, G., Parma, J., Abramowicz, M. J., Galie, N., Morisaki, H., Kyotani, S., Nakanishi, N., Morisaki, T., Humbert, M., Simonneau, G., Sitbon, O., Soubrier, F., Coulet, F., Morrell, N. W., & Trembath, R. C. (2006). Mutations of the TGF- $\beta$  type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Human Mutation*, *27*(2), 121-132. doi:doi:10.1002/humu.20285
- Madamanchi, N. R., & Runge, M. S. (2007). Mitochondrial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation Research*, *100*(4), 460-473. doi:10.1161/01.res.0000258450.44413.96
- Madamanchi, N. R., Vendrov, A., & Runge, M. S. (2005). Oxidative Stress and Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *25*(1), 29-38. doi:10.1161/01.atv.0000150649.39934.13
- Mannu, G. S. (2014). Retinal phototransduction. *Neurosciences (Riyadh)*, *19*(4), 275-280.
- Marc, R. E. (2008). CHAPTER 122 Functional Anatomy of the Neural Retina *Albert & Jakobiec's Principles & Practice of Ophthalmology* (pp. 1565-1592).
- Marmor, M. F. (1999). Mechanisms of fluid accumulation in retinal edema. *Doc Ophthalmol*, *97*(3-4), 239-249.
- Masharani, U. (2019). Diabetes Mellitus & Hypoglycemia. In M. A. Papadakis, S. J. McPhee, & M. W. Rabow (Eds.), *Current Medical Diagnosis & Treatment 2019*. New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, *67*, 753-791. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.753

- Matsuda, S., Fujita, T., Kajiya, M., Kashiwai, K., Takeda, K., Shiba, H., & Kurihara, H. (2015). Brain-derived neurotrophic factor prevents the endothelial barrier dysfunction induced by interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Journal of Periodontal Research*, 50(4), 444-451. doi:doi:10.1111/jre.12226
- Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K., & Fukamizu, A. (2003). Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(20), 11285-11290. doi:10.1073/pnas.1934283100
- Mayeur, C., Lohmeyer, L. K., Leyton, P., Kao, S. M., Pappas, A. E., Kolodziej, S. A., Spagnolli, E., Yu, B., Galdos, R. L., Yu, P. B., Peterson, R. T., Bloch, D. B., Bloch, K. D., & Steinbicker, A. U. (2014). The type I BMP receptor Alk3 is required for the induction of hepatic hepcidin gene expression by interleukin-6. *Blood*, 123(14), 2261-2268. doi:10.1182/blood-2013-02-480095
- McAllister, K. A., Grogg, K. M., Johnson, D. W., Gallione, C. J., Baldwin, M. A., Jackson, C. E., Helmbold, E. A., Markel, D. S., McKinnon, W. C., Murrell, J., & et al. (1994). Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet*, 8(4), 345-351. doi:10.1038/ng1294-345
- McCarthy, K. M., Skare, I. B., Stankewich, M. C., Furuse, M., Tsukita, S., Rogers, R. A., Lynch, R. D., & Schneeberger, E. E. (1996). Occludin is a functional component of the tight junction. *J Cell Sci*, 109 ( Pt 9), 2287-2298.
- McKay, L. (2003). Pharmacologic effects of corticosteroids. In D. Kufe (Ed.), *Holland-Frei Cancer Medicine*. Hamilton Ontario: BC Decker.
- Mehta, D., & Malik, A. B. (2006). Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*, 86(1), 279-367. doi:10.1152/physrev.00012.2005
- Mi, L. Z., Brown, C. T., Gao, Y., Tian, Y., Le, V. Q., Walz, T., & Springer, T. A. (2015). Structure of bone morphogenetic protein 9 procomplex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(12), 3710-3715. doi:10.1073/pnas.1501303112
- Miller, A. F., Harvey, S. A., Thies, R. S., & Olson, M. S. (2000). Bone morphogenetic protein-9. An autocrine/paracrine cytokine in the liver. *J Biol Chem*, 275(24), 17937-17945.
- Mitchell, D., Pobre, E. G., Mulivor, A. W., Grinberg, A. V., Castonguay, R., Monnell, T. E., Solban, N., Ucran, J. A., Pearsall, R. S., Underwood, K. W., Seehra, J., & Kumar, R. (2010). ALK1-Fc Inhibits Multiple Mediators of Angiogenesis and Suppresses Tumor Growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1535-7163.MCT-1509-0650. doi:10.1158/1535-7163.mct-09-0650
- Moran, E. P., Wang, Z., Chen, J., Sapieha, P., Smith, L. E. H., & Ma, J.-X. (2016). Neurovascular cross talk in diabetic retinopathy: Pathophysiological roles and therapeutic implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 311(3), H738-H749. doi:10.1152/ajpheart.00005.2016
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, K., Furuse, M., Tsukita, S., & Miyachi, Y. (2003). Expression of claudin-5 in dermal vascular endothelia. *Exp Dermatol*, 12(3), 289-295.
- Morita, K., Sasaki, H., Furuse, M., & Tsukita, S. (1999). Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol*, 147(1), 185-194.
- Mueller, T. D., & Nickel, J. (2012). Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett*, 586(14), 1846-1859. doi:<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2012.02.043>

- Murakami, T., Felinski, E. A., & Antonetti, D. A. (2009). Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability. *J Biol Chem*, *284*(31), 21036-21046. doi:10.1074/jbc.M109.016766
- Murakami, T., Frey, T., Lin, C., & Antonetti, D. A. (2012). Protein kinase c beta phosphorylates occludin regulating tight junction trafficking in vascular endothelial growth factor-induced permeability in vivo. *Diabetes*, *61*(6), 1573-1583. doi:10.2337/db11-1367
- Musat, O., Cernat, C., Labib, M., Gheorghe, A., Toma, O., Zamfir, M., & Boureanu, A. M. (2015). DIABETIC MACULAR EDEMA. *Romanian journal of ophthalmology*, *59*(3), 133-136.
- Nagy, J. A. (2008). Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*, *11*(2), 109-119.
- Nakae, J., Kitamura, T., Silver, D. L., & Accili, D. (2001). The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest*, *108*(9), 1359-1367. doi:10.1172/JCI12876
- Nakao, S., Yoshida, S., Enaida, H., & Ishibashi, T. (2012). [Molecular targeting therapy for diabetic retinopathy]. *Nihon Rinsho*, *70 Suppl 8*, 628-646.
- Nathan, D. M., Genuth, S., Lachin, J., Cleary, P., Crofford, O., Davis, M., Rand, L., & Siebert, C. (1993). 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*, *329*(14), 977-986. doi:10.1056/nejm199309303291401
- Navaratna, D., McGuire, P. G., Menicucci, G., & Das, A. (2007). Proteolytic degradation of VE-cadherin alters the blood-retinal barrier in diabetes. *Diabetes*, *56*(9), 2380-2387. doi:10.2337/db06-1694
- Navarro, P., Caveda, L., Breviario, F., Mândoteanu, I., Lampugnani, M.-G., & Dejana, E. (1995). Catenin-dependent and -independent Functions of Vascular Endothelial Cadherin. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(52), 30965-30972. doi:10.1074/jbc.270.52.30965
- Nentwich, M. M., & Ulbig, M. W. (2015). Diabetic retinopathy - ocular complications of diabetes mellitus. *World J Diabetes*, *6*(3), 489-499. doi:10.4239/wjd.v6.i3.489
- Nielsen, M. S., Axelsen, L. N., Sorgen, P. L., Verma, V., Delmar, M., & Holstein-Rathlou, N.-H. (2012). Gap junctions. *Compr Physiol*, *2*(3), 1981-2035. doi:10.1002/cphy.c110051
- Nishijima, K., Ng, Y. S., Zhong, L., Bradley, J., Schubert, W., Jo, N., Akita, J., Samuelsson, S. J., Robinson, G. S., Adamis, A. P., & Shima, D. T. (2007). Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuroprotectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol*, *171*(1), 53-67. doi:10.2353/ajpath.2007.061237
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., & Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol*, *161*(3), 653-660. doi:10.1083/jcb.200302070
- Niven, J. E., & Laughlin, S. B. (2008). Energy limitation as a selective pressure on the evolution of sensory systems. *J Exp Biol*, *211*(Pt 11), 1792-1804. doi:10.1242/jeb.017574
- Nolan-Stevaux, O., Zhong, W., Culp, S., Shaffer, K., Hoover, J., Wickramasinghe, D., & Ruefli-Brasse, A. (2012). Endoglin requirement for BMP9 signaling in endothelial cells

- reveals new mechanism of action for selective anti-endoglin antibodies. *PLoS One*, 7(12), e50920. doi:10.1371/journal.pone.0050920
- Norris, S., Lee, N.J., Severance, S. (2008). *Drug Class Review: Newer Drugs for the Treatment of Diabetes Mellitus: Final Report [Internet]*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10605/>
- Ntumba, K., Akla, N., Oh, S. P., Eichmann, A., & Larrivée, B. (2016). BMP9/ALK1 inhibits neovascularization in mouse models of age-related macular degeneration. *Oncotarget*, 7(35), 55957-55969. doi:10.18632/oncotarget.11182
- Oh, K. J., Han, H. S., Kim, M. J., & Koo, S. H. (2013). CREB and FoxO1: two transcription factors for the regulation of hepatic gluconeogenesis. *BMB Rep*, 46(12), 567-574.
- Oh, S. P., Seki, T., Goss, K. A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P. K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S., & Li, E. (2000). Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(6), 2626-2631. doi:10.1073/pnas.97.6.2626
- Okamoto, T., Yamagishi, S., Inagaki, Y., Amano, S., Koga, K., Abe, R., Takeuchi, M., Ohno, S., Yoshimura, A., & Makita, Z. (2002). Angiogenesis induced by advanced glycation end products and its prevention by cerivastatin. *Faseb j*, 16(14), 1928-1930. doi:10.1096/fj.02-0030fje
- Ola, M. S., Nawaz, M. I., Siddiquei, M. M., Al-Amro, S., & Abu El-Asrar, A. M. (2012). Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes and its Complications*, 26(1), 56-64. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2011.11.004>
- Ola, R., Dubrac, A., Han, J., Zhang, F., Fang, J. S., Larrivée, B., Lee, M., Urarte, A. A., Kraehling, J. R., Genet, G., Hirschi, K. K., Sessa, W. C., Canals, F. V., Graupera, M., Yan, M., Young, L. H., Oh, P. S., & Eichmann, A. (2016). PI3 kinase inhibition improves vascular malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nat Commun*, 7, 13650. doi:10.1038/ncomms13650
- Opherk, C., Tronche, F., Kellendonk, C., Kohlmuller, D., Schulze, A., Schmid, W., & Schutz, G. (2004). Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol*, 18(6), 1346-1353. doi:10.1210/me.2003-0283
- Osaadon, P., Fagan, X. J., Lifshitz, T., & Levy, J. (2014). A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. *Eye*, 28, 510. doi:10.1038/eye.2014.13
- Oshervich, L. (2011). Inositol insulin insight. *SciBX*, 4(1).
- OSullivan, I., Zhang, W., Wasserman, D. H., Liew, C. W., Liu, J., Paik, J., DePinho, R. A., Stolz, D. B., Kahn, C. R., Schwartz, M. W., & Unterman, T. G. (2015). FoxO1 integrates direct and indirect effects of insulin on hepatic glucose production and glucose utilization. *Nat Commun*, 6, 7079. doi:10.1038/ncomms8079
- Ota, T., Fujii, M., Sugizaki, T., Ishii, M., Miyazawa, K., Aburatani, H., & Miyazono, K. (2002). Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor- $\beta$  in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol*, 193(3), 299-318. doi:doi:10.1002/jcp.10170
- Ouarne, M., Bouvard, C., Boneva, G., Mallet, C., Ribeiro, J., Desroches-Castan, A., Soleilhac, E., Tillet, E., Peyruchaud, O., & Bailly, S. (2018). BMP9, but not BMP10, acts as a quiescence factor on tumor growth, vessel normalization and metastasis in a

- mouse model of breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1), 209. doi:10.1186/s13046-018-0885-1
- Palczewski, K. (2014). Chemistry and biology of the initial steps in vision: the Friedenwald lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 55(10), 6651-6672. doi:10.1167/iovs.14-15502
- Palimeri, S., Palioura, E., & Diamanti-Kandarakis, E. (2015). Current perspectives on the health risks associated with the consumption of advanced glycation end products: recommendations for dietary management. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 8, 415-426. doi:10.2147/dmso.s63089
- Panchenko, M. P., Williams, M. C., Brody, J. S., & Yu, Q. (1996). Type I receptor serine-threonine kinase preferentially expressed in pulmonary blood vessels. *Am J Physiol*, 270(4 Pt 1), L547-558. doi:10.1152/ajplung.1996.270.4.L547
- Paolinelli, R., Corada, M., Ferrarini, L., Devraj, K., Artus, C., Czupalla, C. J., Rudini, N., Maddaluno, L., Papa, E., Engelhardt, B., Couraud, P. O., Liebner, S., & Dejana, E. (2013). Wnt activation of immortalized brain endothelial cells as a tool for generating a standardized model of the blood brain barrier in vitro. *PLoS One*, 8(8), e70233. doi:10.1371/journal.pone.0070233
- Paralkar, V. M., Vail, A. L., Grasser, W. A., Brown, T. A., Xu, H., Vukicevic, S., Ke, H. Z., Qi, H., Owen, T. A., & Thompson, D. D. (1998). Cloning and characterization of a novel member of the transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein family. *J Biol Chem*, 273(22), 13760-13767.
- Pardridge, W. M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRX*, 2(1), 3-14. doi:10.1602/neurorx.2.1.3
- Park, D. Y., Lee, J., Kim, J., Kim, K., Hong, S., Han, S., Kubota, Y., Augustin, H. G., Ding, L., Kim, J. W., Kim, H., He, Y., Adams, R. H., & Koh, G. Y. (2017). Plastic roles of pericytes in the blood-retinal barrier. *Nat Commun*, 8, 15296-15296. doi:10.1038/ncomms15296
- Park, S. O., Wankhede, M., Lee, Y. J., Choi, E. J., Fliess, N., Choe, S. W., Oh, S. H., Walter, G., Raizada, M. K., Sorg, B. S., & Oh, S. P. (2009). Real-time imaging of de novo arteriovenous malformation in a mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *J Clin Invest*, 119(11), 3487-3496. doi:10.1172/jci39482
- Parodi Battaglia, M., Iacono, P., Cascavilla, M., Zucchiatti, I., & Bandello, F. (2018). A Pathogenetic Classification of Diabetic Macular Edema. *Ophthalmic Research*, 60(1), 23-28. doi:10.1159/000484350
- Peng, H., Luo, P., Li, Y., Wang, C., Liu, X., Ye, Z., Li, C., & Lou, T. (2013). Simvastatin alleviates hyperpermeability of glomerular endothelial cells in early-stage diabetic nephropathy by inhibition of RhoA/ROCK1. *PLoS One*, 8(11), e80009. doi:10.1371/journal.pone.0080009
- PHAC. (2011). Diabetes in Canada: Facts and figures from a public health perspective. Ottawa, Ont.: Public Health Agency of Canada. Ottawa, Ont, Public Health Agency of Canada. *Public Health Agency of Canada*, <http://www.phac-aspc.gc.ca/cd-mc/publications/diabetes-diabete/facts-figures-faits-chiffres-2011/index-eng.php>.
- Pilkis, S. J., & Granner, D. K. (1992). Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol*, 54, 885-909. doi:10.1146/annurev.ph.54.030192.004321



- Popov, D. (2010). Endothelial cell dysfunction in hyperglycemia: Phenotypic change, intracellular signaling modification, ultrastructural alteration, and potential clinical outcomes. *International Journal of Diabetes Mellitus*, 2(3), 189-195. doi:10.1016/j.ijdm.2010.09.002
- Potter, M. D., Barbero, S., & Cheresch, D. A. (2005). Tyrosine phosphorylation of VE-cadherin prevents binding of p120- and beta-catenin and maintains the cellular mesenchymal state. *J Biol Chem*, 280(36), 31906-31912. doi:10.1074/jbc.M505568200
- Pournaras, C. J., Rungger-Brandle, E., Riva, C. E., Hardarson, S. H., & Stefansson, E. (2008). Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res*, 27(3), 284-330. doi:10.1016/j.preteyeres.2008.02.002
- Prandini, M. H., Dreher, I., Bouillot, S., Benkerri, S., Moll, T., & Huber, P. (2005). The human VE-cadherin promoter is subjected to organ-specific regulation and is activated in tumour angiogenesis. *Oncogene*, 24(18), 2992-3001. doi:10.1038/sj.onc.1208483
- Pries, A. R., & Kuebler, W. M. (2006). Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*(176 Pt 1), 1-40.
- Purves, D., Augustine, G. J., & Fitzpatrick, D. (2001). The Retina. In I. sinauer Associates (Ed.), *Neuroscience* (2001 ed., Vol. 2001).
- Rahimi, N. (2017). Defenders and Challengers of Endothelial Barrier Function. *Front Immunol*, 8, 1847. doi:10.3389/fimmu.2017.01847
- Ramel, M.-C., & Hill, C. S. (2012). Spatial regulation of BMP activity. *586*(14), 1929-1941. doi:doi:10.1016/j.febslet.2012.02.035
- Rangasamy, S., Srinivasan, R., Maestas, J., McGuire, P. G., & Das, A. (2011). A potential role for angiopoietin 2 in the regulation of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(6), 3784-3791. doi:10.1167/iovs.10-6386
- Rask-Madsen, C., & King, G. L. (2013). Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab*, 17(1), 20-33. doi:10.1016/j.cmet.2012.11.012
- Rask-Madsen, C., & King, George L. (2013). Vascular Complications of Diabetes: Mechanisms of Injury and Protective Factors. *Cell Metabolism*, 17(1), 20-33. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2012.11.012>
- Remington, L. A. (2012). Chapter 4 - Retina. In L. A. Remington (Ed.), *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (Third Edition)* (pp. 61-92). Saint Louis: Butterworth-Heinemann.
- Ricard, N. (2013). *ALK1 & BMP9 dans le remodelage vasculaire: de la génétique humaine aux modèles murins*. (PhD), Grenoble, Grenoble. (00854192)
- Ricard, N., & Bailey, S. T. (2011). Rôle du récepteur ALK1 membre de la famille des récepteurs du TGF- $\beta$ , dans l'angiogenèse. *e-VEGF-Immuno-actu*, 6(3), 9-12.
- Ricard, N., Bidart, M., Mallet, C., Lesca, G., Giraud, S., Prudent, R., Feige, J. J., & Bailly, S. (2010). Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel ACVRL1 mutations. *Blood*, 116(9), 1604-1612. doi:10.1182/blood-2010-03-276881
- Ricard, N., Ciais, D., Levet, S., Subileau, M., Mallet, C., Zimmers, T. A., Lee, S. J., Bidart, M., Feige, J. J., & Bailly, S. (2012). BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal

- vascular remodeling. *Blood*, 119(25), 6162-6171. doi:10.1182/blood-2012-01-407593
- Robinson, R., Barathi, V. A., Chaurasia, S. S., Wong, T. Y., & Kern, T. S. (2012). Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis Model Mech*, 5(4), 444-456. doi:10.1242/dmm.009597
- Rochfort, K. D., Collins, L. E., Murphy, R. P., & Cummins, P. M. (2014). Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-dependent ROS generation: consequences for interendothelial adherens and tight junctions. *PLoS One*, 9(7), e101815. doi:10.1371/journal.pone.0101815
- Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y., & Han, W. (2016). Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Experimental & molecular medicine*, 48(3), e219-e219. doi:10.1038/emm.2016.6
- Roelen, B. A., van Rooijen, M. A., & Mummery, C. L. (1997). Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development. *Dev Dyn*, 209(4), 418-430. doi:10.1002/(sici)1097-0177(199708)209:4<418::aid-aja9>3.0.co;2-l
- Rofagha, S., Bhisitkul, R. B., Boyer, D. S., Sadda, S. R., & Zhang, K. (2013). Seven-year outcomes in ranibizumab-treated patients in ANCHOR, MARINA, and HORIZON: a multicenter cohort study (SEVEN-UP). *Ophthalmology*, 120(11), 2292-2299. doi:10.1016/j.ophtha.2013.03.046
- Romero-Aroca, P. (2010). Targeting the pathophysiology of diabetic macular edema. *Diabetes Care*, 33(11), 2484-2485. doi:10.2337/dc10-1580
- Romero-Aroca, P. (2011). Managing diabetic macular edema: The leading cause of diabetes blindness. *World J Diabetes*, 2(6), 98-104. doi:10.4239/wjd.v2.i6.98
- Romero-Aroca, P., Baget-Bernaldiz, M., Pareja-Rios, A., Lopez-Galvez, M., Navarro-Gil, R., & Verges, R. (2016). Diabetic Macular Edema Pathophysiology: Vasogenic versus Inflammatory. *J Diabetes Res*, 2016, 2156273. doi:10.1155/2016/2156273
- Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C. H., & Miyazono, K. (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(17), 7632-7636. doi:10.1073/pnas.92.17.7632
- Rostama, B., Turner, J. E., Seavey, G. T., Norton, C. R., Gridley, T., Vary, C. P., & Liaw, L. (2015). DLL4/Notch1 and BMP9 Interdependent Signaling Induces Human Endothelial Cell Quiescence via P27KIP1 and Thrombospondin-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35(12), 2626-2637. doi:10.1161/atvbaha.115.306541
- Rubsam, A., Parikh, S., & Fort, P. E. (2018). Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci*, 19(4). doi:10.3390/ijms19040942
- Ruderman, N. B. (1975). Muscle Amino Acid Metabolism and Gluconeogenesis. *Annual Review of Medicine*, 26(1), 245-258. doi:10.1146/annurev.me.26.020175.001333
- Rudini, N., Felici, A., Giampietro, C., Lampugnani, M., Corada, M., Swirsding, K., Garre, M., Liebner, S., Letarte, M., ten Dijke, P., & Dejana, E. (2008). VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *Embo j*, 27(7), 993-1004. doi:10.1038/emboj.2008.46
- Rui, L. (2014). Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*, 4(1), 177-197. doi:10.1002/cphy.c130024



- Ruiz, S., Zhao, H., Chandakkar, P., Chatterjee, P. K., Papoin, J., Blanc, L., Metz, C. N., Campagne, F., & Marambaud, P. (2016). A mouse model of hereditary hemorrhagic telangiectasia generated by transmammary-delivered immunoblocking of BMP9 and BMP10. *Sci Rep*, *5*, 37366. doi:10.1038/srep37366
- Runkle, E. A., Titchenell, P. M., & Antonetti, D. A. (2012). Molecular Regulation of Endothelial Cell Tight Junctions and the Blood-Retinal Barrier. In J. Tombran-Tink, C. J. Barnstable, & T. W. Gardner (Eds.), *Visual Dysfunction in Diabetes: The Science of Patient Impairment and Health Care* (pp. 123-141). New York, NY: Springer New York.
- Saad, M. I., Abdelkhalek, T. M., Saleh, M. M., Kamel, M. A., Youssef, M., Tawfik, S. H., & Dominguez, H. (2015). Insights into the molecular mechanisms of diabetes-induced endothelial dysfunction: focus on oxidative stress and endothelial progenitor cells. *Endocrine*, *50*(3), 537-567. doi:10.1007/s12020-015-0709-4
- Saito, T., Bokhove, M., Croci, R., Zamora-Caballero, S., Han, L., Letarte, M., de Sanctis, D., & Jovine, L. (2017). Structural Basis of the Human Endoglin-BMP9 Interaction: Insights into BMP Signaling and HHT1. *Cell reports*, *19*(9), 1917-1928. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.011
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T., & Tsukita, S. (1998). Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol*, *141*(2), 397-408.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., & Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*, *11*(12), 4131-4142. doi:10.1091/mbc.11.12.4131
- Sakai, G., Inoue, I., Suzuki, T., Sumita, T., Inukai, K., Katayama, S., Awata, T., Yamada, T., Asano, T., Katagiri, H., Noda, M., Shimada, A., & Ono, H. (2017). Effects of the Activation of Three Major Hepatic Akt Substrates on Glucose Metabolism in Male Mice. *Endocrinology*, *158*(8), 2659-2671. doi:10.1210/en.2016-1969
- Saker, S., Stewart, E. A., Browning, A. C., Allen, C. L., & Amoaku, W. M. (2014). The effect of hyperglycaemia on permeability and the expression of junctional complex molecules in human retinal and choroidal endothelial cells. *Exp Eye Res*, *121*, 161-167. doi:10.1016/j.exer.2014.02.016
- Saltiel, A. R., & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, *414*(6865), 799-806. doi:10.1038/414799a
- Santibañez, Juan F., Quintanilla, M., & Bernabeu, C. (2011). TGF- $\beta$ /TGF- $\beta$  receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *121*(6), 233-251. doi:10.1042/CS20110086 %J Clinical Science
- Satirdav, G., Otulu, R., & Kerimoglu, H. (2014). Current evidence of pathophysiology of diabetic macular edema: A review. *World J Ophthalmology*, *4*(4), 147-151. doi:10.1084/jem.20111343
- Schalkwijk, C. G., & Stehouwer, C. D. (2005). Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond)*, *109*(2), 143-159. doi:10.1042/cs20050025
- Schalkwijk, Casper G., & Stehouwer, Coen D. A. (2005). Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clinical Science*, *109*(2), 143-159. doi:10.1042/cs20050025

- Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R. L., Zhao, Q., Pukac, L., Lowik, C. W., & ten Dijke, P. (2007). BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci*, *120*(Pt 6), 964-972. doi:10.1242/jcs.002949
- Scheppke, L., Aguilar, E., Gariano, R. F., Jacobson, R., Hood, J., Doukas, J., Cao, J., Noronha, G., Yee, S., Weis, S., Martin, M. B., Soll, R., Cheresch, D. A., & Friedlander, M. (2008). Retinal vascular permeability suppression by topical application of a novel VEGFR2/Src kinase inhibitor in mice and rabbits. *J Clin Invest*, *118*(6), 2337-2346. doi:10.1172/jci33361
- Schmucker, C., Ehlden, C., Agostini, H. T., Antes, G., Ruecker, G., Lelgemann, M., & Loke, Y. K. (2012). A safety review and meta-analyses of bevacizumab and ranibizumab: off-label versus goldstandard. *PLoS One*, *7*(8), e42701. doi:10.1371/journal.pone.0042701
- Schulte, D., Kupperts, V., Dartsch, N., Broermann, A., Li, H., Zarbock, A., Kamenyeva, O., Kiefer, F., Khandoga, A., Massberg, S., & Vestweber, D. (2011). Stabilizing the VE-cadherin-catenin complex blocks leukocyte extravasation and vascular permeability. *Embo j*, *30*(20), 4157-4170. doi:10.1038/emboj.2011.304
- Scott, G. J., Ray, M. K., Ward, T., McCann, K., Peddada, S., Jiang, F. X., & Mishina, Y. (2009). Abnormal glucose metabolism in heterozygous mutant mice for a type I receptor required for BMP signaling. *Genesis*, *47*(6), 385-391. doi:10.1002/dvg.20513
- Seki, T., Yun, J., & Oh, S. P. (2003). Arterial endothelium-specific activin receptor-like kinase 1 expression suggests its role in arterialization and vascular remodeling. *Circ Res*, *93*(7), 682-689. doi:10.1161/01.res.0000095246.40391.3b
- Semba, R. D., Huang, H., Lutty, G. A., Van Eyk, J. E., & Hart, G. W. (2014). The role of O-GlcNAc signaling in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Proteomics Clin Appl*, *8*(3-4), 218-231. doi:10.1002/prca.201300076
- Senger, D. R., Connolly, D. T., Van de Water, L., Feder, J., & Dvorak, H. F. (1990). Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of guinea pig tumor-secreted vascular permeability factor. *Cancer Res*, *50*(6), 1774-1778.
- Service, J. (1991). Hypoglycemias. *Conferences and Reviews*(1), 442-454. doi:[https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)30081-5](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)30081-5)
- Service, J. F. (1991). Hypoglycemias. *Conferences and Reviews*(1), 442-454. doi:[https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)30081-5](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)30081-5)
- Shah, K., & Abbruscato, T. (2017). Chapter 6 - The Blood-Brain Barrier: A Restricted Gateway to the Brain. In P. M. Conn (Ed.), *Conn's Translational Neuroscience* (pp. 141-146). San Diego: Academic Press.
- Shao, E. S., Lin, L., Yao, Y., & Bostrom, K. I. (2009). Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. *Blood*, *114*(10), 2197-2206. doi:10.1182/blood-2009-01-199166
- Shao, E. S., Lin, L., Yao, Y., & Boström, K. I. (2009). Expression of vascular endothelial growth factor is coordinately regulated by the activin-like kinase receptors 1 and 5 in endothelial cells. *Blood*, *114*(10), 2197-2206. doi:10.1182/blood-2009-01-199166

- Sharabi, K., Tavares, C. D., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2015). Molecular pathophysiology of hepatic glucose production. *Mol Aspects Med*, 46, 21-33. doi:10.1016/j.mam.2015.09.003
- Shin, E. S., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2014). Diabetes and retinal vascular dysfunction. *J Ophthalmic Vis Res*, 9(3), 362-373. doi:10.4103/2008-322X.143378
- Shin, E. S., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2014). Diabetes and retinal vascular dysfunction. *J Ophthalmic Vis Res*, 9(3), 362-373. doi:10.4103/2008-322x.143378
- Sidibé, A., & Imhof, B. A. (2014). VE-cadherin phosphorylation decides: vascular permeability or diapedesis. *Nature Immunology*, 15, 215. doi:10.1038/ni.2825
- Sidibé, A., Polena, H., Pernet-Gallay, K., Razanajatovo, J., Mannic, T., Chaumontel, N., Bama, S., Maréchal, I., Huber, P., Gulino-Debrac, D., Bouillet, L., & Vilgrain, I. (2014). VE-cadherin Y685F knock-in mouse is sensitive to vascular permeability in recurrent angiogenic organs. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 307(3), H455-H463. doi:10.1152/ajpheart.00774.2013
- Sim, D., & Fruttiger, M. (2013). Keeping blood vessels out of sight. *eLife*, 2, e00948-e00948. doi:10.7554/eLife.00948
- Simard, J. M., Kent, T. A., Chen, M., Tarasov, K. V., & Gerzanich, V. (2007). Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *The Lancet. Neurology*, 6(3), 258-268. doi:10.1016/S1474-4422(07)70055-8
- Simionescu, D., & Simionescu, A. (2017). *Physiologic and Pathologic Angiogenesis: Signaling Mechanisms and Targeted Therapy: Chapter 1 TGFbeta activation and signaling in angiogenesis*: IntechOpen.
- Singh, A., & Stewart, J. M. (2009). Pathophysiology of diabetic macular edema. *Int Ophthalmol Clin*, 49(2), 1-11. doi:10.1097/IIO.0b013e31819fd164
- Smith, G. C., & Turner, N. (2017). FOXO1 Is the Headline Akt Regulating Hepatic Glucose Metabolism. *Endocrinology*, 158(8), 2436-2438. doi:10.1210/en.2017-00525
- Song, J. J., Celeste, A. J., Kong, F. M., Jirtle, R. L., Rosen, V., & Thies, R. S. (1995). Bone morphogenetic protein-9 binds to liver cells and stimulates proliferation. *Endocrinology*, 136(10), 4293-4297. doi:10.1210/endo.136.10.7664647
- Sonoda, S., Sakamoto, T., Shirasawa, M., Yamashita, T., Otsuka, H., & Terasaki, H. (2013). Correlation between reflectivity of subretinal fluid in OCT images and concentration of intravitreal VEGF in eyes with diabetic macular edema. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(8), 5367-5374. doi:10.1167/iovs.13-12382
- Sophie, R., Lu, N., & Campochiaro, P. A. (2015). Predictors of Functional and Anatomic Outcomes in Patients with Diabetic Macular Edema Treated with Ranibizumab. *Ophthalmology*, 122(7), 1395-1401. doi:10.1016/j.ophtha.2015.02.036
- Sorrentino, F. S., Allkubes, M., Salsini, G., Bonifazzi, C., & Perri, P. (2016). The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy. *Life Sci*, 162, 54-59. doi:10.1016/j.lfs.2016.08.001
- Sosa, I., Cvijanovic, O., Celic, T., Cuculic, D., Crncevic-Orlic, Z., Vukelic, L., Zoricic Cvek, S., Dudaric, L., Bosnar, A., & Bobinac, D. (2011). Hepatoregenerative role of bone morphogenetic protein-9. *Med Sci Monit*, 17(12), Hy33-35.
- Soubrier, F., Chung, W. K., Machado, R., Grunig, E., Aldred, M., Geraci, M., Loyd, J. E., Elliott, C. G., Trembath, R. C., Newman, J. H., & Humbert, M. (2013). Genetics and genomics

- of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*, 62(25 Suppl), D13-21. doi:10.1016/j.jacc.2013.10.035
- Speiser, P., Gittelsohn, A. M., & Patz, A. (1968). Studies on diabetic retinopathy: Iii. influence of diabetes on intramural pericytes. *Archives of Ophthalmology*, 80(3), 332-337. doi:10.1001/archophth.1968.00980050334007
- Spiekerkoetter, E., Tian, X., Cai, J., Hopper, R. K., Sudheendra, D., Li, C. G., El-Bizri, N., Sawada, H., Haghghat, R., Chan, R., Haghghat, L., de Jesus Perez, V., Wang, L., Reddy, S., Zhao, M., Bernstein, D., Solow-Cordero, D. E., Beachy, P. A., Wandless, T. J., Ten Dijke, P., & Rabinovitch, M. (2013). FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest*, 123(8), 3600-3613. doi:10.1172/JCI65592
- Srinivasan, S., Hanes, M. A., Dickens, T., Porteous, M. E. M., Oh, S. P., Hale, L. P., & Marchuk, D. A. (2003). A mouse model for hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) type 2. *Human Molecular Genetics*, 12(5), 473-482. doi:10.1093/hmg/ddg050
- Stewart, E. A., Saker, S., & Amoaku, W. M. (2016). Dexamethasone reverses the effects of high glucose on human retinal endothelial cell permeability and proliferation in vitro. *Exp Eye Res*, 151, 75-81. doi:10.1016/j.exer.2016.08.005
- Stitt, A. W., Bhaduri, T., McMullen, C. B., Gardiner, T. A., & Archer, D. B. (2000). Advanced glycation end products induce blood-retinal barrier dysfunction in normoglycemic rats. *Mol Cell Biol Res Commun*, 3(6), 380-388. doi:10.1006/mcbr.2000.0243
- Strayer, D. S., Rubin, E., Saffitz, J. E., Schiller, A. L., Lippincott, W., & Wilkins. (2015). Rubin's pathology : clinicopathologic foundations of medicine.
- Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Breant, C., Duarte, A., & Eichmann, A. (2007). The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9), 3225-3230. doi:10.1073/pnas.0611177104
- Sukriti, S., Tauseef, M., Yazbeck, P., & Mehta, D. (2014). Mechanisms regulating endothelial permeability. *Pulm Circ*, 4(4), 535-551. doi:10.1086/677356
- Sun, Z., Li, X., Massena, S., Kutschera, S., Padhan, N., Gualandi, L., Sundvold-Gjerstad, V., Gustafsson, K., Choy, W. W., Zang, G., Quach, M., Jansson, L., Phillipson, M., Abid, M. R., Spurkland, A., & Claesson-Welsh, L. (2012). VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSA. *J Exp Med*, 209(7), 1363-1377. doi:10.1084/jem.20111343
- Sundstrom, J. M., Tash, B. R., Murakami, T., Flanagan, J. M., Bewley, M. C., Stanley, B. A., Gonsar, K. B., & Antonetti, D. A. (2009). Identification and analysis of occludin phosphosites: a combined mass spectrometry and bioinformatics approach. *J Proteome Res*, 8(2), 808-817. doi:10.1021/pr7007913
- Suzuki, Y., Ohga, N., Morishita, Y., Hida, K., Miyazono, K., & Watabe, T. (2010). BMP-9 induces proliferation of multiple types of endothelial cells in vitro and in vivo. *J Cell Sci*, 123(Pt 10), 1684-1692. doi:10.1242/jcs.061556
- Sweeney, M., & Foldes, G. (2018). It Takes Two: Endothelial-Perivascular Cell Cross-Talk in Vascular Development and Disease. *Front Cardiovasc Med*, 5, 154. doi:10.3389/fcvm.2018.00154

- Tachida, Y., Izumi, N., Sakurai, T., & Kobayashi, H. (2017). Mutual interaction between endothelial cells and mural cells enhances BMP9 signaling in endothelial cells. *Biol Open*, 6(3), 370-380. doi:10.1242/bio.020503
- Tang, W. H., Martin, K. A., & Hwa, J. (2012). Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacol*, 3, 87. doi:10.3389/fphar.2012.00087
- Thalgott, J., Dos-Santos-Luis, D., & Lebrin, F. (2015). Pericytes as targets in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet*, 6, 37. doi:10.3389/fgene.2015.00037
- Tian, H., Mythreye, K., Golzio, C., Katsanis, N., & Blobel, G. C. (2012). Endoglin mediates fibronectin/alpha5beta1 integrin and TGF-beta pathway crosstalk in endothelial cells. *Embo j*, 31(19), 3885-3900. doi:10.1038/emboj.2012.246
- Tikhanovich, I., Cox, J., & Weinman, S. A. (2013). Forkhead box class O transcription factors in liver function and disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 28 Suppl 1(0 1), 125-131. doi:10.1111/jgh.12021
- Tillet, E., & Bailly, S. (2014). Emerging roles of BMP9 and BMP10 in hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Front Genet*, 5, 456. doi:10.3389/fgene.2014.00456
- Tillet, E., Ouarne, M., Desroches-Castan, A., Mallet, C., Subileau, M., Didier, R., Lioutsko, A., Belthier, G., Feige, J. J., & Bailly, S. (2018). A heterodimer formed by bone morphogenetic protein 9 (BMP9) and BMP10 provides most BMP biological activity in plasma. *J Biol Chem*, 293(28), 10963-10974. doi:10.1074/jbc.RA118.002968
- Timmerman, I., Hoogenboezem, M., Bennett, A. M., Geerts, D., Hordijk, P. L., & van Buul, J. D. (2012). The tyrosine phosphatase SHP2 regulates recovery of endothelial adherens junctions through control of beta-catenin phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 23(21), 4212-4225. doi:10.1091/mbc.E12-01-0038
- Titchenell, P. M., Lin, C. M., Keil, J. M., Sundstrom, J. M., Smith, C. D., & Antonetti, D. A. (2012). Novel atypical PKC inhibitors prevent vascular endothelial growth factor-induced blood-retinal barrier dysfunction. *Biochem J*, 446(3), 455-467. doi:10.1042/bj20111961
- Tobin, J. F., & Celeste, A. J. (2006). Bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors as drug targets in cardiovascular and metabolic disease. *Drug Discov Today*, 11(9-10), 405-411. doi:10.1016/j.drudis.2006.03.016
- Toporsian, M., Gros, R., Kabir, M. G., Vera, S., Govindaraju, K., Eidelman, D. H., Husain, M., & Letarte, M. (2005). A Role for Endoglin in Coupling eNOS Activity and Regulating Vascular Tone Revealed in Hereditary Hemorrhagic Telangiectasia. *Circulation Research*, 96(6), 684-692. doi:10.1161/01.res.0000159936.38601.22
- Townson, S. A., Martinez-Hackert, E., Greppi, C., Lowden, P., Sako, D., Liu, J., Ucran, J. A., Liharska, K., Underwood, K. W., Seehra, J., Kumar, R., & Grinberg, A. V. (2012). Specificity and structure of a high affinity activin receptor-like kinase 1 (ALK1) signaling complex. *J Biol Chem*, 287(33), 27313-27325. doi:10.1074/jbc.M112.377960
- Tsai, M.-J., Hsieh, Y.-T., Shen, E. P., & Peng, Y.-J. (2017). Systemic Associations with Residual Subretinal Fluid after Ranibizumab in Diabetic Macular Edema. *J Ophthalmol*, 2017, 4834201-4834201. doi:10.1155/2017/4834201

- Tual-Chalot, S., Oh, S. P., & Arthur, H. M. (2015). Mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia: recent advances and future challenges. *Front Genet*, 6, 25. doi:10.3389/fgene.2015.00025
- Turowski, P., Martinelli, R., Crawford, R., Wateridge, D., Papageorgiou, A. P., Lampugnani, M. G., Gamp, A. C., Vestweber, D., Adamson, P., Dejana, E., & Greenwood, J. (2008). Phosphorylation of vascular endothelial cadherin controls lymphocyte emigration. *J Cell Sci*, 121(Pt 1), 29-37. doi:10.1242/jcs.022681
- Tzima, E., Irani-Tehrani, M., Kiosses, W. B., Dejana, E., Schultz, D. A., Engelhardt, B., Cao, G., DeLisser, H., & Schwartz, M. A. (2005). A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature*, 437(7057), 426-431. doi:10.1038/nature03952
- Upton, P. D., Davies, R. J., Trembath, R. C., & Morrell, N. W. (2009). Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. *J Biol Chem*, 284(23), 15794-15804. doi:10.1074/jbc.M109.002881
- Urias, E. A., Urias, G. A., Monickaraj, F., McGuire, P., & Das, A. (2017). Novel therapeutic targets in diabetic macular edema: Beyond VEGF. *Vision Res*, 139, 221-227. doi:10.1016/j.visres.2017.06.015
- Urness, L. D., Sorensen, L. K., & Li, D. Y. (2000). Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nat Genet*, 26(3), 328-331. doi:10.1038/81634
- Venkiteswaran, K., Xiao, K., Summers, S., Calkins, C. C., Vincent, P. A., Pumiglia, K., & Kowalczyk, A. P. (2002). Regulation of endothelial barrier function and growth by VE-cadherin, plakoglobin, and beta-catenin. *Am J Physiol Cell Physiol*, 283(3), C811-821. doi:10.1152/ajpcell.00417.2001
- Vidal-Puig, A., & O'Rahilly, S. (2001). Controlling the glucose factory. *Nature*, 413, 125. doi:10.1038/35093198
- Viegas, I., Rui, d. A. C., Miguel Ângelo, P., & John, G. J. (2012). Advances and Applications of Tracer Measurements of Carbohydrate Metabolism in Fish *New Advances and Contributions to Fish Biology*: Intechopen.
- Vittet, D., Buchou, T., Schweitzer, A., Dejana, E., & Huber, P. (1997). Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(12), 6273-6278.
- Wachtel, M., Frei, K., Ehler, E., Fontana, A., Winterhalter, K., & Gloor, S. M. (1999). Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition. *112(23)*, 4347-4356.
- Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I., & Huber, P. (2007). Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene*, 26(7), 1067-1077. doi:10.1038/sj.onc.1209855
- Wallez, Y., & Huber, P. (2008). Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), 794-809. doi:10.1016/j.bbamem.2007.09.003

- Wang, A. L., Yu, A. C., He, Q. H., Zhu, X., & Tso, M. O. (2007). AGEs mediated expression and secretion of TNF alpha in rat retinal microglia. *Exp Eye Res*, *84*(5), 905-913. doi:10.1016/j.exer.2007.01.011
- Watkins, P. J. (2003). *ABC of Diabetes* (Fifth ed.). London: BMJ Publishing Group Ltd.
- Weigert, C., Brodbeck, K., Sawadogo, M., Haring, H. U., & Schleicher, E. D. (2004). Upstream stimulatory factor (USF) proteins induce human TGF-beta1 gene activation via the glucose-response element-1013/-1002 in mesangial cells: up-regulation of USF activity by the hexosamine biosynthetic pathway. *J Biol Chem*, *279*(16), 15908-15915. doi:10.1074/jbc.M313524200
- Weis, S., Shintani, S., Weber, A., Kirchmair, R., Wood, M., Cravens, A., McSharry, H., Iwakura, A., Yoon, Y. S., Himes, N., Burstein, D., Doukas, J., Soll, R., Losordo, D., & Cheresch, D. (2004). Src blockade stabilizes a Flk/cadherin complex, reducing edema and tissue injury following myocardial infarction. *J Clin Invest*, *113*(6), 885-894. doi:10.1172/jci20702
- Wells, J. A., Glassman, A. R., Ayala, A. R., Jampol, L. M., Bressler, N. M., Bressler, S. B., Brucker, A. J., Ferris, F. L., Hampton, G. R., Jhaveri, C., Melia, M., & Beck, R. W. (2016). Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema: Two-Year Results from a Comparative Effectiveness Randomized Clinical Trial. *Ophthalmology*, *123*(6), 1351-1359. doi:10.1016/j.ophtha.2016.02.022
- Wessel, F., Winderlich, M., Holm, M., Frye, M., Rivera-Galdos, R., Vockel, M., Linnepe, R., Ipe, U., Stadtmann, A., Zarbock, A., Nottebaum, A. F., & Vestweber, D. (2014). Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. *Nat Immunol*, *15*(3), 223-230. doi:10.1038/ni.2824
- Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., & Shaw, J. (2011). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Research and Clinical Practice*, *94*(3), 311-321. doi:10.1016/j.diabres.2011.10.029
- Wietecha, M. S., Cerny, W. L., & DiPietro, L. A. (2013). Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*, *367*, 3-32. doi:10.1007/82\_2012\_287
- Wilhelm, I., Fazakas, C., & Krizbai, I. A. (2011). In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *71*(1), 113-128.
- Wilkinson, C. P., Ferris, F. L., 3rd, Klein, R. E., Lee, P. P., Agardh, C. D., Davis, M., Dills, D., Kampik, A., Pararajasegaram, R., & Verdager, J. T. (2003). Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*, *110*(9), 1677-1682. doi:10.1016/s0161-6420(03)00475-5
- Willard, A. L., & Herman, I. M. (2012). Vascular complications and diabetes: current therapies and future challenges. *J Ophthalmol*, *2012*, 209538. doi:10.1155/2012/209538
- Willmann, G., Nepomuceno, A. B., Messias, K., Barroso, L., Scott, I. U., Messias, A., & Jorge, R. (2017). Foveal thickness reduction after anti-vascular endothelial growth factor treatment in chronic diabetic macular edema. *Int J Ophthalmol*, *10*(5), 760-764. doi:10.18240/ijo.2017.05.17

- Winkler, E. A., Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2011). Lack of Smad or Notch leads to a fatal game of brain pericyte hopscotch. *Dev Cell*, 20(3), 279-280. doi:10.1016/j.devcel.2011.03.002
- Winnick, J. J., Kraft, G., Gregory, J. M., Edgerton, D. S., Williams, P., Hajizadeh, I. A., Kamal, M. Z., Smith, M., Farmer, B., Scott, M., Neal, D., Donahue, E. P., Allen, E., & Cherrington, A. D. (2016). Hepatic glycogen can regulate hypoglycemic counterregulation via a liver-brain axis. *J Clin Invest*, 126(6), 2236-2248. doi:10.1172/jci79895
- Witmer, A. N., Blaauwgeers, H. G., Weich, H. A., Alitalo, K., Vrensen, G. F., & Schlingemann, R. O. (2002). Altered expression patterns of VEGF receptors in human diabetic retina and in experimental VEGF-induced retinopathy in monkey. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(3), 849-857.
- Witmer, A. N., Dai, J., Weich, H. A., Vrensen, G. F. J. M., & Schlingemann, R. O. (2002). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors 1, 2, and 3 in Quiescent Endothelia. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(6), 767-777. doi:10.1177/002215540205000603
- Wojciak-Stothard, B., Potempa, S., Eichholtz, T., & Ridley, A. J. (2001). Rho and Rac but not Cdc42 regulate endothelial cell permeability. *J Cell Sci*, 114(Pt 7), 1343-1355.
- Wojciak-Stothard, B., & Ridley, A. J. (2002). Rho GTPases and the regulation of endothelial permeability. *Vascul Pharmacol*, 39(4-5), 187-199.
- Wolfensberger, T. J. (2012). *Macular Edema: Conference Proceedings of the 2nd International Symposium on Macular Edema*: Springer Netherlands.
- Wong-Riley, M. T. (2010). Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain*, 2, 99-116. doi:10.2147/eb.s9078
- Wong, S. H., Hamel, L., Chevalier, S., & Philip, A. (2000). Endoglin expression on human microvascular endothelial cells. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5550-5560. doi:doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01621.x
- Wooderchak-Donahue, W. L., McDonald, J., O'Fallon, B., Upton, P. D., Li, W., Roman, B. L., Young, S., Plant, P., Fulop, G. T., Langa, C., Morrell, N. W., Botella, L. M., Bernabeu, C., Stevenson, D. A., Runo, J. R., & Bayrak-Toydemir, P. (2013). BMP9 mutations cause a vascular-anomaly syndrome with phenotypic overlap with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Am J Hum Genet*, 93(3), 530-537. doi:10.1016/j.ajhg.2013.07.004
- Wozney, J. M., Rosen, V., Byrne, M., Celeste, A. J., Moutsatsos, I., & Wang, E. A. (1990). Growth factors influencing bone development. *J Cell Sci Suppl*, 13, 149-156.
- Wrana, J. L., Tran, H., Attisano, L., Arora, K., Childs, S. R., Massague, J., & O'Connor, M. B. (1994). Two distinct transmembrane serine/threonine kinases from *Drosophila melanogaster* form an activin receptor complex. *Mol Cell Biol*, 14(2), 944-950.
- Wu, M., Chen, Y., Wilson, K., Chirindel, A., Ihnat, M. A., Yu, Y., Boulton, M. E., Szwedda, L. I., Ma, J. X., & Lyons, T. J. (2008). Intraretinal leakage and oxidation of LDL in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(6), 2679-2685. doi:10.1167/iovs.07-1440
- Xu, L., Nirwane, A., & Yao, Y. (2018). Basement membrane and blood-brain barrier. *Stroke and Vascular Neurology*, svn-2018-000198. doi:10.1136/svn-2018-000198
- Xu, Q., Qaum, T., & Adamis, A. P. (2001). Sensitive blood-retinal barrier breakdown quantitation using Evans blue. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(3), 789-794.



- Xu, X., Li, X., Yang, G., Li, L., Hu, W., Zhang, L., Liu, H., Zheng, H., Tan, M., & Zhu, D. (2017). Circulating bone morphogenetic protein-9 in relation to metabolic syndrome and insulin resistance. *Sci Rep*, 7(1), 17529. doi:10.1038/s41598-017-17807-y
- Xue, M., Qian, Q., Adaikalakoteswari, A., Rabbani, N., Babaei-Jadidi, R., & Thornalley, P. J. (2008). Activation of NF-E2-Related Factor-2 Reverses Biochemical Dysfunction of Endothelial Cells Induced by Hyperglycemia Linked to Vascular Disease. *Diabetes*, 57(10), 2809-2817. doi:10.2337/db06-1003
- Yabaluri, N., & Bashyam, M. D. (2010). Hormonal regulation of gluconeogenic gene transcription in the liver. *J Biosci*, 35(3), 473-484.
- Yamashita, H., Ichijo, H., Grimsby, S., Moren, A., ten Dijke, P., & Miyazono, K. (1994). Endoglin forms a heteromeric complex with the signaling receptors for transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*, 269(3), 1995-2001.
- Yan, L. J. (2018). Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Animal Model Exp Med*, 1(1), 7-13. doi:10.1002/ame2.12001
- Yan, S. F., Ramasamy, R., & Schmidt, A. M. (2010). The RAGE axis: a fundamental mechanism signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ Res*, 106(5), 842-853. doi:10.1161/circresaha.109.212217
- Yang, M., Liang, Z., Yang, M., Jia, Y., Yang, G., He, Y., Li, X., Gu, H. F., Zheng, H., Zhu, Z., & Li, L. (2019). Role of bone morphogenetic protein-9 in the regulation of glucose and lipid metabolism. *Faseb j*, 33(9), 10077-10088. doi:10.1096/fj.201802544RR
- Yang, X., Su, K., Roos, M. D., Chang, Q., Paterson, A. J., & Kudlow, J. E. (2001). O-linkage of N-acetylglucosamine to Sp1 activation domain inhibits its transcriptional capability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(12), 6611-6616. doi:10.1073/pnas.111099998
- Yoon, J. C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C. R., Granner, D. K., Newgard, C. B., & Spiegelman, B. M. (2001). Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413(6852), 131-138. doi:10.1038/35093050
- Young, A. (2005). Inhibition of glucagon secretion. *Adv Pharmacol*, 52, 151-171. doi:10.1016/s1054-3589(05)52008-8
- Yu, D.-Y., Cringle, S. J., Su, E.-N., Yu, P. K., Jerums, G., & Cooper, M. E. (2001). Pathogenesis and intervention strategies in diabetic retinopathy. *Clinical & Experimental Ophthalmology*, 29(3), 164-166. doi:doi:10.1046/j.1442-9071.2001.00409.x
- Yu, H., Huang, X., Ma, Y., Gao, M., Wang, O., Gao, T., Shen, Y., & Liu, X. (2013). Interleukin-8 regulates endothelial permeability by down-regulation of tight junction but not dependent on integrins induced focal adhesions. *Int J Biol Sci*, 9(9), 966-979. doi:10.7150/ijbs.6996
- Yu, P. B., Beppu, H., Kawai, N., Li, E., & Bloch, K. D. (2005). Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 280(26), 24443-24450. doi:10.1074/jbc.M502825200
- Yun, J. H., Park, S. W., Kim, K. J., Bae, J. S., Lee, E. H., Paek, S. H., Kim, S. U., Ye, S., Kim, J. H., & Cho, C. H. (2017). Endothelial STAT3 Activation Increases Vascular Leakage Through Downregulating Tight Junction Proteins: Implications for Diabetic Retinopathy. *J Cell Physiol*, 232(5), 1123-1134. doi:10.1002/jcp.25575

- Zhang, H., Schulz, T. J., Espinoza, D. O., Huang, T. L., Emanuelli, B., Kristiansen, K., & Tseng, Y. H. (2010). Cross talk between insulin and bone morphogenetic protein signaling systems in brown adipogenesis. *Mol Cell Biol*, *30*(17), 4224-4233. doi:10.1128/mcb.00363-10
- Zhang, H., Shaw, A. R., Mak, A., & Letarte, M. (1996). Endoglin is a component of the transforming growth factor (TGF)-beta receptor complex of human pre-B leukemic cells. *The Journal of Immunology*, *156*(2), 564-573.
- Zhang, X., Zeng, H., Bao, S., Wang, N., & Gillies, M. C. (2014). Diabetic macular edema: new concepts in patho-physiology and treatment. *Cell Biosci*, *4*, 27. doi:10.1186/2045-3701-4-27
- Zhang, X., Zeng, H., Bao, S., Wang, N., & Gillies, M. C. (2014). Diabetic macular edema: new concepts in patho-physiology and treatment. *Cell Biosci*, *4*, 27-27. doi:10.1186/2045-3701-4-27
- Zhao, Y., & Singh, R. P. (2018). The role of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) in the management of proliferative diabetic retinopathy. *Drugs in context*, *7*, 212532-212532. doi:10.7573/dic.212532
- Zhou, C., Townsley, M. I., Alexeyev, M., Voelkel, N. F., & Stevens, T. (2016). Endothelial hyperpermeability in severe pulmonary arterial hypertension: role of store-operated calcium entry. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *311*(3), L560-L569. doi:10.1152/ajplung.00057.2016
- Zimmet, P. Z., & Alberti, K. G. M. M. (2016). Epidemiology of Diabetes—Status of a Pandemic and Issues Around Metabolic Surgery. *39*(6), 878-883. doi:10.2337/dc16-0273 %J Diabetes Care
- Zlokovic, B. V. (2009). Blood-Brain Barrier and Neurovascular Mechanisms of Neurodegeneration and Injury. In L. R. Squire (Ed.), *Encyclopedia of Neuroscience* (pp. 265-271). Oxford: Academic Press.