



HAL
open science

Rôle de la voie Hedgehog dans la physiopathologie de l'ischémie critique de membre inférieur et le maintien de l'intégrité endothéliale

Caroline Caradu

► To cite this version:

Caroline Caradu. Rôle de la voie Hedgehog dans la physiopathologie de l'ischémie critique de membre inférieur et le maintien de l'intégrité endothéliale. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0125 . tel-03011631

HAL Id: tel-03011631

<https://theses.hal.science/tel-03011631v1>

Submitted on 18 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2020

Université Bordeaux Segalen



« Biology of Cardiovascular Diseases »

université
de **BORDEAUX**



THESE
Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX Segalen

Mention : Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Présentée et soutenue publiquement
Le 02 Octobre 2020

Par **CARADU CAROLINE**
Née le 18 aout 1985 à Niort, France

**ROLE DE LA VOIE HEDGEHOG DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE
L'ISCHEMIE CRITIQUE DE MEMBRE INFERIEUR ET LE MAINTIEN
DE L'INTEGRITE ENDOTHELIALE**

Membres du Jury

M. Éric DUCASSE

M. Kamel MOHAMMEDI

Mme Agnès HARTEMANN

Mme Françoise LENFANT

Professeur

Professeur

Professeur

Directeur de Recherche

Directeur de thèse

Président

Rapporteur

Rapporteur

Remerciements

Aux membres du jury : je vous suis très reconnaissante de prendre part à ce travail et de me faire l'honneur de participer à son évaluation. Je remercie tout particulièrement le Pr Agnès Hartemann et le Dr Françoise Lenfant d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ; votre connaissance du diabète et des pathologies métaboliques et cardio-vasculaires vont permettre d'apporter un éclairage nouveau à ce travail. Merci au Pr Kamel Mohammedi d'avoir accepté de l'examiner.

A mon directeur de thèse Éric Ducasse : plus de 10 ans de travail à vos côtés, et je l'espère encore plus à venir ! Le master 2, la thèse de docteur en médecine et aujourd'hui la thèse d'université. Merci pour votre disponibilité, vos conseils avisés, votre bonne humeur communicative et votre réassurance quotidienne. Merci également pour votre aide dans la recherche d'un poste pour mon année de mobilité et merci de continuer à me pousser plus loin que ce dont je me croyais capable... sans votre soutien indéfectible je n'en serai sûrement pas là !

Au Pr Thierry Couffinhal : merci de m'avoir accueillie dans ce laboratoire pour mon master 2 et d'avoir accepté de m'y accueillir à nouveau pour cette thèse d'université. Trouver le temps de s'y consacrer en parallèle de mes activités chirurgicales n'a pas toujours été simple mais je me suis toujours sentie soutenue et protégée. Merci d'avoir pris le temps pour quelques discussions, et d'avoir été disponible chaque fois que j'en avais besoin.

A Marie Ange : merci pour ta gentillesse, ta patience, ton soutien et ton aide incommensurable. Merci de m'avoir appris tant de choses et d'avoir toujours été là même dans les moments difficiles. Tu m'as toujours fait me sentir chez moi dans ce laboratoire et tu m'as donné envie de continuer à travailler à tes côtés après le master, j'espère sincèrement que nous aurons l'occasion de collaborer de nouveau à mon retour de mobilité et que nous pourrions poursuivre cette belle histoire ensemble. Je sais tout ce que je te dois et je ne l'oublierai pas.

A ma famille : A ma formidable Maman, merci pour ton courage, ta tendresse, ton amour, ton soutien pendant toutes ces années, les études de médecine, la thèse de médecine, les premiers articles et maintenant la thèse d'université, toutes ces pages que tu as lues et corrigées, merci pour ton admiration inconditionnelle. A ma Tatie, merci d'avoir toujours été là et merci de prendre soin de nous. A ma Mamie, parce que je ne t'oublierai jamais et que tout ceci c'est aussi en grande partie pour toi et grâce à toi.

A mes amis de toujours, Camille, Yves-Marie, Pauline, Maïté, Aude, Béné, Claudia ! La distance ne nous a pas séparés et les années non plus, je vous adore et j'espère partager encore plein de moments importants avec vous.

A Mathieu, merci d'avoir accepté de me partager avec l'inserm pendant cette année d'assistantat, et merci d'avoir toujours été là pour moi, au bloc comme dans la vie.

A mes co-chefs, Anne-So, Chacha, Céline; pour votre soutien, vos rires et les pleurs partagés. Un grand merci !

A l'équipe « Gadeau Ange » merci pour votre aide et votre bonne humeur ! Merci à Alain pour sa disponibilité, nos longues discussions et son aide dans la correction de cette thèse. Merci à Candice, Sarah et Pierre-Louis pour tous les moments que nous avons partagés, et pour m'avoir donné l'impression de faire partie de votre famille malgré mes lacunes scientifiques et mes absences.

A toute l'équipe U1034 : merci à Annabel, Jérôme, Sylvain, Myriam, Béatrice, Philippe pour les manip, merci à Christelle pour son aide administrative (et pour tous les mails). Et tous ceux que je n'ai pas cités... Un énorme merci à tous !

LISTE DES ABREVIATIONS

20(S)-OH : hydroxycholestérol
 α -SMA : alpha actine musculaire lisse
ACh : acétylcholine
ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine
ADP : adénosine disphosphate
AG II : angiotensine II
AGE : advanced glycation end-products
Angpt1 : Angiopoïétine 1
AOMI : artériopathie oblitérante des membres inférieurs
ARNm : acides ribonucléiques messagers
ATP : adénosine-triphosphate
ATPase : adénosine-triphosphatase
BH4 : tétrahydrobiopterine
BHE : barrière hémato-encéphalique
BMP4 : Bone morphogenetic protein
BOC : Brother of CDO
CAM : molécules d'adhésion cellulaire ou cell adhesion molecule
CD : cluster de differentiation
CD105 : endogline
CDO : homologues of the drosophila iHog
Cdon : Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes
CE : cellules endothéliales
CKI : caséine kinase
CML : cellules musculaires lisses
Col4 α 1 : Collagen type IV alpha 1 chain
CSF2 : granulocyte-macrophage Colony stimulating factor
CXCL8 : C-X-C motif chemokine ligand 8
DAG : diacylglycérol
DAZ : Deleted in Azoospermia
Dhh : Desert Hedgehog

diabète MODY : maturity-onset diabetes of the young

Dll4 : Delta-like 4

DPP-4 : dipeptidyl peptidase-4 ou gliptines

Dzip1 : DAZ Interacting Zinc finger protein 1

EDHF : facteur endothélial hyperpolarisant

EFNB2 : EphrinB2

ERTP : Effective Resting Transmural Pressure

ESVS : Société européenne de chirurgie vasculaire

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FDA : Food and drug administration

FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2

Flk-1 : Flowering locus K homology domain

FMN : Flavine Mononucleotide

FoxF1 Forkhead box protein F1

Gas1 : Growth Arrest Specific 1

GLP-1 : glucagon like peptide-1

GMPc : Guanosine monophosphate cyclique

GPI : glycoposphatidylinositol

GPx : glutathion peroxidase

GSK3 β : glycogène synthase kinase-3 beta

GTP : guanylate adénosine phosphate

HDAC : histone déacétylase

HGF : hepatocyte growth factor

Hh : Hedgehog

Hhat : Hedgehog acyltransferase

Hhip1 : Hedgehog Interacting Protein 1

HIF1 α : Hypoxia Inducible Factor 1 alpha

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

ICAM-1 : intercellular adhesion molecule

ICC : ischémie critique chronique

IFT : transport intraflagellaire

IGF1 : Insulin Like Growth Factor 1

Ihh : Indian Hedgehog

IP : injections intra-péritonéales
IP3 : inositol triphosphate 3
IPS : index de pression systolique
Jag1 : Jagged 1
JAM-A : junctional adhesion molecule -A
KCl : chlorure de potassium
Klf4 : Krueppel-like factor 4
LDL-cholestérol : low density lipoprotein cholestérol
LDPI : laser doppler perfusion imaging
LIF : Leukemia Inhibitory Factor
LOX-1 : Lectin-like oxidized low-density lipoprotein -1
LPS : lipopolysaccharide
MAPK : mitogen-activated protein kinase
MCP1 : monocyte chemoattractant protein
MMPs : Matrix metalloproteinase
MMP2 : Matrix Metalloprotéinase 2
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
NF- κ B : facteur de transcription nucléaire
NG2 : Neural/glial antigen
NLS- : nuclear localization sequence
NO : monoxyde d'azote
NOS : NO-synthase
Nrp1 : Neuropilin 1
O₂⁻ : superoxyde
-OH : hydroxycholestérol
PAF : platelet activating factor
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDGF-R β : récepteur β au PDGF
Pdx1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1
PECAM-1 ou CD31 : Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PGI₂ prostaglandine I₂
PKA : protéine kinase A
PKG : protéine kinase G

PLG : plasminogen
PRS : Particule de Reconnaissance de Signal
Ptch : Patched
PVR : pulse volume recording
ROS : espèces réactives de l'oxygène
SAG : Smoothened agonist
SERCA : sarco/endoplasmic reticulum
sGC : guanylyl cyclase soluble
SGLT2 : cotransporteur rénal glucose-sodium
Shh : Sonic Hedgehog
Smo : Smoothened
SNC : système nerveux central
Su(Fu) : suppressor of fused
STZ : Streptozotocine
Syu : Sonic-you, orthologue de Shh
TA2 : thromboxane A2
TGFB1 : Transforming Growth Factor beta 1
Tie2 : Tek endothelial-specific receptor tyrosine kinase 2
tip cell : cellule de pointe
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TxA₂ : Thromboxane A2
TP : toe pressure
UKPDS : UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETE STUDY
VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule -1
VE-Cadh ou Cdh5 : vascular endothelial-cadhérine-5
VEGF : vascular endothelial growth factor
yot : You-too, orthologue de Gli2
ZO- : zonula occludens

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	15
I. DIABETE	16
A. GENERALITES.....	16
B. MECANISMES PHYSIOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES DU SYSTEME VASCULAIRE	18
1. <i>Organisation du système vasculaire</i>	19
2. <i>Morphogenèse vasculaire</i>	22
3. <i>Fonction endothéliale</i>	31
4. <i>Dysfonction endothéliale</i>	37
5. <i>Diabète et dysfonction endothéliale</i>	41
C. NEUROPATHIE ET PIED DIABETIQUE.....	46
D. DIABETE, SYSTEME IMMUNITAIRE ET INFLAMMATION.....	49
E. STRATEGIES THERAPEUTIQUES ACTUELLES DANS LE DIABETE	50
II. ISCHEMIE CRITIQUE CHRONIQUE	53
A. DEFINITION DE L'ISCHEMIE CRITIQUE CHRONIQUE	53
B. ÉPIDEMIOLOGIE.....	56
C. PHYSIOPATHOLOGIE	57
D. LE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	59
1. <i>Généralité</i>	59
2. <i>Vascularisation du muscle squelettique</i>	62
3. <i>Régénération du muscle squelettique</i>	62
4. <i>Vascularisation du muscle en régénération</i>	65
5. <i>Prise en charge thérapeutique</i>	66
6. <i>Situation actuelle des recherches en médecine régénérative</i>	70
III. VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG	73
A. GENERALITES.....	73
B. GENES ET PROTEINES HH CHEZ LE MAMMIFERE	75
C. VOIE DE SIGNALISATION HH ET REGULATION.....	76
1. <i>Régulation de la sécrétion des ligands Hh</i>	76
2. <i>Signalisation Hh</i>	77
3. <i>Régulation de la signalisation Hh</i>	79
4. <i>Protéine Smo</i>	80
D. MODULATEURS PHARMACOLOGIQUES DE LA VOIE HH DANS LES ESSAIS CLINIQUES	83
1. <i>Antagonistes de la voie de signalisation Hh</i>	83
2. <i>Agonistes de la voie de signalisation Hh</i>	86
IV. VOIE DE SIGNALISATION HH ET VAISSEAUX	92
A. EMBRYOGENESE	92
1. <i>Vascularisation du sac vitellin</i>	92

2. Développement vasculaire des poumons.....	93
3. Formation de l'aorte et des vaisseaux intersomitiques.....	94
4. Implication de la signalisation Hh dans le développement d'autres lits vasculaires.....	96
B. ANGIOGENESE POST-NATALE.....	98
1. Dans un contexte ischémique.....	98
2. Dans un contexte de Cancer.....	99
3. Autres cas d'angiogenèse pathologique.....	102
C. ROLE DE LA VOIE DE SIGNALISATION HH DANS LE MAINTIEN DE L'INTEGRITE VASCULAIRE ET DE LA QUIESCENCE DES CELLULES ENDOTHELIALES.....	103
1. À la barrière hémato-encéphalique (BHE).....	103
2. À la barrière hémato-nerveuse.....	105
3. En dehors du système nerveux.....	106
D. IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION HH DANS LE DIABETE.....	106
OBJECTIFS.....	108
MATERIELS ET METHODES.....	111
I. SOURIS.....	112
1. Souris modifiées pour la voie Hh.....	112
2. Souris Rosa26 ^{mT/mG}	116
3. Souris diabétiques.....	118
II. CHIRURGIE.....	120
1. Ischémie de patte postérieure.....	120
2. Dénervation sciatique.....	121
3. Prélèvements du muscle tibial antérieur.....	121
4. Angiogenèse de cornée.....	121
III. TESTS COMPORTEMENTAUX ET ETUDE DE PERFUSION/VASOMOTRICITE.....	124
1. Evaluation de la neuropathie.....	124
2. Laser doppler perfusion imaging.....	125
3. Test de vasomotricité.....	125
IV. TISSUS HUMAINS.....	126
V. AUTRES TECHNIQUES.....	127
RESULTATS ET PERSPECTIVES.....	128
I. ROLE DE LA SIGNALISATION HH DANS L'ANGIOGENESE ET LA FONCTION VASCULAIRE POST-ISCHEMIQUE.....	129
A. Rôle de Shh dans l'angiogenèse post-ischémique.....	129
B. Rôle et régulation de Dhh dans la CE.....	137
C. Rôle de Dhh dans l'artériogenèse.....	142
II. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ICC CHEZ L'HOMME.....	149
1. Rationnel de l'étude.....	149
2. Résultats.....	150

3. <i>Discussion</i>	153
III. MISE AU POINT D'UN MODELE EXPERIMENTAL DE DIABETE ET D'ICC CHEZ LA SOURIS SE RAPPROCHANT DU PHENOTYPE HUMAIN	154
1. <i>Rationnel de l'étude</i>	154
2. <i>Résultats</i>	155
3. <i>Discussion</i>	168
IV. TEST DU POTENTIEL THERAPEUTIQUE D'UN AGONISTE DE LA VOIE HH AMELIORANT L'INTEGRITE DE L'ENDOTHELIUM : LE SAG	170
1. <i>Rationnel de l'étude</i>	170
2. <i>Résultats</i>	171
3. <i>Discussion</i>	177
V. MANUSCRITS	180
1. <i>Sonic Hedgehog endogène limite l'inflammation et l'angiogenèse dans le muscle squelettique ischémique de souris</i>	180
2. <i>Restaurer la fonction endothéliale en ciblant Desert Hedgehog en aval de Klf2 améliore le phénotype d'ischémie critique de membre chez l'adulte</i>	199
VII. PERSPECTIVES DE L'ETUDE	223
1. <i>Perspectives fondamentales</i>	224
2. <i>Perspectives cliniques</i>	226
ANNEXES	228
REFERENCES	230
RESUME	269

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURE 1. APERÇU MONDIAL DE LA SITUATION ACTUELLE ET ESTIMÉE DE LA PANDEMIE DIABETIQUE (IDF, 2017).....	17
FIGURE 2. LE SYSTEME VASCULAIRE.....	21
FIGURE 3. ORIGINE DES CELLULES ENDOTHELIALES - ADAPTE DE (JIN AND PATTERSON 2009)	24
FIGURE 4. PROCESSUS D'ANGIOGENESE - ADAPTE DE (GEUDENS ET GERHARDT 2011)	28
FIGURE 5. PROCESSUS D'ARTERIOGENESE	31
FIGURE 6. ORGANISATION MOLECULAIRE DES JONCTIONS ENDOTHELIALES (DEJANA 2004)	34
FIGURE 7. MECANISME D'ACTION DE eNOS EN CONDITION PHYSIOLOGIQUE - ISSU DE (MEZA ET AL. 2019)	37
FIGURE 8. DYSFONCTION ENDOTHELIALE ET DIABETE	46
FIGURE 9. NEUROPATHIE ET PIED DIABETIQUE	48
FIGURE 10. STRUCTURE DU MUSCLE STRIE SQUELETTIQUE	61
FIGURE 11. REGENERATION MUSCULAIRE DU MUSCLE DE SOURIS ADULTE	64
FIGURE 12. DEVELOPPEMENT DU RESEAU DE CAPILLAIRES SANGUINS DANS LE MUSCLE DE SOURIS ADULTE EN REGENERATION (DE J0 A J25 POST ISCHEMIE)	66
FIGURE 13. TECHNIQUES DE REVASCULARISATION CHIRURGICALE	68
FIGURE 14. MODIFICATION ET SECRETION POST-TRANSCRIPTIONNELLE DES PROTEINES HH	76
FIGURE 15. VOIES DE SIGNALISATION HH - ISSU DE (CHAPOULY ET AL. 2019)	78
FIGURE 16. STRUCTURE DU CIL PRIMAIRE	80
FIGURE 17. SCHEMA DE LA STRUCTURE COMPARATIVE DES FACTEURS DE TRANSCRIPTIONS GLI1, GLI2 ET GLI3 - ISSUE DE (C.-C. HUI ET ANGERS 2011)	82
FIGURE 18. SITES D'ACTION DES DIFFERENTS INHIBITEURS PHARMACOLOGIQUES DE LA VOIE DE SIGNALISATION HH - INSPIRE DE (ONISHI ET KATANO 2011; M. HUI ET AL. 2013)	85
FIGURE 19. SITES D'ACTION DES PRINCIPAUX AGONISTES PHARMACOLOGIQUES DE LA VOIE DE SIGNALISATION HH - ADAPTE DE (RUAT ET AL. 2014).....	87
FIGURE 20. STRUCTURES DES PRINCIPALES MOLECULES AGONISTES DU RECEPTEUR SMO ET REGULATION DES VOIES DE SIGNALISATION HH NON CANONIQUES PAR LES MODULATEURS DE SMO.....	89
FIGURE 21. SCHEMA REPRESENTANT LES PRINCIPAUX EVENEMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA VASCULOGENESE INDUITE PAR LA SIGNALISATION HH ET LE REMODELAGE DU PLEXUS VASCULAIRE PRIMAIRE - ISSU DE (CHAPOULY ET AL. 2019)	93
FIGURE 22. SCHEMA REPRESENTANT LES PRINCIPAUX EVENEMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LA DIFFERENCIATION ARTERIELLE INDUITE PAR HH - ISSU DE (CHAPOULY ET AL. 2019)	95
FIGURE 23. SCHEMA REPRESENTANT LES PRINCIPAUX EVENEMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS L'ANGIOGENESE TUMORALE INDUITE PAR HH - ISSU DE (CHAPOULY ET AL. 2019)	101
FIGURE 24. SCHEMA REPRESENTANT LES PRINCIPAUX EVENEMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LE MAINTIEN DE L'INTEGRITE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE - ISSU DE (CHAPOULY ET AL. 2019)	104
FIGURE 25. EXCISION MEDIEE PAR CRE ET LE MECANISME DE CREER INDUCTIBLE - ISSU DE (COX ET AL. 2012)	113
FIGURE 26. EXCISION MEDIEE PAR CRE ET LE MECANISME DE CREER INDUCTIBLE DANS DES SOURIS ROSA ^{MT/MG} PRESENTANT UN ALLELE RAPPORTEUR CRE FLUORESCENT BICOLORE.....	117
FIGURE 27. MODELES CHIRURGICAUX	123
FIGURE 28. SCHEMA REPRESENTANT LES PRINCIPAUX EVENEMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LES EFFETS DE SHH ECTOPIQUE ET ENDOGENE DANS UN CONTEXTE ISCHEMIQUE	135
FIGURE 29. INVESTIGATION DU ROLE DE DHH DANS L'ARTERIOGENESE PHYSIOLOGIQUE DANS UN CONTEXTE D'ISCHEMIE DE MEMBRE INFERIEUR.....	145
FIGURE 30. SCHEMA REPRESENTANT LES PRINCIPAUX EVENEMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LE RECRUTEMENT ET LA DIFFERENTIATION DES CELLULES MURALES INDUITES PAR HH - ISSU DE (CHAPOULY ET AL. 2019).....	147
FIGURE 31. EVALUATION DU PHENOTYPE DE DEFAUT DE REPARATION TISSULAIRE ET DE PERFUSION CHEZ L'HOMME	152
FIGURE 32. CINETIQUES DU NOUVEAU MODELE DE LIGATURE SEQUENTIELLE	156
FIGURE 33. MISE EN PLACE D'UN MODELE EXPERIMENTAL D'ICC	159
FIGURE 34. LES SOURIS DIABETIQUES LEPR ^{Db/Db} SEMBLENT PARTIELLEMENT PROTEGEES CONTRE L'ISCHEMIE DE PATTE ..	160
FIGURE 35. TESTS COMPORTEMENTAUX DANS UN MODELE EXPERIMENTAL MURIN DE DIABETE ET D'ICC SE RAPPROCHANT DU PHENOTYPE HUMAIN	163
FIGURE 36. MISE EN PLACE D'UN MODELE EXPERIMENTAL MURIN DE DIABETE ET D'ICC SE RAPPROCHANT DU PHENOTYPE HUMAIN	166
FIGURE 37. CONFIRMATION DE LA PERENNITE DE L'ICC DANS LE MODELE EXPERIMENTAL MURIN DE DIABETE ET LIGATURE SEQUENTIELLE	167
FIGURE 38. LA THERAPIE SAG EST NON PRO-ANGIOGENIQUE	172
FIGURE 39. LA THERAPIE SAG CIBLE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE	175

FIGURE 40. L'ACTION DE LA THERAPIE SAG N'EST PAS DEPENDANTE DU SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE.....	176
FIGURE 41. SCHEMA DES PRINCIPAUX EVENEMENTS CELLULAIRES IMPLIQUES DANS LE MAINTIEN DE L'INTEGRITE DE L'ENDOTHELIUM PAR LA SIGNALISATION HH	179
ANNEXE 1. MESURES APRES IMMUNOMARQUAGE	229

TABLE DES TABLEAUX

TABLEAU 1. CLASSIFICATION CLINIQUE DE L’AOMI	55
TABLEAU 2. PRINCIPAUX ESSAIS CLINIQUES DE THERAPIE GENIQUE ET DE THERAPIE CELLULAIRE DANS L’ISCHEMIE CRITIQUE	72
TABLEAU 3. IDENTITE DES DIFFERENTES PROTEINES HH ENTRE ESPECES - INSPIRE DE (MARIGO ET AL. 1995; PATHI ET AL. 2001)	75
TABLEAU 4. FORCES DES FILAMENTS DE VON FREY (HTTP://WWW.BIOSEB.COM)	124
TABLEAU 5. RESULTATS DU TEST AU MONOFILAMENT DE VON FREY	161
TABLEAU 6. RESUME DES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES MODELES D’ISCHEMIE.....	170

INTRODUCTION

Le travail expérimental supporté par cette thèse s'intéresse à la physiopathologie de l'ischémie critique du membre inférieur, et tout particulièrement au rôle de la signalisation des membres de la famille des morphogènes Hedgehog (Hh) dont Sonic Hedgehog et Desert Hedgehog. Cette thèse explore de nouvelles pistes thérapeutiques pour revasculariser et régénérer les tissus ischémiques, elle explore notamment l'effet des ligands Hh sur l'angiogenèse médiée par l'ischémie artérielle et le rôle de Dhh-Klf2 au niveau des cellules endothéliales dans différents modèles d'ischémie artérielle. L'introduction, structurée en 4 chapitres, présente successivement le diabète, l'ischémie critique chronique, les voies de signalisation Hh et enfin le lien entre ces voies de signalisation Hh et les vaisseaux, afin de permettre de situer l'objectif de ce travail de recherche.

I. DIABETE

A. Généralités

La progression du diabète revêt une allure **pandémique** avec 422 millions de personnes touchées à travers le monde, 3.5 millions de personnes touchées en France, et une atteinte préférentielle des pays industrialisés ou en voie de développement en lien avec une occidentalisation du mode de vie et le vieillissement des populations (WHO 2020). De plus, les sujets atteints sont de plus en plus jeunes (**Figure 1**).

Il s'agit d'une carence ou d'un défaut d'utilisation de l'**insuline** qui entraîne un excès de sucre dans le sang. L'insuline est une hormone produite par le pancréas qui permet au glucose contenu dans les aliments d'être utilisé par les cellules de l'organisme afin qu'elles disposent de l'énergie nécessaire à leur fonctionnement. Si l'insuline est insuffisante ou ne remplit pas son rôle, le glucose ne peut plus servir de source énergétique aux cellules et s'accumule dans le sang avant d'être éliminé dans les urines.

Le diabète de type 1 (diabète insulino-dépendant) représente 5 à 10% de la totalité des cas de diabète. Il apparaît généralement chez l'enfant ou chez le jeune adulte. Il se caractérise par une production insuffisante d'insuline suite à une destruction

des cellules B des îlots de Langerhans par le système immunitaire. Les symptômes sont les suivants : excrétion excessive d'urine (polyurie), sensation de soif (polydipsie), faim constante, perte de poids et asthénie.

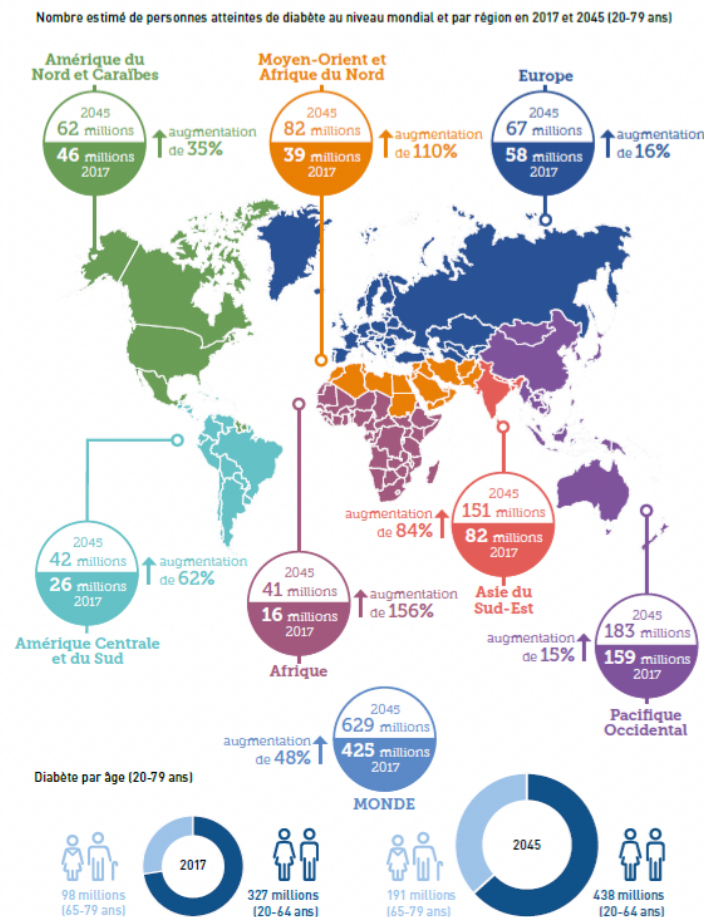


Figure 1. Aperçu mondial de la situation actuelle et estimée de la pandémie diabétique (IDF, 2017).

Le diabète de type 2 (diabète non insulino-dépendant) représente 90 à 95% des cas de diabète diagnostiqués. Il est bien établi que le risque de diabète de type 2 dépend à la fois de facteurs génétiques et environnementaux (populations autochtones, latino-américaines, asiatiques et d'origine africaine). Les facteurs génétiques jouent un rôle indéniable dans la survenue du diabète de type 2 puisque l'héritabilité du diabète de type 2 est estimée entre 20 et 80 % suivant les études (Hartemann et Grimaldi 2019). Cependant, les variations ethniques semblent être attribuables aux facteurs environnementaux et culturels, et dans une moindre mesure à des variants génétiques de prédisposition. En effet, même s'il existe des gènes de prédisposition à l'insulino-résistance, le surpoids/l'obésité, un manque d'activité physique ainsi qu'une alimentation riche en graisses contribuent à son apparition. En situation de

pléthore énergétique, le stockage des lipides dans le tissu adipeux se trouve dépassé et les lipides sont stockés de manière ectopique au niveau des muscles, du foie (engendrant une stéatose hépatique), et du pancréas (entraînant une obésité viscérale). Cette localisation ectopique des graisses va induire une insulino-résistance au niveau des muscles et du foie, notamment par lipotoxicité. Cette insulino-résistance induit un stress majeur pour les cellules bêta-pancréatiques qui augmentent leur sécrétion d'insuline pour surmonter le défaut d'action de l'insuline sur ses cellules cibles. Cependant, avec le temps, la capacité de sécrétion d'insuline des cellules B pancréatiques va s'affaiblir et en conséquence la glycémie va augmenter, conduisant à l'apparition d'une intolérance au glucose, d'une hyperglycémie puis d'un diabète.

Les symptômes peuvent être similaires à ceux du diabète de type 1 mais sont souvent moins marqués. De ce fait, la maladie peut être diagnostiquée plusieurs années après son apparition, lorsque les **complications** commencent à apparaître.

B. Mécanismes physiologiques et physiopathologiques du système vasculaire

Le diabète provoque 1.6 millions de décès/an et l'hyperglycémie entraîne 2.2 millions de décès/an (WHO 2020). En effet, l'hyperglycémie chronique peut engendrer de graves complications dont la prise en charge implique d'importants enjeux humains et financiers :

- Les **complications microvasculaires (microangiopathie)** sont les plus fréquentes. Elles conduisent à la neuropathie, la néphropathie et la rétinopathie,
- Les **complications macrovasculaires (macroangiopathie)** représentent l'atteinte des artères musculaires, de l'aorte aux petites artères distales d'un diamètre supérieur à 200 µm. Elles sont responsables de pathologies cardiaques, d'accidents vasculaires cérébraux et d'atteintes vasculaires périphériques aussi appelées artériopathie oblitérante des membres inférieurs (AOMI),
- Une **immunodépression** qui est responsable d'une susceptibilité accrue à certaines infections.

En réalité, le terme de macroangiopathie regroupe deux pathologies artérielles distinctes :

- D'une part, l'**athérosclérose**, qui semble histologiquement identique à l'athérosclérose du patient non diabétique, mais dont la prévalence et la sévérité sont plus importantes,
- D'autre part, l'**artériosclérose**, caractérisée par une prolifération endothéliale et une dégénérescence de la média aboutissant à la **médiacalose**, plus spécifique des patients diabétiques et hémodialysés.

Ces lésions provoquent une diminution de la lumière artérielle (**sténose**), pouvant aboutir à une **thrombose**, et par conséquent à une diminution des apports sanguins au niveau, notamment, des membres inférieurs dans le cadre de l'AOMI. Ainsi, 29% des patients diabétiques de plus de 50 ans souffrent d'AOMI, soit une prévalence 2 à 5 fois supérieure à celle de la population générale (American Diabetes Association 2003).

L'artérite diabétique se caractérise par une atteinte préférentielle des petites artères, situées sous le genou. On parle dans ce cas d'**artérite distale** avec pour conséquence une diminution de la perfusion des muscles et des tissus cutanés des extrémités, en particulier du pied. L'évolution peut être grave avec une majoration du risque d'amputation majeure par 5 par rapport à la population générale (American Diabetes Association 2003).

1. Organisation du système vasculaire

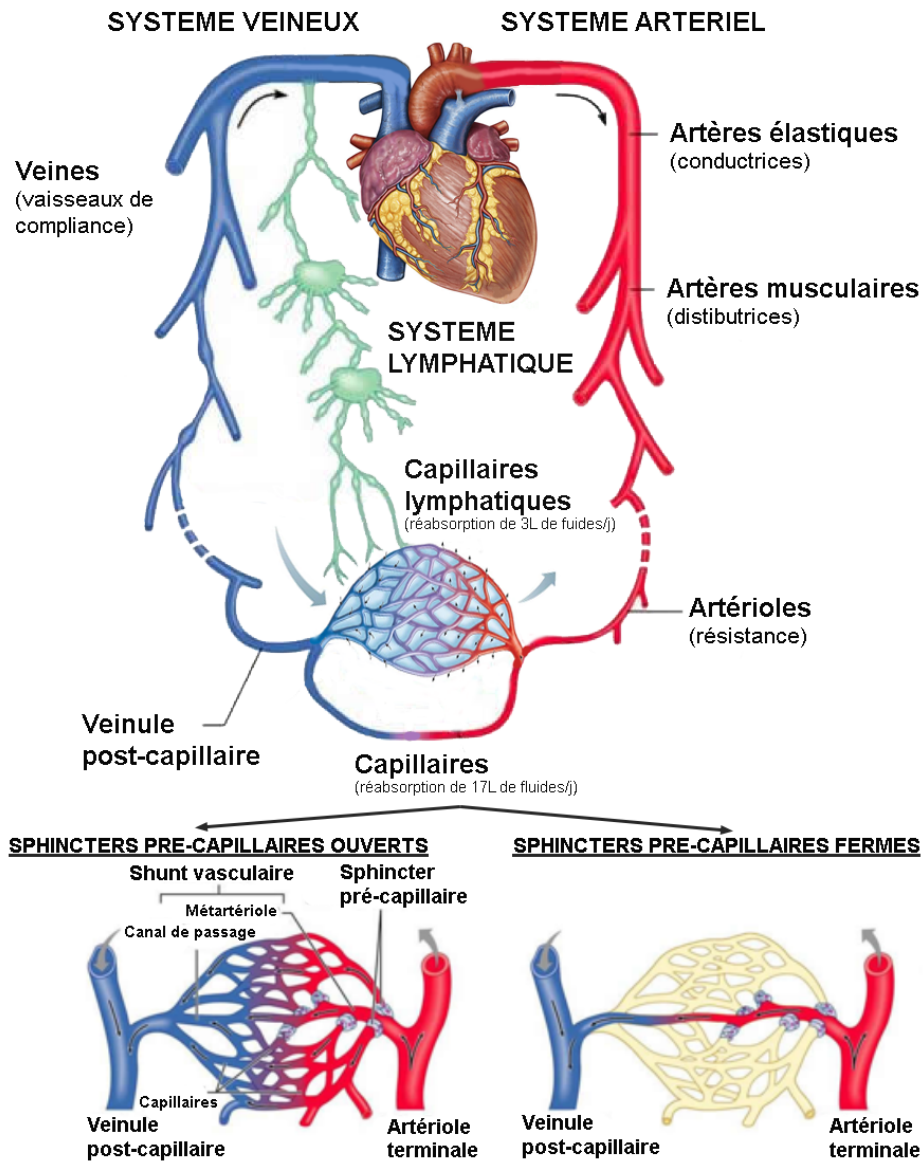
Le sang est transporté dans l'organisme par un réseau de vaisseaux sanguins :

- Les **artères**, qui transportent le sang en provenance du cœur, se ramifient en vaisseaux de plus en plus petits pour donner les artérioles.
- Le sang passe ensuite au niveau des **capillaires** sanguins, qui permettent les échanges entre le sang et le liquide interstitiel dans lequel baignent les cellules : ce sont eux qui assurent l'apport de nutriments et d'oxygène aux cellules et la prise en charge des déchets issus du métabolisme cellulaire.

- Puis, les veinules et les veines convergent et fusionnent pour former des vaisseaux de plus en plus gros qui ramènent le sang vers le cœur.

De plus, les vaisseaux sanguins fournissent des passerelles pour la surveillance immunitaire.

A. Organisation du système vasculaire - Adapté de (Reece et Campbell 2011)



B. Différentes tuniques des vaisseaux

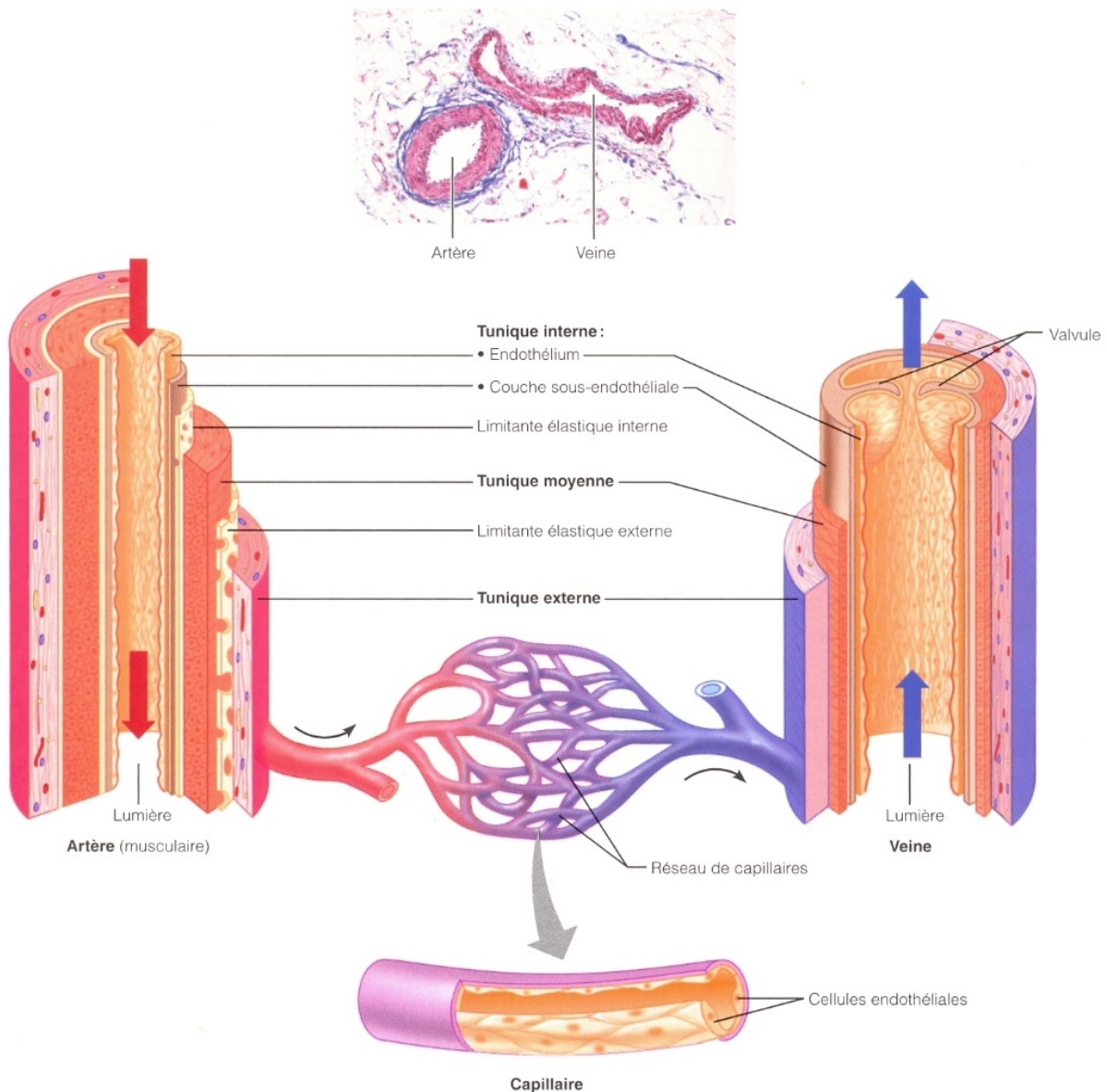


Figure 2. Le système vasculaire.

La paroi des artères et des veines est constituée de 3 tuniques entourant la lumière (Figure 2) :

- L'intima (tunique interne) : épithélium simple composé d'une monocouche de **cellules endothéliales** (CE) reposant sur une lame basale qui tapisse la lumière des vaisseaux, appelé **endothélium**, en continuité avec l'endocarde. Les vaisseaux de diamètre supérieur à 1mm présentent une couche sous-endothéliale constituée de tissu conjonctif lâche.

- La **media** (tunique intermédiaire) constituée de cellules musculaires lisses (CML) et de feuilletts d'élastine et encadrée par une limitante élastique interne et externe. Le muscle lisse vasculaire est sous le contrôle des neurofibres vasomotrices du Système Nerveux Autonome sympathique qui selon les besoins de l'organisme participent soit à la vasoconstriction soit à la vasodilatation. La tunique moyenne régit ainsi le débit et la pression du sang.
- L'**adventice** (tunique externe) est composée de fibres de collagène, dont les rôles sont de protéger les vaisseaux et d'attacher ceux-ci aux structures environnantes, de neurofibres, de vaisseaux lymphatiques et de minuscules vaisseaux sanguins (vasa vasorum) qui nourrissent les tissus externes de la paroi des gros vaisseaux.

Les **capillaires sanguins** sont les plus petits vaisseaux sanguins de l'organisme. Leur paroi est souple et fragile, composée d'une monocouche de CE et d'une couche clairsemée de péricytes, entourée d'une membrane basale simple structurée par quelques fines fibres de collagène.

2. Morphogenèse vasculaire

La formation des vaisseaux est un processus complexe qui se déroule au cours du développement embryonnaire mais également dans les organismes adultes dans des conditions physiologiques, de réparation, ou pathologiques.

La capacité à développer un réseau vasculaire collatéral en réponse à une hypoxie tissulaire est un élément déterminant de la réponse de l'organisme et conditionne fortement sa capacité à éviter ou limiter les complications ischémiques de la maladie diabétique. Or, le développement de néo-vaisseaux est considérablement réduit chez le diabétique atteint d'une insuffisance coronaire et/ou d'une AOMI ce qui constitue un élément d'explication de l'évolution sévère de ces pathologies chez le patient diabétique (Silvestre et Lévy 2006).

Trois processus non exclusifs ont été décrits pour expliquer la formation des vaisseaux : la **vasculogenèse**, l'**artériogenèse** et l'**angiogenèse**. Ces processus

nécessitent une régulation fine, faisant intervenir différents types cellulaires : des cellules souches et des cellules progénitrices mais aussi des cellules différenciées vasculaires ou non telles que les CE, les CML, les cellules inflammatoires, les fibroblastes, et de nombreux composants de la matrice extracellulaire. L'activation de ces processus résulte de la balance entre l'action de facteurs anti- et pro-angiogéniques. Un dérèglement de cette balance contribue à l'apparition de pathologies. Ainsi, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la morphogenèse capillaire est un enjeu majeur en terme thérapeutique.

2.1 La vasculogenèse, formation d'un réseau primitif

Chez l'embryon, le réseau vasculaire primitif se forme par l'assemblage de précurseurs endothéliaux dérivés du mésoderme : les hémangioblastes et angioblastes qui se caractérisent par l'expression de marqueurs de CE : Pecam1 (Platelet/endothelial cell adhesion molecule), aussi connue sous le nom de **CD31** (cluster de différenciation), de cellules souches CD34, du récepteur de type 1 et 2 du VEGF (vascular endothelial growth factor, VEGFR-1 et -2), de CD105 (endogline), du facteur von Willebrand, de l'ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine), la **VE-Cadh** ou **Cdh5** (vascular endothelial-cadherin-5), et de la P-sélectine (Swift et Weinstein 2009) (**Figure 3**).

Au cours de la vasculogenèse embryonnaire, le VEGFA, son récepteur VEGFR-2 et le FGF2 (Fibroblast Growth Factor) favorisent la différenciation des angioblastes, alors que l'activation du récepteur VEGFR-1 inhibe l'engagement des hémangioblastes dans cette voie (P. Carmeliet et al. 1996; Ferrara et Alitalo 1999).

La vasculogenèse est également régulée par les facteurs qui modulent les interactions entre les CE, les macromolécules de la matrice, la fibronectine ou les récepteurs matriciels dont l'intégrine $\alpha 5$ (Bader et al. 1998).

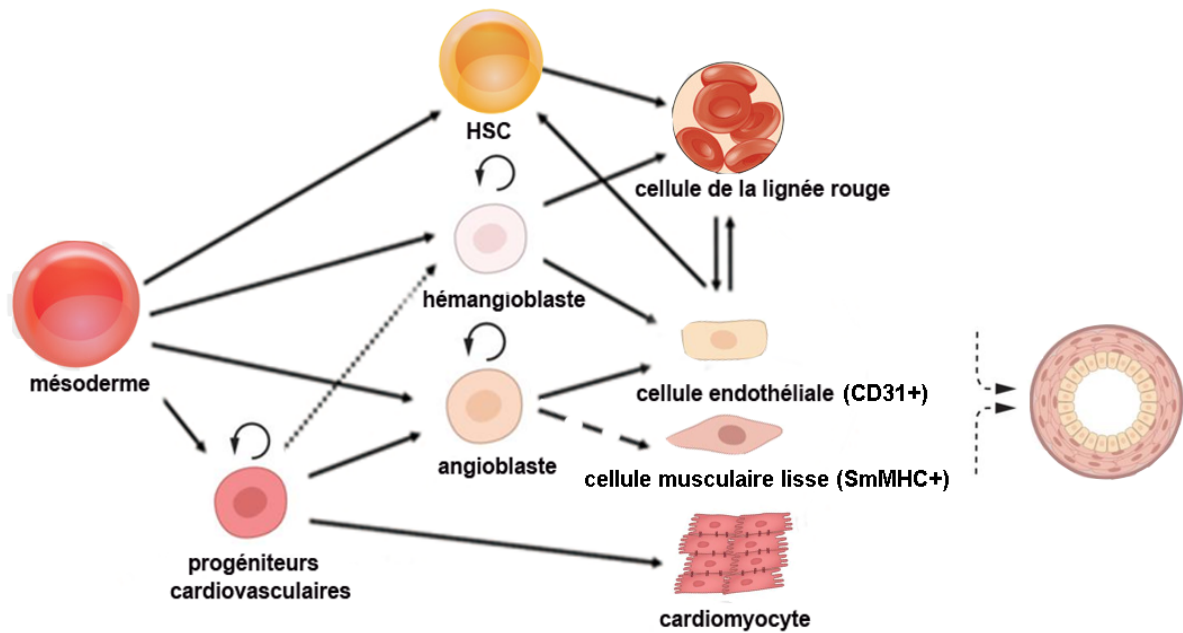


Figure 3. origine des cellules endothéliales - adapté de (Jin and Patterson 2009)

Différentes études montrent aujourd'hui que la vasculogénèse n'est pas limitée au développement embryonnaire. Des précurseurs endothéliaux ont été identifiés dans la moelle osseuse et le sang périphérique chez l'adulte : Le VEGFA, le CSF2 (granulocyte-macrophage Colony stimulating factor) et l'IGF1 (Insulin Like Growth Factor) stimulent la différenciation et le recrutement des précurseurs endothéliaux. Il a été décrit notamment que des progéniteurs peuvent coloniser les sites angiogéniques et les prothèses vasculaires chez l'adulte (Takahashi et al. 1999; Peichev et al. 2000).

2.2 L'angiogénèse

L'angiogénèse correspond à l'extension du réseau vasculaire par bourgeonnement à partir de vaisseaux préexistants. Chez l'adulte, les vaisseaux sont quiescents. Cependant, les CE conservent un haut niveau de plasticité qui leur permet de répondre aux signaux pro-angiogéniques afin de former des néo-vaisseaux (Adams et Alitalo 2007; Peter Carmeliet et Jain 2011).

D'autres mécanismes comme la division de vaisseaux préexistants ou **intussusception** sont également décrits (Makanya, Hlushchuk, et Djonov 2009; Fang et Salven 2011).

2.2.1. Vasodilatation, perméabilité endothéliale et support péri-endothélial

L'angiogenèse débute par une vasodilatation **NO** (monoxyde d'azote) dépendante, initiée par **HIF1 α** (Hypoxia Inducible Factor), puis la perméabilité vasculaire augmente en réponse au VEGFA et conduit à l'extravasation des protéines plasmatiques qui forment un support temporaire permettant la migration des CE à travers la paroi vasculaire. Pour migrer, les CE perdent leurs contacts inter-endothéliaux et se libèrent de leur support péri-endothélial.

La perméabilité vasculaire est finement régulée pour empêcher une fuite vasculaire excessive, délétère pour l'organisme. L'**Angpt1** (Angiopoïétine 1), un ligand du récepteur endothélial Tie2 (Tek endothelial-specific receptor tyrosine kinase), favorise la cohésion cellulaire, tandis que l'Angpt2, un inhibiteur de la signalisation transmise par le récepteur Tie2, est responsable de la déstabilisation du vaisseau (Thurston et al. 2000). Ce facteur libère les CML et induit la protéolyse matricielle (Maisonpierre et al. 1997; Gale et Yancopoulos 1999).

La protéolyse matricielle est régulée par plusieurs facteurs : les protéinases de l'activateur du plasminogène, les MMPs (matrix metalloproteinase) et les familles de la chymase et de l'héparinase. Des facteurs piégés dans la matrice extracellulaire sont alors libérés notamment le FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), le VEGFA et l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) (Coussens et al. 1999).

L'augmentation de perméabilité est également modulée par la formation de fenêtres et par la redistribution des protéines de jonction comme CD31 et la VE-Cadh.

2.2.2. Prolifération migration et différenciation des CE

Sous l'action des facteurs de croissance libérés par la protéolyse de la matrice extra cellulaire, les CE vont migrer et proliférer. D'autres éléments de la matrice extracellulaire comme les fragments peptidiques, la fibrine ou l'acide hyaluronique stimulent également la migration et la prolifération des CE.

Les facteurs de croissance impliqués dans la migration et la prolifération des CE peuvent être classés en sous catégories :

- La famille du **VEGF** et des **angiopoïétines** qui agissent spécifiquement sur les CE. Le VEGF stimule la migration et la prolifération des CE ; l'Angpt1 induit la maturation des vaisseaux en stimulant l'interaction entre les CE et les cellules péri-endothéliales, effet bloqué par l'Angpt2, antagoniste naturel de l'Angpt1 (Gale et Yancopoulos 1999; Suri et al. 1998).
- La famille des **cytokines**, des **chemokines** et des **enzymes angiogéniques**, qui activent un grand nombre de cibles cellulaires, parmi lesquelles les CE
- La famille de molécules agissant de façon indirecte en favorisant la libération de facteurs angiogéniques par les macrophages, les CE ou les cellules tumorales. Les facteurs les plus importants sont le **TNF α** (Tumor necrosis factor) et le **TGFB1** (Transforming Growth Factor).
 - o *In vivo*, le TGFB1 stimule l'angiogénèse et l'expression du TNF α , du FGF2, du PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et du VEGF en attirant les cellules inflammatoires (Lindahl et al. 1998; Zhou et al. 1998).
 - o Le TNF α , lui, stimule l'expression du VEGF, de son récepteur, et d'autres facteurs pro-angiogéniques par les CE, comme le CXCL8 (C-X-C motif chemokine 8) et le FGF2 (Guo et al. 2000).

Le processus d'invasion cellulaire, de migration et de prolifération ne dépend pas uniquement des enzymes, des facteurs de croissance et de leurs récepteurs ; il dépend aussi de molécules d'adhésion cellulaire.

Au cours de la migration, les interactions entre les CE et la matrice extracellulaire sont contrôlées par les intégrines notamment l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ qui relocalise MMP2 (Matrix Metalloprotéinase 2) à la surface des CE.

Les interactions cellule-cellule sont réalisées par CD31 (Ilan et al. 1999), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule) et VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule), la P-selectin et l'E-selectin (Koch et al. 1995) ainsi que l'EFNB2 (Wilkinson 2000).

La migration et la prolifération des CE sont contrôlées par l'équilibre entre les facteurs activateurs, décrits précédemment, et des facteurs inhibiteurs, comme le PLG (plasminogen), l'endostatine (Collagen, type XVIII, alpha 1), l'antithrombine III, l'interferon β , le LIF et le facteur plaquettaire 4 (O'Reilly et al. 1994; 1997).

Différents types de CE spécialisées, chacune avec des fonctions distinctes, sont nécessaires pour le bourgeonnement des vaisseaux (Siekman et Lawson 2007) :

- La « **tip cell** » (cellule de pointe) émet des filopodes lui permettant d'explorer l'environnement à la recherche de signaux attractifs ou répulsifs, et migre dans la matrice extra-cellulaire dégradée,
- Les « **stalk cell** » restent alignées et jointives derrière la « tip cell » de façon à allonger progressivement le bourgeon vasculaire par des divisions mitotiques successives.

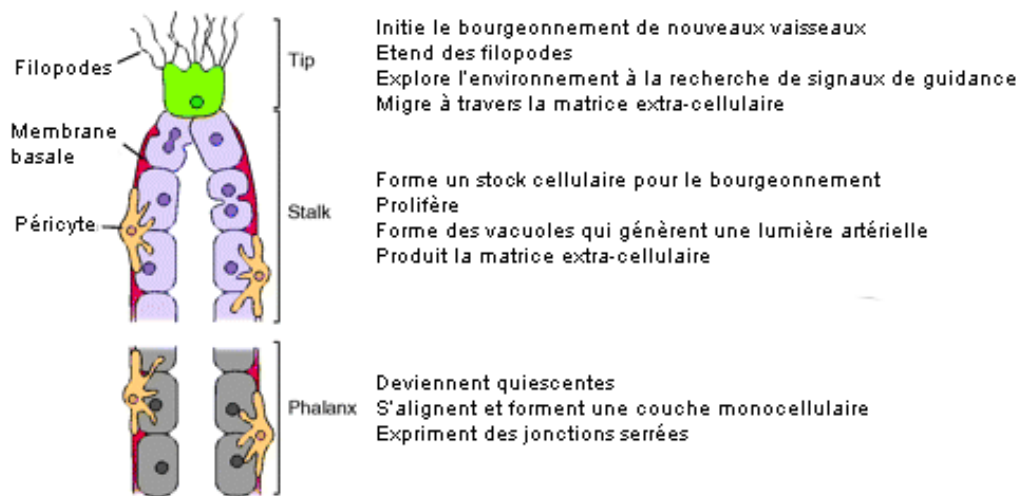
Cette différenciation des CE est contrôlée par le système Notch/Dll4 (Delta-like 4)(Hellström et al. 2007). La « tip cell » surexprime Dll4 en réponse au VEGF ; en se liant aux récepteurs Notch de la « stalk-cell », Dll4 réprime l'expression du VEGFR-2 ce qui diminue la réponse migratoire. La « stalk cell » s'engage alors dans une réponse mitogène. Le système Notch/Dll4 agit ainsi comme un régulateur très fin de la croissance vasculaire (**Figure 4**).

Après avoir migré et proliféré, les CE s'assemblent en **tubes capillaires** au sein desquels se forme la lumière vasculaire. Le VEGFA₁₈₉ diminue le diamètre de la lumière des vaisseaux alors que le VEGFA₁₂₁ et le VEGFA₁₆₅ ainsi que leurs récepteurs

stimulent la formation de la lumière vasculaire en plus d'augmenter la longueur des vaisseaux.

Les **macrophages** facilitent les nouvelles connections entre bourgeons vasculaires en promouvant le contact entre les filopodes des « tip cells ».

A. Différentes cellules endothéliales impliquées dans l'angiogenèse



B. Angiogenèse par bourgeonnement

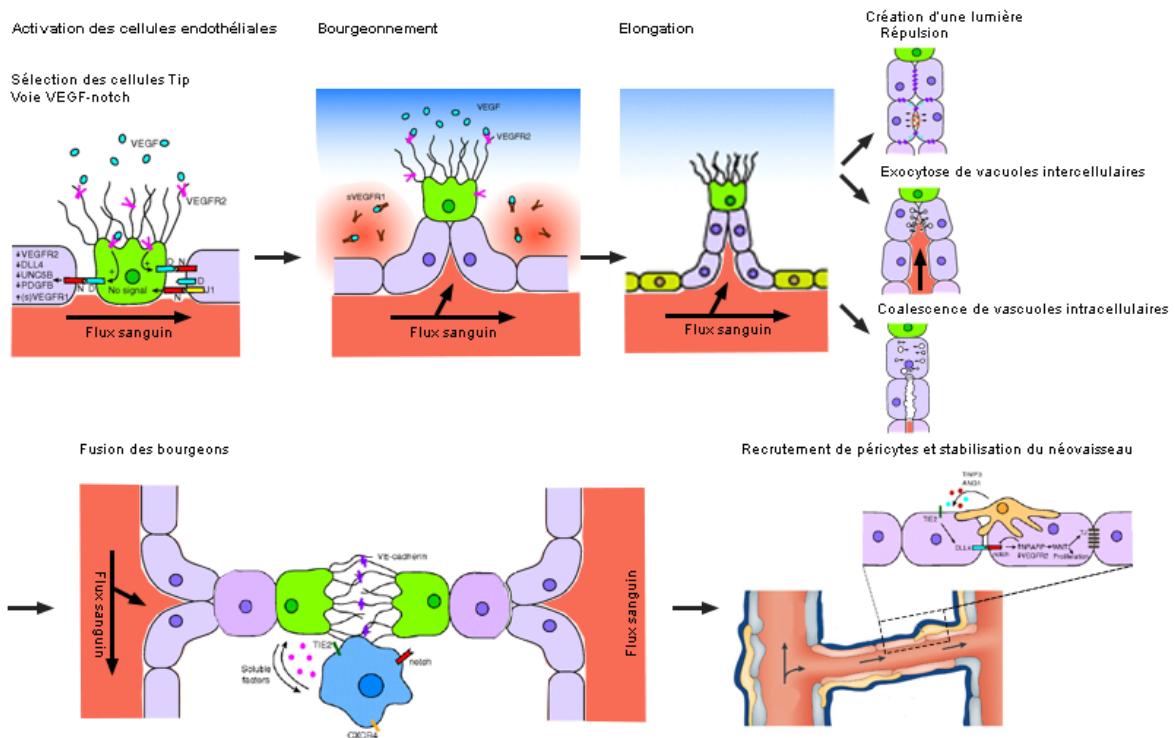


Figure 4. Processus d'angiogenèse - adapté de (Geudens et Gerhardt 2011)

2.2.3. La maturation vasculaire

Les néo-vaisseaux subissent ensuite une maturation vasculaire, en lien avec l'augmentation de la **pression sanguine** et des **forces de cisaillement**, afin d'acquérir une structure plus stable et un calibre réglable (Wagenseil et Mecham 2009; Iruela-Arispe et Davis 2009). Cette maturation correspond au recrutement de **cellules murales** sur la surface externe de ces vaisseaux, la lame basale les séparant des CE.

Tous les types de vaisseaux présentent des cellules murales, elles expriment les marqueurs NG2 (Neural/glial antigen), le PDGF-R β (récepteur β au PDGF), la desmine et l' α -SMA (actine musculaire lisse). Ces cellules murales sont importantes pour le développement et le maintien du réseau vasculaire, particulièrement la régulation de la perméabilité vasculaire.

En fonction de leurs caractéristiques, on distingue 2 phénotypes de cellules murales :

- Les **cellules musculaires lisses**, qui recouvrent les artères et les veines et ont une fonction vasomotrice et de production de matrice extracellulaire leur permettant d'acquérir une résistance à la pression (Potente, Gerhardt, et Carmeliet 2011). Elles forment des couches concentriques autour de l'endothélium et constituent la media des gros vaisseaux.
- Les **péricytes**, qui forment une mono-couche de cellules autour des vaisseaux de diamètre plus petit (artérioles, capillaires et veinules). Ils assurent une fonction trophique et de survie des CE (Hoch et Soriano 2003) et participeraient à la communication intercellulaire et à l'échange de signaux entre les CE. Ils sont associés beaucoup plus étroitement avec l'endothélium, et partagent notamment sa membrane basale qu'ils l'ont aidé à synthétiser (Armulik, Abramsson, et Betsholtz 2005). Ils peuvent présenter des communications directes péricytes-endothélium au niveau de certaines régions dépourvues de lame basale. Les péricytes peuvent recouvrir une partie du vaisseau ou l'entourer totalement (Gaengel Konstantin et al. 2009). Le taux de recouvrement des vaisseaux par les péricytes varie en fonction des organes et reflète leurs besoins et fonctions : dans la rétine, où la perméabilité

vasculaire est très finement régulée, le ratio péricyte/CE est de 1:1, tandis que dans le muscle squelettique le ratio péricyte/CE est de 1:100.

Ces cellules murales sont issues de cellules progénitrices circulantes ou migrent depuis les vaisseaux préexistants. Elles sont recrutées par différents facteurs produits en partie par les CE, comme le PDGF- β ou le VEGFA (P. Carmeliet 2000), qui sont chimiotactiques pour les CML. D'autres facteurs, comme l'Angpt1, stabilisent les vaisseaux en facilitant l'interaction entre les CE et les cellules murales (M. Thomas et Augustin 2009). De plus, l'Angpt1 stimule la signalisation du TGF- β qui favorise la différenciation des CML tout en inhibant la prolifération et la migration des CE (Pepper 1997). Les molécules de la matrice extracellulaire, comme le collagène, la laminine, la fibronectine, l'élastine, les glycosaminoglycanes, les protéoglycanes et les molécules d'adhésion participent également à la maturation, la différenciation et la stabilisation endothéliale (Stringer 2006; Rhodes et Simons 2007).

2.3 L'artériogenèse

L'artériogenèse correspond à l'augmentation du diamètre des collatérales artérielles néoformées ou préexistantes. Ce processus est sous le contrôle de facteurs mécaniques, de cytokines et de récepteurs d'adhésion cellulaire. L'artériogenèse est liée à l'augmentation de la pression dans les vaisseaux, qui augmente le flux sanguin et donc les forces de cisaillement au niveau de l'endothélium (Prior, Yang, et Terjung 2004). En réaction, les vaisseaux augmentent de diamètre jusqu'à ce que les forces de cisaillement se normalisent. Cela conduit à la production par l'endothélium de molécules induisant l'augmentation du diamètre des vaisseaux ; parmi elles, la MCP1 (monocyte chemoattractant protein) qui augmente l'attachement des monocytes à la paroi vasculaire, le TNF α qui fournit un environnement inflammatoire à ces cellules, le FGF2 qui stimule les mitoses dans les CE et les MMP qui réarrangent l'espace autour des artères pour favoriser leur expansion (Van Royen et al. 2001). Une fois que les forces de cisaillement retrouvent un niveau stable, le NO participe à son tour à l'artériogenèse en réponse à l'augmentation du flux sanguin (Tronc et al. 1996) (**Figure 5**).

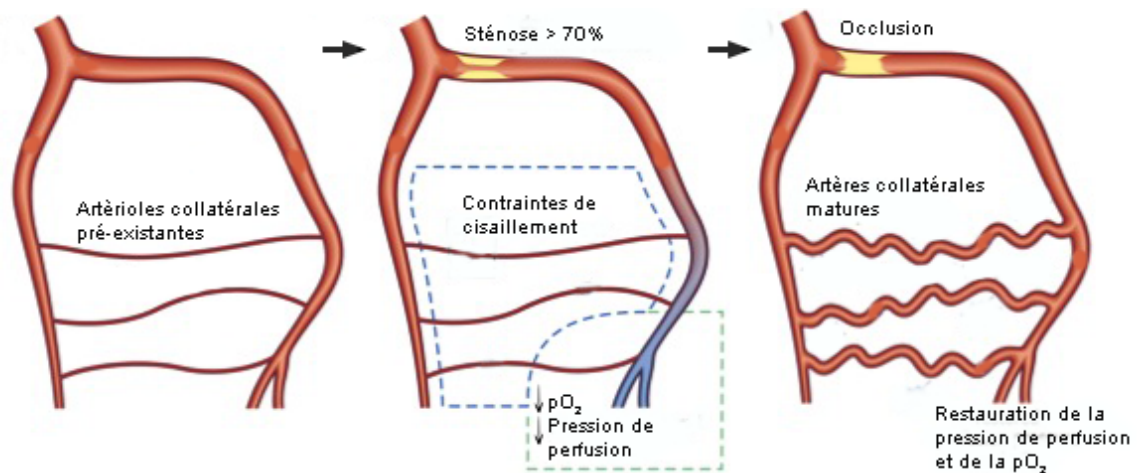


Figure 5. Processus d'artériogénèse

3. Fonction endothéliale

Longtemps estimée comme une épaisseur inactive entre le sang et la paroi des vaisseaux sanguins, l'endothélium est maintenant considéré comme un organe à part entière, jouant un rôle important dans le contrôle de nombreuses fonctions physiologiques. L'endothélium vasculaire n'agit donc pas seulement en tant que barrière entre la lumière vasculaire et l'espace interstitiel mais est un véritable système régulateur en réponse à des stimuli physiologiques et pharmacologiques flux-dépendants ou à l'expression de facteurs neuro-hormonaux.

Ainsi, en réponse aux stimuli, les CE synthétisent et libèrent de nombreux facteurs qui sont impliqués dans l'angiogénèse, l'hémostase, la perméabilité, la vasomotricité et le remodelage vasculaire (croissance et migration des CML), l'inflammation (en contribuant à la capture, l'adhésion et la diapédèse des leucocytes), et la fonction plaquettaire.

3.1. Perméabilité

L'endothélium constitue une barrière semi-perméable et hautement sélective entre le flux sanguin et l'espace interstitiel grâce aux jonctions inter-CE (Cahill et Redmond 2016) qui restreignent le passage des macro-molécules et protéines à travers la barrière endothéliale. Il y a une diffusion passive de molécules de taille inférieure à 3nm à travers les jonctions, tandis que les protéines de haut poids

moléculaire, comme l'**albumine** (67kDa, représentant 75% des protéines plasmatiques) et les cellules sanguines, sont retenues dans la circulation. Les jonctions permettent ainsi le maintien de l'homéostasie entre le tissu interstitiel et le sang.

Les trois acteurs principaux sont les **jonctions communicantes**, les **jonctions serrées** et les **jonctions adhérentes**.

3.1.1. Les jonctions communicantes

Les jonctions communicantes permettent les échanges de petites molécules inter-CE et CE-CML, tandis que le passage de plus grosses molécules se fait via des canaux trans-endothéliaux ou par transcytose, assurée par les cavéoles.

Une jonction communicante fonctionnelle est composée de deux connexons situés dans la membrane plasmique de CE adjacentes. Les connexons sont des hexamères de 6 connexines, des protéines transmembranaires ayant plusieurs isoformes. En fonction de leur composition, les connexons possèdent des caractéristiques uniques concernant la conductance, la perméabilité et la communication. L'expression de la connexine dans la paroi vasculaire n'est pas uniforme et varie en fonction de la taille du vaisseau et de son type. Une délétion de connexine entraîne des malformations vasculaires importantes et une dysrégulation de la résistance vasculaire avec des hypo ou hypertensions artérielles (Brisset, Isakson, et Kwak 2009).

3.1.2. Les jonctions serrées

Les jonctions serrées forment l'essentiel des jonctions intercellulaires apicales des CE, créant une barrière semi-perméable entre les cellules et régulant la perméabilité para-cellulaire. La composition, la structure et la présence des jonctions serrées varient selon les lits vasculaires.

Les jonctions serrées sont ainsi plus présentes dans les artérioles alors que les veinules affichent plus de jonctions adhérentes. De même, la barrière hémato-

encéphalique (BHE) représente un cas de jonctions serrées particulièrement régulées et closes.

Les jonctions serrées sont composées de plusieurs protéines et molécules d'adhésion et sont ancrées au cytosquelette d'actine de la CE par les protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3 (zonula occludens). ZO-1 s'associe à de nombreuses protéines transmembranaires (claudine, occludine, et JAM-A (junctional adhesion molecule) impliquée dans la diapédèse leucocytaire), ou des protéines de liaison du cytosquelette (cinguline, β -caténine et indirectement la vinculine et la β -actine) (Matter et Balda 2003). Elle joue un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité des jonctions car une diminution de son expression est associée à une augmentation de l'extravasation de protéines plasmatiques dans l'espace interstitiel.

Grâce à leur prolongement cytoplasmique, les protéines d'adhésion se lient également à des protéines de signalisation, permettant la régulation dynamique de l'ouverture et de la fermeture de ces jonctions, ainsi que la transmission de signaux de signalisation aux CE (Dejana 2004). Par ailleurs, elles forment une sorte d'échafaudage permettant la liaison de plusieurs protéines effectrices, facilitant ainsi leur interaction.

3.1.3. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes jouent un rôle dans l'inhibition de contact de la croissance des CE, la transmigration leucocytaire et le passage des solutés présents dans la circulation sanguine. De plus, elles permettent la bonne organisation structurelle des néo-vaisseaux lors de l'angiogenèse. Elles sont formées de la protéine transmembranaire VE-Cadh. La VE-Cadh est associée à l' α -, la β - et la p120-catenin au niveau des jonctions adhérentes. De plus, d'autres protéines de jonction telles que la « Vinculin » interagissent avec les caténines et participent au processus d'adhésion médié par la VE-Cadh.

L'altération des jonctions adhérentes par une perte d'intégrité du complexe d'adhésion de la VE-Cadh est une des causes majeures d'œdème tissulaire en condition pathologique (Corada et al. 2001).

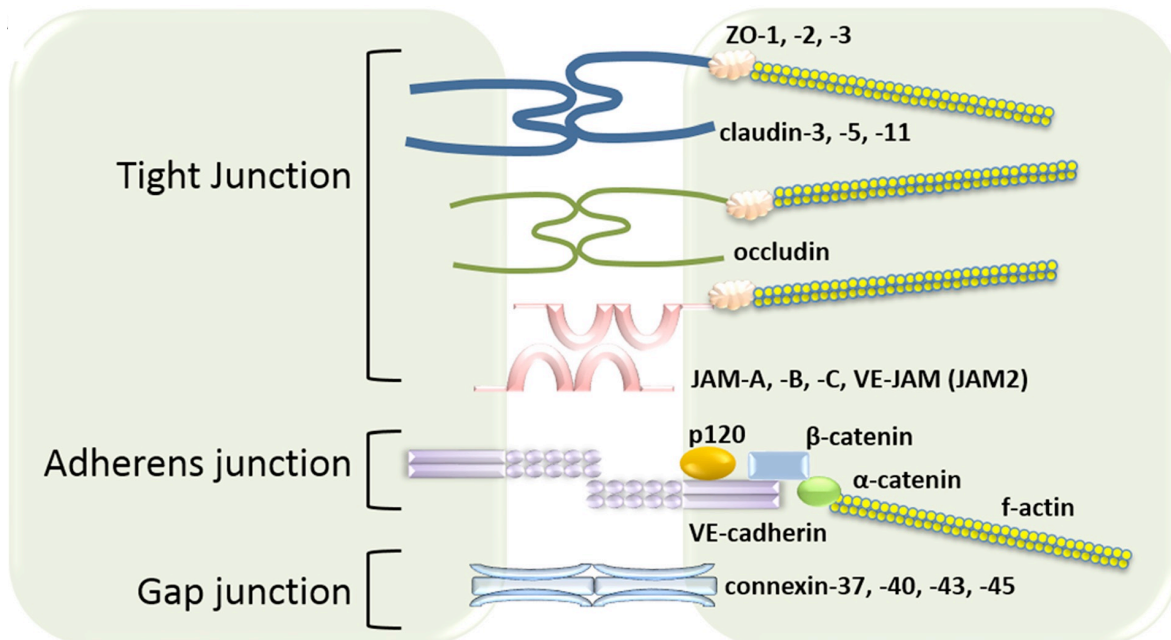


Figure 6. Organisation moléculaire des jonctions endothéliales (Dejana 2004)

3.2. Vasomotricité

En conditions physiologiques, l'endothélium peut moduler le tonus et la vasomotricité des CML sous-jacentes et influencer le débit sanguin tissulaire régional et la pression sanguine grâce à des facteurs vasodilatateurs ou vasoconstricteurs (Furchgott et Zawadzki 1980a). Afin de réguler la vasomotricité, le système nerveux et le système hormonal agissent sur les CML de façon directe ou indirecte via les CE et leurs récepteurs aux protéines G. Les CE sont activées par des **stimuli chimiques** tel que l'acétylcholine, la sérotonine, l'ADP (adénosine disphosphate), la vasopressine, les catécholamines ou des médiateurs de l'inflammation.

Un **stimulus mécanique** peut également entraîner l'activation des CE : les contraintes de cisaillement ou les forces induites par l'étirement des parois. Après cette stimulation, les CE vont être en mesure de sécréter des molécules vasodilatatrices ou vasoconstrictrices. Parmi les facteurs vasodilatateurs synthétisés

par l'endothélium, on distingue la PGI₂ (prostacycline), la bradykinine, le NO et l'EDHF (facteur endothélial hyperpolarisant), dont des dérivés de l'acide arachidonique, et les acides éicosatriénoïques particulièrement importants chez l'homme. Les facteurs vasoconstricteurs sont l'endothéline, les endoperoxydes, le TA₂ (thromboxane A₂), les anions superoxydes, l'AG II (angiotensine) et PAF (platelet activating factor).

Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est un radical libre gazeux produit par les CE qui a une demi-vie de quelques secondes dans le sang et diffuse dans un rayon d'une centaine de micromètres autour du lieu de sa synthèse.

Le NO est synthétisé au sein des CE à partir de la L-arginine grâce à une enzyme homodimérique la NOS (NO-synthase) qui permet son oxydation en NO et L-citrulline (Furchgott et Zawadzki 1980b; Kasprzak, Kłosińska, et Drozd 2006). Les monomères de NOS disposent d'un domaine réductase lui permettant la fixation des cofacteurs de la réaction (la FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), la FMN (Flavine Mononucleotide), le **NADPH** (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit)) et d'un domaine oxygénase composé de l'hème, la BH₄ (tétrahydrobiopterine) et le site de fixation de la calmoduline et de la L-Arginine.

La NOS est présente dans tout le tissu cardiovasculaire, et au sein de la cellule elle est essentiellement localisée au niveau de l'appareil de Golgi et dans les cavéoles.

Il existe trois isoformes de NOS, ayant 50 à 60% d'homologies :

- La NOS I (neuronale) : permet la production de NO dans les terminaisons axonales non adrénergiques et non cholinergiques du système nerveux autonome.
- La NOS II (inductible) : est exprimée sous le contrôle de nombreuses cytokines pro inflammatoires ou d'agents pathogènes.
- La NOS III ou **eNOS** (endothéliale) : est exprimée dans l'endothélium de manière constitutive et activée par un grand nombre de substances. Elle est essentielle pour garantir les propriétés de l'endothélium et la fonction vasculaire

Leurs spécificités résident dans leur expression et leur activation. Les nNOS et eNOS sont constitutivement exprimées et nécessitent une activation par des stimuli physiques ou chimiques, produisant une faible quantité de NO. Ainsi, leur activation est dépendante de la concentration en calcium et se fait via la liaison de seconds messagers tel que l'IP3 (inositol triphosphate 3) et le DAG (diacylglycérol) à un récepteur membranaire ou via les ionophores calciques. A l'inverse, la iNOS n'est pas exprimée constitutivement et est induite par des cytokines pro-inflammatoires notamment le TNF- α , l'IL-1 et l'interféron γ . Lorsqu'elle est exprimée et homodimérisée, il n'est pas nécessaire de l'activer et elle produit une forte quantité de NO.

Une grande partie du NO synthétisé par l'endothélium diffuse dans les CML où il va activer la guanylate cyclase. La guanylate cyclase dégrade le GTP (guanylate adénosine phosphate) en GMPc (Guanosine monophosphate cyclique) et son augmentation intracellulaire induit l'activation de la PKG (protéine kinase G). La PKG agit sur différentes cibles cellulaires en les phosphorylant. Ainsi, la phosphorylation du phospholambane lève son inhibition sur la Ca²⁺-ATPase (adénosine-triphosphatase) du réticulum endoplasmique (SERCA) ce qui facilite la recapture du calcium par le réticulum sarcoplasmique et la **relaxation musculaire** et par conséquent la vasodilatation artérielle (Moncada et Higgs 1991) (**Figure 7**).

De plus, il agit en inhibant la prolifération des CML et leur dédifférenciation qui est responsable de l'envahissement du sous endothélium dans le processus d'athérosclérose. Le NO diffuse également dans la lumière des vaisseaux sanguins et permet ainsi une diminution d'expression des molécules d'adhésion au pôle apicale des CE, ce qui limite l'adhésion des leucocytes à leur surface et inhibe l'agrégation plaquettaire.

Au total, le NO possède une action **anti-oxydante, anti-inflammatoire, anti-thrombotique, anti-proliférative et inhibitrice de la formation d'athérome** (Gkaliagkousi et Ferro 2011; Xiong et Hla 2014).

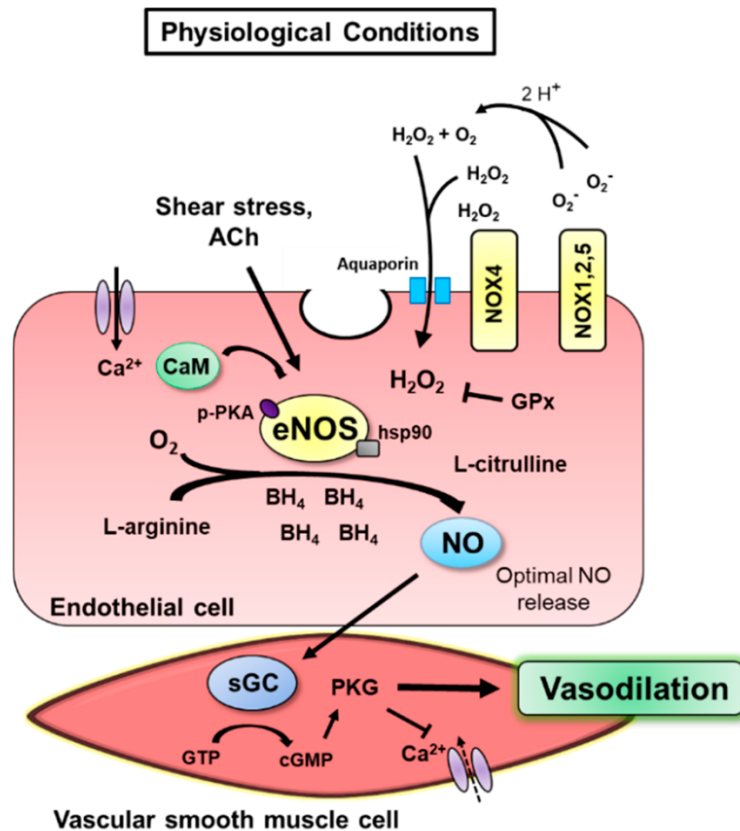


Figure 7. Mécanisme d'action de eNOS en condition physiologique - issu de (Meza et al. 2019)

Les forces de cisaillements et l'ACh (acétylcholine) augmentent les concentrations de calcium pour médier l'activation de eNOS dépendante de la CaM (calcium-calmoduline) et de la PKA (protéine kinase A). La PKA phosphoryle l'eNOS au niveau du résidu Ser-1177/Ser-1179 et la protéine de choc thermique 90 (hsp90) maintient la conformation activatrice de l'eNOS et libère l'eNOS de Cav-1 (calveolin) au niveau de la membrane plasmique. La L-arginine et l'O₂ (oxygène moléculaire) catalysent l'activation de l'eNOS, avec les cofacteurs BH₄ (tétrahydrobioptérine), FMN, FAD et NADPH (non représentés), pour produire du NO (oxyde nitrique) et de la L-citrulline. Le NO diffuse à travers l'endothélium et cible la sGC (guanylyl cyclase soluble) pour induire l'activation cyclique dépendante des GMP de la PKG (protéine kinase G) dans les CML vasculaires. La réduction ultérieure des concentrations intracellulaires de calcium entraîne une vasodilatation. Les NOX1, 2, 5 (NADPH oxydases 1, 2 et 5) génèrent du O₂⁻ (superoxyde), tandis que NOX4 produit du H₂O₂ (peroxyde d'hydrogène) qui traverse la membrane plasmique et est piégé par la GPx (glutathion peroxydase).

4. Dysfonction endothéliale

4.1. Activation des CE

Lors de l'activation de l'endothélium, ce dernier perd ses propriétés physiologiques et tend vers un état pro-inflammatoire, pro-coagulant et vasoconstricteur.

Les différents stimuli pouvant activer l'endothélium sont le **flux turbulent** (à l'inverse du flux laminaire qui permet une polarisation des cellules et un maintien de leur quiescence), les **cytokines pro-inflammatoires** et les **AGEs** (advanced glycation end-products) (J. K. Liao 2013).

En réponse à ces stimuli, les CE sont capables d'exprimer à leur membrane des molécules régulant le trafic de cellules inflammatoires circulant dans le sang, leur permettant d'adhérer entre elles. Le processus d'inflammation aiguë implique un recrutement rapide de **neutrophiles** et entraîne une activation du tissu endothélial.

Cette activation peut être divisée en deux phases :

- Une première phase rapide, indépendante de l'expression de nouveaux gènes,
- Une deuxième phase plus lente, dépendante de l'expression de nouveaux gènes.

Ces deux types d'activation partagent les trois mêmes composants principaux : une **augmentation du flux sanguin**, une **extravasation de protéines plasmatiques** dans le tissu interstitiel et un **recrutement et une activation des leucocytes** circulants afin qu'ils pénètrent sur le site de l'inflammation.

L'augmentation du flux sanguin permet une arrivée plus rapide des leucocytes sur le site de l'inflammation. L'extravasation de protéines plasmatiques crée alors une matrice provisoire pour aider à l'entrée des leucocytes et l'augmentation de l'adhésion facilite la capture et l'extravasation des leucocytes.

Dans les processus immunitaires et d'inflammation, cette expression de molécules adhérentes est importante pour agir rapidement au niveau du tissu touché. La cascade d'adhérence des leucocytes se compose de plusieurs étapes : le roulis Sélectine-assisté, l'adhérence, et la transmigration (Ley et al. 2007). En réponse à un stimulus inflammatoire, tel que le TNF, les CE alors activées expriment plus fortement les sélectines (protéines transmembranaires, notamment la E-sélectine), des intégrines, et des immunoglobulines. Les sélectines jouent un rôle important dans les premières phases d'adhésion et de capture des leucocytes au niveau de l'endothélium, car elles sont exprimées à la fois par les CE et les

leucocytes. Les intégrines, quant à elles, sont les récepteurs principaux de l'interaction cellule-matrice et les immunoglobulines participent activement à l'interaction cellule-cellule ce qui leur confère un rôle central dans les processus immunitaires et le maintien de l'intégrité vasculaire.

Les **molécules d'adhésion (CAM)** communément retrouvées sont VCAM, ICAM et PECAM (ou CD31).

4.1.1. Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)

VCAM-1 est une protéine de surface exprimée par les CE, les lymphocytes et les CML. Elle est impliquée dans l'adhésion intercellulaire de lymphocytes, monocytes, éosinophiles et basophiles, dans la migration leucocytaire et également dans la transduction des signaux. L'expression de VCAM-1 augmente en réponse à différentes cytokines pro-inflammatoires, notamment TNF α et IL-1. VCAM-1 est impliquée dans le recrutement des monocytes au niveau des plaques d'athérome.

4.1.2. Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1)

ICAM-1 est une molécule d'adhésion transmembranaire exprimée dans les leucocytes, les CE et les CML. Son taux basal est faible en conditions physiologiques, et augmente chez les patients atteints de pathologies cardiovasculaires. Son expression augmente en présence de médiateurs de l'inflammation tels que le TNF α ou l'IFN- γ . Elle est impliquée dans les processus immunitaires innés et inductibles. C'est également un médiateur de signalisation cellulaire et de transcription génique via une forme soluble (ICAM-1s). Tout comme VCAM-1, elle contribue à l'inflammation au niveau des CML et à la progression et la stabilité des lésions athéromateuses.

4.1.3. Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1 ou CD31)

PECAM-1, ou CD31, est une protéine exprimée à la surface des cellules hématopoïétiques et immunitaires telles que les plaquettes circulantes, les

monocytes, les neutrophiles ainsi que les cellules-T activées. De plus, comme décrit précédemment, il s'agit d'un composant essentiel des jonctions intercellulaires des CE. Elle joue un rôle dans le développement du système cardiovasculaire en contribuant à la transmission des signaux intracellulaires et elle participe également à l'angiogenèse, la fonction plaquettaire et la formation de thrombus, ainsi que la migration trans-endothéliale des leucocytes. Elle promeut les interactions de type homophylique CE-CE et hétérophylique CE-leucocytes mais reste peu connue au niveau des plaquettes et des leucocytes. Il a cependant été démontré que la régulation de l'expression de CD31 au sein des CE est constante et n'est pas modulée par l'exposition aux cytokines pro-inflammatoires, contrairement à ICAM-1 et VCAM-1 (Fong et al. 2016).

4.1.4. E-sélectine

La E-sélectine n'est pas exprimée en conditions physiologiques, c'est en présence de cytokines pro-inflammatoires que les CE produisent et transloquent cette molécule d'adhésion à la membrane plasmique. La production de la E-sélectine est stimulée par l'expression de la P-sélectine qui est elle-même induite par le TNF α , l'IL-1 et le LPS (lipopolysaccharide). Les forces de cisaillement peuvent également influencer sur l'expression de cette molécule. Les ligands de la E-selectine sont exprimés par différents types de cellules inflammatoires, tels que les neutrophiles, monocytes, lymphocytes et les cellules « natural killer ». C'est pourquoi elle est impliquée dans la réponse inflammatoire aigüe et chronique. Il a été montré que son expression est augmentée lors de syndromes coronariens aigus et dans les pathologies anévrysmales (Sandoval-Pinto et al. 2014; Jia et al. 2011).

4.2. Thrombogénicité

L'endothélium joue un rôle anti-thrombotique par l'intermédiaire de la PGI₂ (prostaglandine I₂) et du NO (R. C. Jin, Voetsch, et Loscalzo 2005) mais peut aussi synthétiser des facteurs pro-thrombotiques comme le TxA₂ (thromboxane) et exprimer des co-facteurs d'adhésion plaquettaire (facteur von Willebrand, fibronectine) ou pro-coagulants (facteur V) (Tanaka, Key, et Levy 2009).

Ainsi, en conditions physiologiques, l'endothélium permet le maintien de la fluidité sanguine et prévient l'activation des cellules circulantes, tandis qu'en cas de brèche vasculaire, il induit une série de réactions favorisant la formation de thrombus et la réparation de la paroi vasculaire.

5. Diabète et dysfonction endothéliale

La toxicité cellulaire de l'hyperglycémie chronique joue un rôle central dans l'apparition des complications micro et macrovasculaires, tout comme les phénomènes d'ischémie/reperfusion et les conséquences du syndrome métabolique en lien avec l'obésité (Selthofer-Relatić, Bošnjak, et Kibel 2016). Les hypothèses retrouvées sont : le rôle délétère de l'excès de sorbitol, la voie du diacylglycerol, la glycosylation non-enzymatique des protéines, les anomalies du potentiel d'oxydoréduction et une sécrétion inappropriée d'insuline considérée comme un stimulant possible de la prolifération des CML. Tout ceci aboutit à l'apparition d'une **dysfonction endothéliale** (Stratton et al. 2000) au cours de laquelle l'endothélium s'active. Il entraîne alors des perturbations fonctionnelles de la microcirculation avec une augmentation du débit et de la pression et une perte de l'autorégulation hémodynamique. Une tendance **thrombogène** et une augmentation de la viscosité sanguine apparaissent. Ces anomalies fonctionnelles aboutissent à un épaissement de la membrane basale, une diminution du nombre de péricytes, une augmentation de la **perméabilité vasculaire** et des **altérations de la vasomotricité** qui provoquent un œdème aboutissant à une **thrombose du capillaire**. Cette occlusion capillaire conduit à une hypoperfusion de la zone qui devient par conséquent ischémique et hypoxique (Afsar et al. 2018).

Ainsi, la dysfonction endothéliale est un facteur clé :

- de *pathologies vasculaires*, telles que l'hypertension artérielle (Ciuffetti et al. 2003), l'insuffisance cardiaque (Oka et al. 2014) ou l'athérosclérose (B.-J. Choi et al. 2014) (**Figure 8A**),
- mais aussi de *pathologies non vasculaires*, néanmoins caractérisées par une altération du système cardiovasculaire, telles que le diabète (Gonzalez-Quesada et al. 2013), l'insuffisance rénale chronique, ou même le vieillissement (Faber James E. et al. 2011).

5.1. Action pro-vasoconstrictrice

L'hyperglycémie et l'insulino-résistance sont responsables d'une dérégulation du transport de L-arginine (médié par l'insuline) (Avogaro, de Kreutzenberg, et Fadini 2008; Johnstone et al. 1993) ce qui entraîne une accumulation excessive de **ROS (espèces réactives de l'oxygène)**, et contribue à la diminution de la biodisponibilité du NO, avec une accumulation et une augmentation de la production de substances vasoconstrictrices (Dubó et al. 2016). Les ROS comprennent les radicaux oxygénés, comme l'anion superoxyde (O_2^-), les radicaux hydroxylés (OH) et les dérivés de l'oxygène (O_2), comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Le **stress oxydatif** est principalement causé par une dérégulation entre l'activité endogène des enzymes pro-oxydatives (NADPH ou nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydase) et anti-oxydatives (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase et hème oxygénase).

Par ailleurs, la production de ROS par l'endothélium est aussi augmentée en cas de diminution des forces de cisaillement, comme cela peut être observé dans le cadre d'une ischémie, par activation d'une cascade de signalisation conduisant à l'activation de la NADPH oxydase et à la régulation négative d'eNOS (Chatterjee et al. 2012; Birukov 2009) (**Figure 8B**) par diminution des phosphorylations activatrices, augmentation des phosphorylations inhibitrices ou **découplage de la eNOS**.

De plus, la dysfonction endothéliale entraîne une modification et une diminution des forces de cisaillement appliquées aux CE, responsable d'une diminution de l'expression génique d'eNOS ainsi que de son activité.

5.2. Action pro-thrombotique

Une autre conséquence de la dysfonction endothéliale est la perturbation de la balance hémostatique entraînant une altération de la viscosité sanguine et la formation de caillots. Ainsi, l'activation des CE induit une **adhésion des plaquettes** qui vont former des agrégats, relarguer du PDGF (platelet-derived growth factor) stimulant l'**hyperplasie myo-intimale** (Schäfer et Bauersachs 2008) mais aussi induire une adhésion des leucocytes et notamment des monocytes à l'endothélium

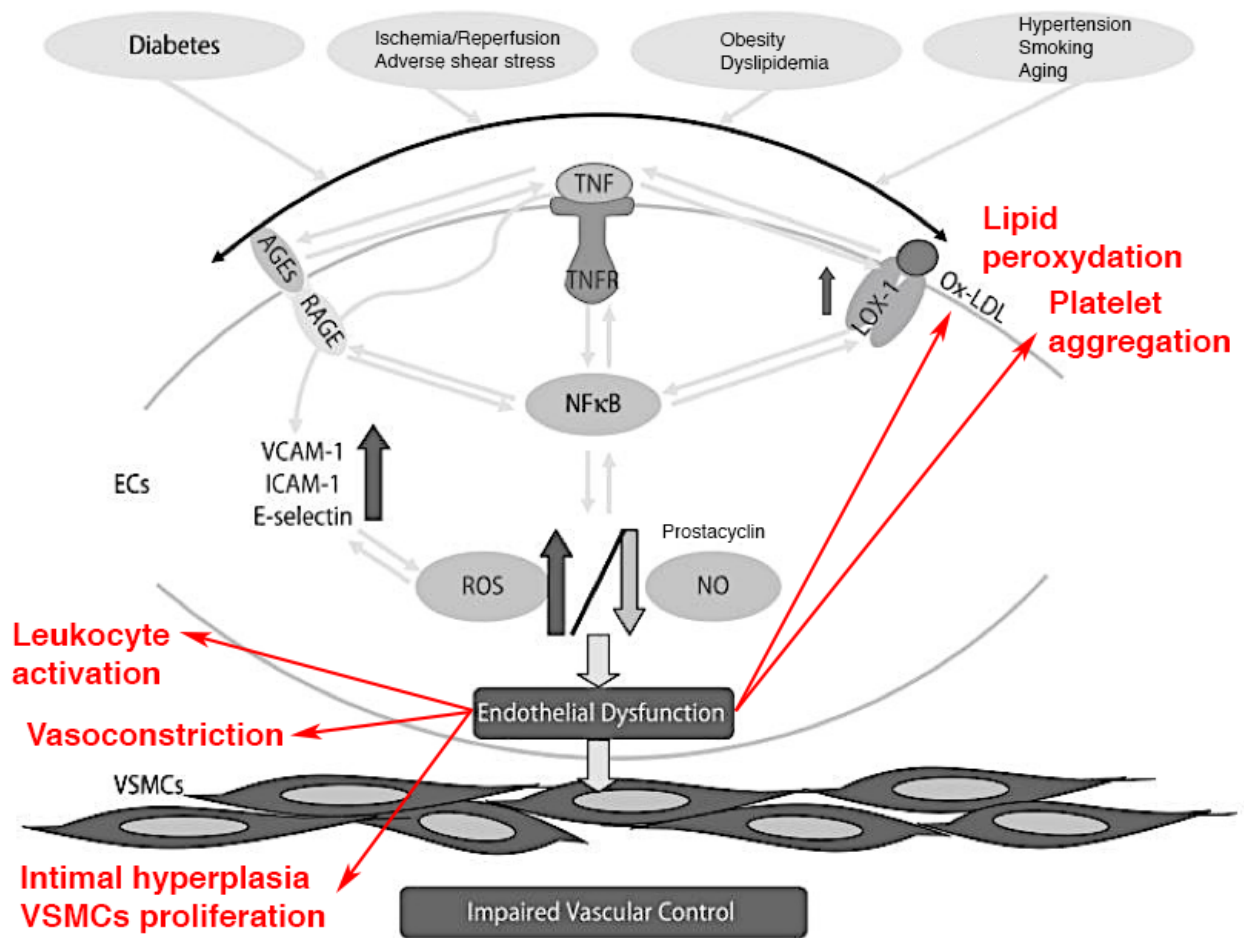
par augmentation des **molécules d'adhésion VCAM-1, ICAM-1 et E-sélectine**.

Les monocytes migrent alors vers l'intima, se transforment en macrophages et les ROS contribuent à l'oxydation du LDL-cholestérol (low density lipoprotein) qui est internalisé (Kaneto et al. 2010; Victor et al. 2009; Mitra, Goyal, et Mehta 2011) (**Figure 8C**). Par ailleurs, les CML migrent vers l'intima, perdent leur phénotype contractile pour acquérir des capacités sécrétoires, et internalisent des ox-LDL pour se transformer en **cellules spumeuses** (Ying Wang et al. 2019), constituant le core lipidique de la plaque à l'origine d'une réduction progressive du calibre de la lumière artérielle (**Figure 8D**). Ces cellules spumeuses peuvent également dériver des macrophages ; elles sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF et IL) entraînant l'activation de **NF- κ B** (facteur de transcription nucléaire).

5.3. Augmentation de la perméabilité vasculaire

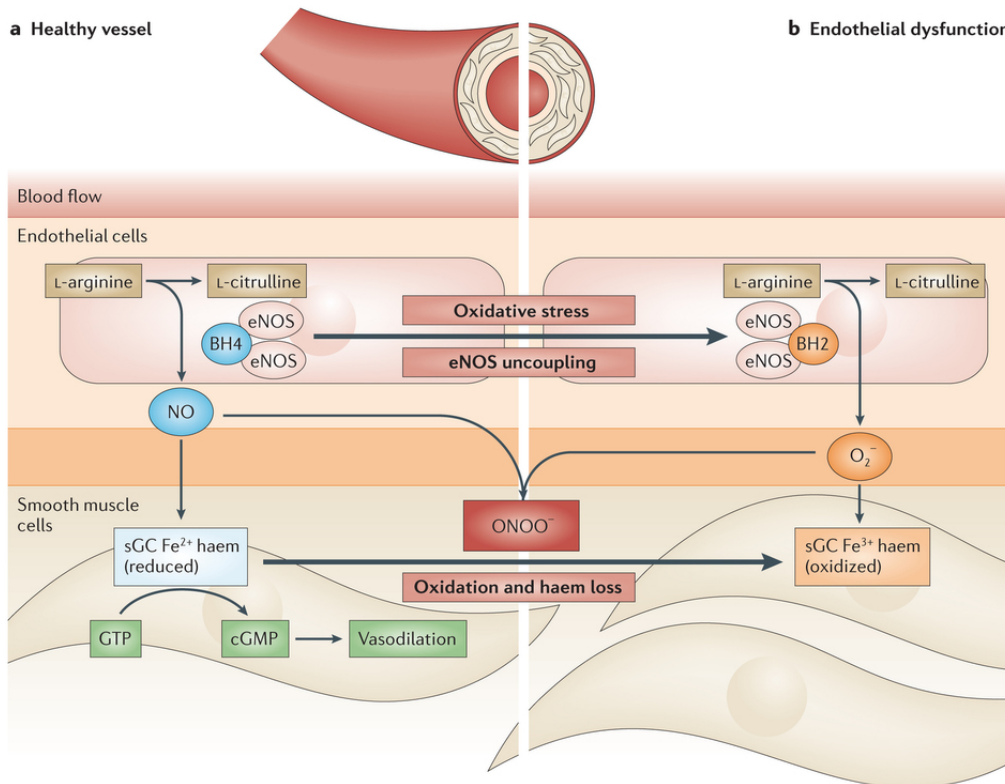
En outre, l'activation des CE par les médiateurs de l'inflammation induit une réorganisation et une **ouverture des jonctions intercellulaires serrées** et adhérentes (Lum et Malik 1996) impliquant une voie de signalisation médiée par la PKC, qui va être responsable d'une augmentation de la **perméabilité vasculaire** à l'eau ainsi qu'aux petites et grosses molécules (Michel et Curry 1999; Cahill et Redmond 2016).

A. Dysfonction endothéliale - adapté de (Zhang 2008)



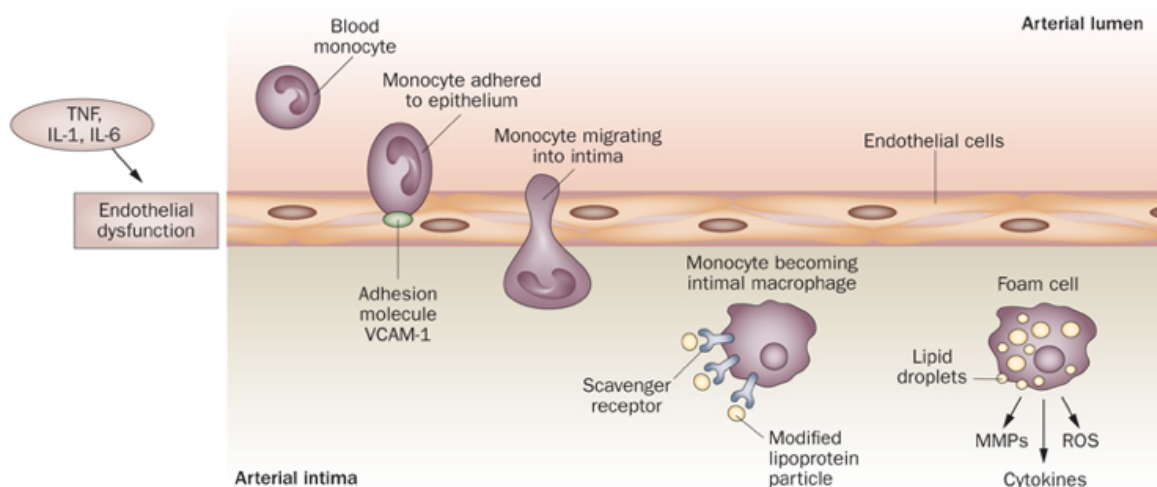
ECs cellules endothéliales, VSMCs, cellules musculaires lisses vasculaires, AGEs produits avancés de la glycation, RAGE récepteur des AGEs, TNF tumor necrosis factor, TNFR récepteur du TNF, NF-κB facteur nucléaire, ROS espèces réactives de l'oxygène, NO monoxyde d'azote, ox-LDL low density lipoprotein oxydée, LOX-1 récepteur Lectin-like ox-LDL, VCAM vascular cell adhesion molecule, ICAM intercellular cell adhesion molecule

B. Stress oxydatif - adapté de (Lundberg, Gladwin, et Weitzberg 2015)



BH4 Tetrahydrobiopterin, BH2 Dihydrobiopterin, NO nitric oxide, eNOS endothelial NO synthase, sGCFe²⁺ ferrous haem of Soluble guanylyl cyclase, GTP guanosine triphosphate, cGMP cyclic guanosine monophosphate, ONOO⁻ peroxynitrite, O₂⁻ Superoxide anion radical

C. Activation endothéliale entraînant l'expression de molécules d'adhésion pour les cellules inflammatoires - adapté de (Lundberg, Gladwin, et Weitzberg 2015)



TNF tumor necrosis factor, IL interleukine, ROS espèces réactives de l'oxygène, VCAM vascular cell adhesion molecule, MMPs matrix métalloprotéinases

D. Etapes de formation d'une plaque d'athéro-sclérose compliquée

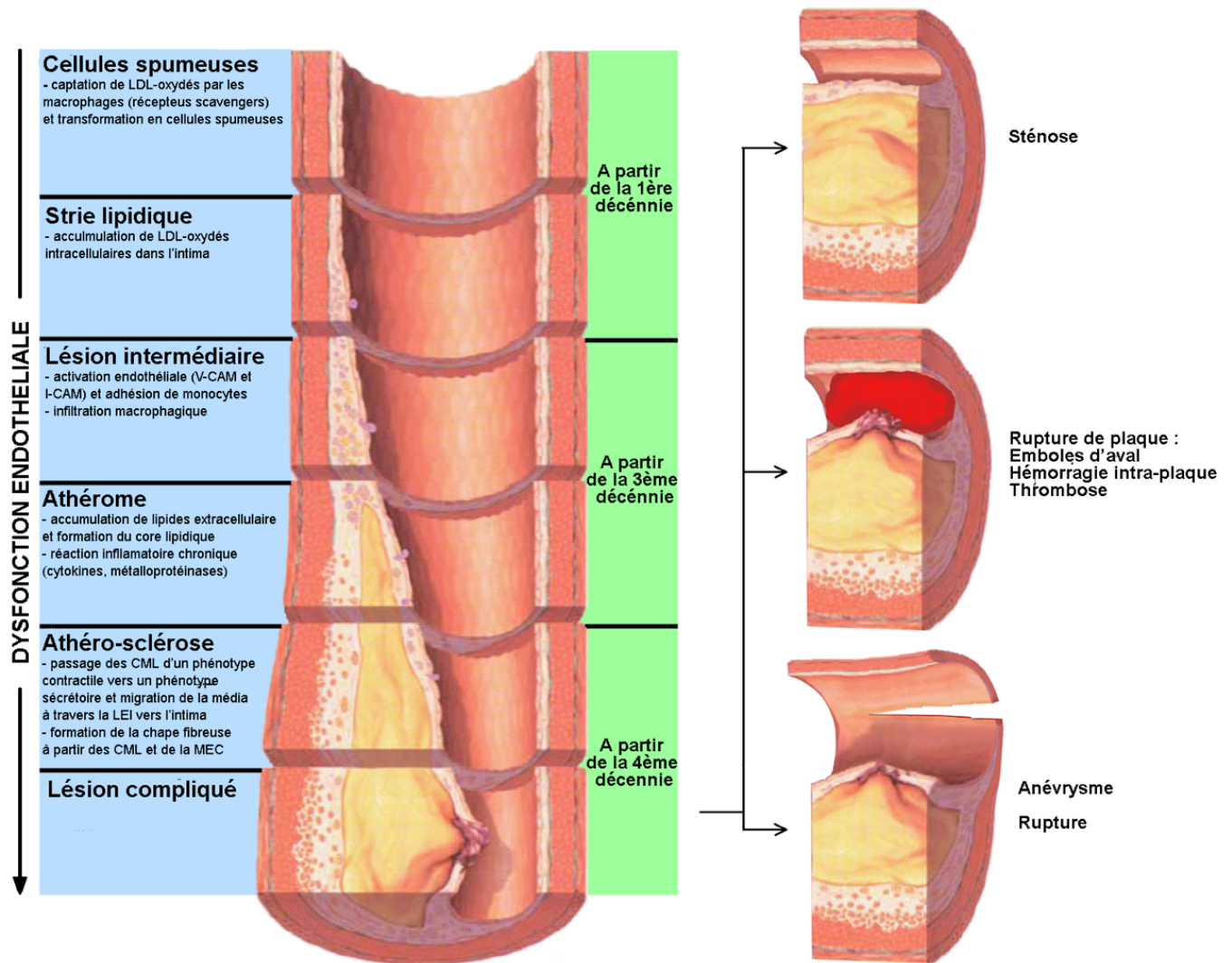


Figure 8. Dysfonction endothéliale et diabète

C. Neuropathie et pied diabétique

Le **pied diabétique** est une conséquence directe de la **neuropathie diabétique**, qui représente actuellement la cause de neuropathie la plus fréquente dans le monde industrialisé. Un mauvais contrôle glycémique et la durée du diabète en représentent les principaux facteurs de risque. Le polymorphisme clinique de la neuropathie diabétique est bien connu, la forme la plus fréquente étant la polyneuropathie distale symétrique, longueur-dépendante. Elle atteint environ 30 % des sujets diabétiques au moment du diagnostic (Edwards et al. 2008), avec des extrêmes allant

de 8 à 54 % dans le diabète de type 1 et de 13 à 46% dans le diabète de type 2 (Ziegler et al. 2008).

Elle est sensitive et s'accompagne souvent de troubles végétatifs. Les troubles sensitifs peuvent rester limités aux pieds, avec une anesthésie en « chaussettes », ou s'étendre vers la partie proximale des membres, et peuvent s'accompagner de douleurs distales.

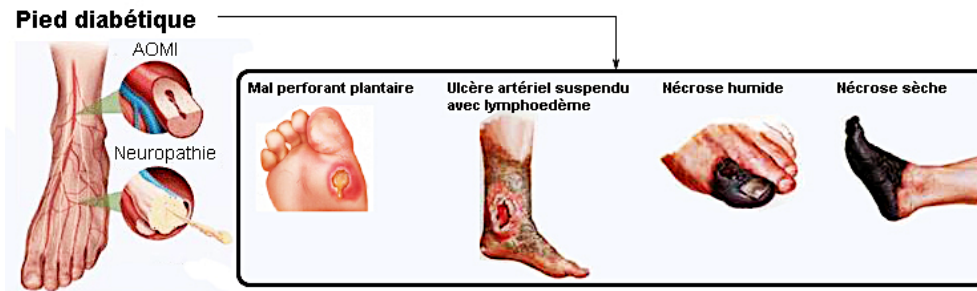
Deux types de mécanismes sont généralement invoqués pour expliquer la survenue de lésions nerveuses périphériques :

- **l'ischémie endoneurale** (Zochodne 2002), principalement impliquée dans les neuropathies focales elle est expliquée par la diminution du débit sanguin endoneuronal en lien avec une **vasculopathie inflammatoire**.
- et les **troubles métaboliques** qui seraient prépondérants dans les formes symétriques de neuropathie diabétique. Plusieurs mécanismes intriqués les uns aux autres ont été proposés pour expliquer l'effet toxique de l'hyperglycémie sur la cellule de Schwann et les axones : l'activation de la voie des polyols, la toxicité des produits terminaux de la glycation des protéines, le stress oxydatif, les facteurs vasculaires en particulier **l'ischémie chronique**, l'oxyde nitrique, les anomalies hémorrhéologiques, les facteurs de croissance, les facteurs immunologiques et enfin l'insuline.

Il existe **deux complications majeures de la neuropathie diabétique : la plaie chronique et le pied de Charcot (Figure 9)**. La plaie la plus caractéristique est le **mal perforant plantaire**, appelé par les anglo-saxons « ulcère neuropathique ». La neuropathie entraîne une hypoesthésie et favorise les déformations ostéo-articulaires avec l'apparition de points d'hyper-appui, mais aussi d'une xérose cutanée (en lien avec les troubles végétatifs) à l'origine d'une **hyperkératose**. Lors de la marche, une pression répétée sur cette zone va conduire à une dilacération des tissus mous, et à la formation d'hématomes ou de phlyctènes sous la corne. Une fissuration de l'hyperkératose crée une porte d'entrée vers ces collections, qui peuvent alors se surinfecter, et évoluer vers une dermo-hypodermite avec un tableau d'**érysipèle**, puis vers une **ostéo-arthrite**. Le traitement du mal perforant plantaire

repose sur le débridement et la mise en décharge, éventuellement associé à une antibiothérapie, probabiliste puis adaptée aux germes, en cas de collection profonde mise en évidence.

A. Le pied diabétique



B. Le pied de Charcot

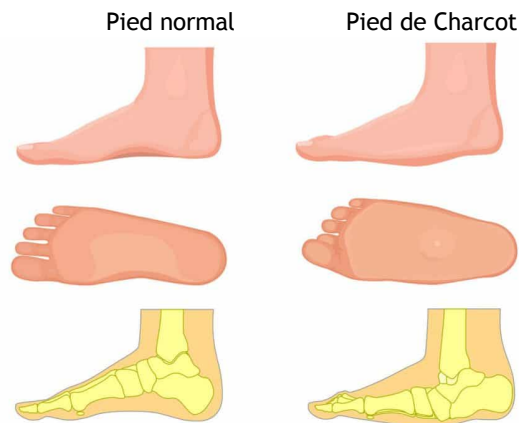


Figure 9. Neuropathie et pied diabétique

Le pied de Charcot est secondaire à une atteinte des petites fibres nerveuses, et en particulier les fibres neurovégétatives. Il débute par des micro-fractures qui passent souvent inaperçues en raison de la neuropathie, mais entraînent l'apparition brutale d'une inflammation locale avec un pied rouge et augmenté de volume. Cette inflammation entraîne une activation des ostéoclastes *via* le système RANK/RANKL (Mabilleau et al. 2008). En l'absence d'immobilisation, cette activation entraîne en 2 à 3 semaines une ostéolyse massive.

Le seul traitement de la neuropathie validé jusqu'à présent est l'équilibre glycémique. Il peut permettre de stabiliser la perte de sensibilité mais ne la fait pas régresser (Callaghan, Hur, et Feldman 2012). Par ailleurs, le port de chaussures et

semelles orthopédiques est indispensable pour limiter le risque d'aggravation des troubles de la statique du pied et l'apparition de nouveaux troubles trophiques.

D. Diabète, système immunitaire et inflammation

Dans le diabète de type 2, les mécanismes et les composants du système immunitaire et de l'inflammation sont altérés. Les niveaux des protéines de l'inflammation aiguë (comme la CRP ou l'haptoglobine), des cytokines pro-inflammatoires (comme les IL-1 β , IL-6 ou TNF- α) et les chimiokines sont augmentés de façon significative (Banerjee et Saxena 2012; Herder et al. 2005; Pradhan et al. 2001; Spranger et al. 2003), de même que l'état d'activation des populations leucocytaires et lymphocytaires, l'apoptose et la fibrose tissulaire (Donath et Shoelson 2011), ce qui suggère que **le système immunitaire et l'inflammation participent activement à la pathogenèse du diabète.**

Les mécanismes considérés comme responsables de l'état inflammatoire du diabète de type 2 comprennent l'**hypoxie**, les signaux lipidiques induits par l'**hypertrophie/l'hyperplasie du tissu adipeux**, l'activation des voies de **NF κ B** et de Janus N-terminal kinase, le recrutement et l'activation des **cellules immunitaires**, et la production d'**IL-1 β** (Donath et Shoelson 2011; R. P. Robertson et al. 2004). L'utilisation thérapeutique de l'antagoniste du récepteur à l'IL-1 β permet de diminuer les facteurs pro-inflammatoires circulants chez les patients diabétiques, ce qui ralentit la progression de la pathologie (Akash et al. 2012). Il semblerait également que les récepteurs NOD-like de type 3 contenant un domaine pyrine (NLRP3) joueraient un rôle important dans le syndrome métabolique associé à des lésions des lipides en induisant un statut pro-inflammatoire et la libération d'IL-1 β mature (B.-C. Lee et Lee 2014).

Une étude s'est intéressée à l'association entre les cytokines de l'inflammation et le régulateur redox facteur nucléaire érythroïde 2 (Nrf2) chez des patients diabétiques de type 2 et il a été retrouvé :

- une corrélation positive entre les niveaux de Nrf2 des cellules mononucléaires périphériques sanguines et les niveaux des cytokines Th2 plasmatiques,
- une corrélation négative entre les niveaux de Nrf2 et les niveaux des cytokines Th1 plasmatiques.

De plus, le défaut de sécrétion d'insuline des cellules B pancréatiques induit par la stimulation cytokinique est restauré par l'activation de Nrf2, liant la régulation du système immunitaire à celle du stress oxydatif (Sireesh et al. 2018).

E. Stratégies thérapeutiques actuelles dans le diabète

Le diabète est une pathologie évolutive comprenant des mécanismes physiopathologiques complexes aboutissant à un état d'hyperglycémie chronique, dont la prise en charge nécessite non seulement d'essayer d'obtenir un contrôle glycémique satisfaisant mais aussi de maîtriser les facteurs de risque souvent associés tels que les dyslipidémies et l'hypertension artérielle afin de prévenir ou de ralentir l'évolution vers les complications cliniques micro et macrovasculaires, responsables de sa morbi-mortalité.

La prise en charge repose en premier lieu sur des **mesures hygiéno-diététiques**. Dans le diabète de type 1, l'équilibre glycémique est obtenu par association d'insulines rapides et d'insulines lentes ou mixtes. Dans le diabète de type 2, les résultats de l'étude UKPDS (UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETE STUDY) (« Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group » 1998) ont permis de constater la difficulté à maintenir dans le temps les objectifs glycémiques, sans intensifier le traitement, en associant plusieurs classes médicamenteuses. Ceci permet de mettre en lumière les limites des antidiabétiques classiques : en effet, au-delà de l'échappement thérapeutique, on observe une difficulté dans la maîtrise du poids qui tient un rôle prépondérant dans la prise en charge globale du diabète de type 2, ainsi qu'une augmentation du risque d'hypoglycémie due à l'intensification du traitement.

En France, plusieurs familles d'hypoglycémifiants par voie orale sont disponibles. Historiquement, quatre familles étaient répertoriées : les **biguanides**, les **sulfamides hypoglycémifiants**, les **glinides** et les **inhibiteurs des alpha-glucosidases**. Plus récemment de nouveaux anti-diabétiques oraux ont fait leur apparition, dont les **inhibiteurs de la DPP-4** (dipeptidyl peptidase-4 ou gliptines) et les **inhibiteurs de SGLT2** (cotransporteur rénal glucose-sodium).

Les traitements injectables comportent quant à eux deux familles : les **insulines** et les **analogues de GLP-1** (glucagon like peptide-1, hormone intestinale de la catégorie des incrétines dont l'action va potentialiser la sécrétion d'insuline et freiner celle du glucagon).

Des études épidémiologiques et des essais randomisés contrôlés ont montré l'efficacité d'un contrôle glycémique intensif dans la réduction du développement et de la progression des complications microvasculaires à long terme (néphropathie, rétinopathie et neuropathie) chez les patients diabétiques (« Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group » 1998; « Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group » 1998; Diabetes Control and Complications Trial Research Group et al. 1993; ADVANCE Collaborative Group et al. 2008). Cependant, des incertitudes persistent concernant la sécurité cardiovasculaire de certains traitements antidiabétiques, notamment sur le **risque d'événements indésirables majeurs de membres inférieurs** (Nativel et al. 2018).

Dans l'essai UKPDS, chaque réduction de 1% de l'HbA1c était associée à une **diminution de 43% du risque d'événement indésirable majeur de membre inférieur** (amputation ou décès suite à un événement vasculaire périphérique) (Stratton et al. 2000). Cependant, ce bénéfice n'a pas persisté pendant la période d'observation post-essai de l'étude UKPDS (Holman et al. 2008) et dans l'essai ADVANCE, l'incidence d'événement indésirable majeur de membre inférieur (ulcération des membres inférieurs, amputation, besoin de revascularisation ou

décès secondaire à une artériopathie périphérique) était comparable dans les deux bras de l'étude randomisée : contrôle glycémique intensif versus standard (ADVANCE Collaborative Group et al. 2008; Mohammedi et al. 2016). De plus, une méta-analyse récente (avec un faible niveau de preuve) a montré une réduction de 35% du risque d'amputation de membre inférieur chez les patients atteints de diabète de type 2 assignés à un contrôle glycémique intensif par rapport à ceux assignés à une stratégie moins intensive, mais aucun effet n'a été observé sur l'évolutivité de la neuropathie ou de l'AOMI (Hasan et al. 2016).

L'étude PROactive (« PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events ») retrouvait une association non significative entre l'utilisation de la pioglitazone, un agoniste du récepteur activé par les proliférateurs de peroxydases γ (PPAR γ), et l'augmentation du risque de revascularisation vs placebo (John A. Dormandy et al. 2005). Cependant, les analyses post hoc de l'étude BARI-2D (« Bypass Angioplasty Revascularization Investigation in Type 2 Diabetes ») ont montré une incidence plus faible d'événement indésirable majeur de membre inférieur (ABI \leq 0.9, revascularisation des membres inférieurs ou amputation de membre inférieur) chez les patients traités par traitement insulino-sensibilisant (metformine ou thiazolidinedione) par rapport à ceux traités par traitement insulino-sécréteur (sulfonurées, répaglinide, natéglinide ou insuline) (Althouse et al. 2013). En outre, une autre étude observationnelle a montré que l'utilisation de la metformine était associée à une diminution de la prévalence des calcifications artérielles sous gonales (Mary et al. 2017).

Les autorités de régulation des médicaments américaines et européennes exigent depuis 2008 la conduite d'études de sécurité cardiovasculaire avant toute demande d'autorisation de mise sur le marché des nouveaux médicaments anti-diabétiques. Ainsi, plusieurs études randomisées et contrôlées ont comparé (versus placebo) l'incidence des événements cardiovasculaires majeurs des inhibiteurs de la DPP4, des agonistes du GLP1, et des inhibiteurs du cotransporteur rénal glucose-sodium (SGLT2) chez des patients diabétiques de type 2 à haut risque cardiovasculaire (Scirica et al. 2013; W. B. White et al. 2013). Les inhibiteurs de la DPP4 étaient globalement neutres en terme de sécurité cardiovasculaire, tandis que certains

analogues de la GLP-1 (liraglutide, semaglutide, et albiglutide) et inhibiteurs de SGLT2 (empagliflozine, canagliflozin, et dapagliflozine) étaient associés à une réduction significative des événements cardiovasculaires majeurs ou des taux d'hospitalisation pour insuffisance cardiaque (Zinman et al. 2015; Neal et al. 2017; Wiviott et al. 2019).

Il est néanmoins intéressant de noter que dans l'étude SUSTAIN-6, les patients traités par semaglutide avaient 35% de réduction de l'incidence des revascularisations coronaires et périphériques (Marso et al. 2016). Des analyses secondaires de l'étude LEADER ont montré une diminution du risque d'amputation, particulièrement majeure, chez les patients porteurs de troubles trophiques à l'inclusion et randomisés dans le groupe liraglutide en comparaison au groupe placebo (Dhatariya et al. 2018), sans différence significative entre les 2 groupes en terme de taux de revascularisation périphérique.

A contrario, selon l'étude CANVAS, le traitement par canagliflozine était associé à 2 fois plus de risque d'amputation mineure ou majeure vs placebo (Neal et al. 2017). Les mécanismes physiopathologiques susceptibles d'expliquer ce phénomène ne sont pas encore élucidés. L'hypovolémie engendrée par ce traitement pourrait l'expliquer, au moins en partie, d'autant qu'une étude observationnelle récente montre un risque élevé d'amputation de membre inférieur et de revascularisation périphérique chez les patients diabétiques de type 2 traités par diurétiques (Potier et al. 2019). Néanmoins, les deux autres principales études randomisées évaluant empagliflozine (EMPA-REG OUTCOME) ou dapagliflozine (DECLARE - TIMI 58) (Inzucchi et al. 2018; Wiviott et al. 2019) ne plaident pas en faveur d'un éventuel effet classe des inhibiteurs de SGLT2.

II. ISCHEMIE CRITIQUE CHRONIQUE

A. Définition de l'ischémie critique chronique

L'AOMI regroupe deux grands types de symptomatologie (**Tableau 1**) :

- La **claudication intermittente**, caractérisée par une douleur à type de crampe au niveau du mollet ou du pied, de survenue progressive à la marche. Son intensité oblige le patient à s'arrêter, la douleur disparaît rapidement à l'arrêt de l'effort et réapparaît à sa reprise, pour un

périmètre de marche reproductible. Il s'agit d'une ischémie musculaire à l'effort provoquée par une diminution du débit sanguin artériel dans les muscles,

- L'ischémie critique chronique (ICC).

L'ICC, redéfinie dans les dernières recommandations de la société européenne de Chirurgie Vasculaire (ESVS) sous le terme d' "ischémie chronique menaçant le membre" (Aboyans et al. 2018), correspond à la forme la plus sévère d'AOMI. En effet, la qualification d'ICC de membre inférieur s'applique à un degré d'insuffisance artérielle chronique tel que la pression distale résiduelle compromet sévèrement la fonction microcirculatoire et le débit nutritionnel du pied.

Elle se manifeste par des douleurs dans les jambes en position allongée au repos, soulagées par la position jambe pendante, appelées **douleurs de décubitus**. Cette position déclive engendre un œdème qui va à son tour aggraver le déficit perfusionnel. Ces douleurs de décubitus doivent être présentes depuis > 2 semaines et être associées à une ou plusieurs **anomalies hémodynamiques** :

- un index de pression systolique ou IPS (cheville-brachial) <0.4,
- une pression artérielle distale <50 mm Hg,
- une pression d'orteil (« toe pressure » ou TP) <30 mm Hg,
- une pression partielle transcutanée en oxygène (TcPO₂) <30 mm Hg,
- et/ou des ondes de pressions d'enregistrement (« pulse volume recording » ou PVR) faiblement pulsatiles.

En effet, l'IPS et la pression artérielle distale sont souvent faussement élevées en raison de la médiocalcose, en particulier chez les personnes atteintes de diabète et d'insuffisance rénale terminale. Ainsi, l'étude COPART a démontré que les mesures de pression d'orteil et de TcPO₂ sont plus précises que les mesures de pression artérielle distale et sont également plus prédictives du risque d'amputation à 1 an (TP<30 mm Hg ou TcPO₂<10 mm Hg) (Salaun et al. 2019).

Classification de Rutherford	
Stade	Présentation clinique
0	Asymptomatique
1	Claudication légère (> 500m)
2	Claudication modérée (< 500m)
3	Claudication sévère (< 200m)
4	Douleur de décubitus
5	Trouble trophique mineur (avant pied)
6	Trouble trophique majeur

Tableau 1. Classification clinique de l'AOMI

L'évolution se fait vers l'apparition de **troubles trophiques** évoluant depuis >2 semaines engageant immédiatement le pronostic du membre. Ces ulcères artériels apparaissent le plus souvent au niveau des points de frottement (extrémités des orteils, face latérale du pied, talons) (Gibbons et Shaw 2012). La cicatrisation est difficile en raison de la diminution de l'oxygénation des tissus, liée à la baisse du débit artériel, et d'un retard diagnostique, notamment chez les patients atteints de neuropathie diabétique.

Le tableau clinique complet retrouve une pâleur de surélévation, une érythrose de déclivité, un allongement du temps de recoloration cutanée et du remplissage veineux, une déshabitation des pulpes digitales et des coques talonnières.

Les dernières recommandations de l'ESVS préconisent l'utilisation systématique d'un système de classification qui intègre plusieurs éléments clés (tel que le **WIFI** qui prend en compte : plaie, ischémie, infection) et qui est en corrélation avec le risque d'amputation et la probabilité de cicatrisation des plaies (Conte et al. 2019). Il convient ensuite d'obtenir des images diagnostiques de qualité pour guider la revascularisation. Cette étape dépend fortement de la disponibilité des équipements et de l'expertise locale. Lorsqu'elle est disponible, l'échographie doppler artérielle est la modalité d'imagerie non invasive de préférence. Cependant, pour une imagerie

anatomique non invasive plus complète, l'Angio-IRM ou l'Angio-TDM peuvent être envisagés. L'artériographie reste la technique d'imagerie de référence et peut être proposée en première intention si l'examen clinique retrouve un pouls poplité. De plus, aucun patient suspecté d'ICC, et candidat à une tentative de sauvetage de membre, ne doit se voir refuser une revascularisation sans avoir d'abord bénéficié d'une artériographie diagnostique complète incluant la cheville et le pied (Conte et al. 2019).

B. Épidémiologie

L'AOMI est le plus souvent causée par l'athérosclérose, ainsi, les facteurs de risque de son développement comprennent le tabagisme, le diabète, l'hypertension artérielle et l'hypercholestérolémie (Fowkes et al. 2013). Les facteurs de risque indépendants associés à la progression vers l'ICC comprennent le tabagisme, le diabète (Norgren et al. 2007; Howard et al. 2015), l'âge avancé et l'insuffisance rénale chronique (Becker et al. 2011).

L'incidence annuelle de l'ICC est de 220 à 3500/million de personnes et sa prévalence est d'1% de la population adulte/an (Norgren et al. 2007), et de 10% des patients atteints d'AOMI/an (Farber et Eberhardt 2016). Les patients touchés deviennent de plus en plus jeunes, alors que le pronostic demeure extrêmement péjoratif. L'incidence est plus marquée chez les **hommes**, avec un sexe ratio de 3:1, cependant, l'augmentation du taux d'AOMI est plus élevée chez les femmes dans les pays à revenus faibles et intermédiaires, et la prévalence dépend fortement des années de vie et varie de 2.5% chez les hommes âgés de moins de 60 ans, à 8.3% entre l'âge de 60 et 69 ans, pour atteindre 18.8% à plus de 70 ans (J. A. Dormandy et Rutherford 2000).

Les données disponibles sur l'histoire naturelle de l'AOMI sont issues d'études incluant essentiellement des claudicants et peu d'études ont été réalisées sur l'ICC (Farber et Eberhardt 2016; Duff et al. 2019), cependant il est admis qu'elle est responsable d'événement indésirables graves au niveau des membres inférieurs mais également au niveau systémique.

Lors de la présentation initiale, **20 à 25%** des patients bénéficient d'une **amputation majeure primaire**, **50 à 60%** bénéficient d'un ou plusieurs gestes de **revascularisation** par voie endovasculaire ou par chirurgie ouverte, tandis que **25%** bénéficient d'un **traitement médical** seul.

En effet, malgré des évolutions importantes dans le domaine endovasculaire, près de **40%** des patients restent **inéligibles à une stratégie de revascularisation efficace**, essentiellement en raison de la présence de facteurs inflammatoires ou de l'absence de lit d'aval (J. A. Dormandy et Rutherford 2000). A un an, l'évolution se fait vers un taux d'amputation majeure de 25%, d'ICC persistante de 20%, de survie sans amputation majeure ou symptomatologie d'ICC de 25%, et un taux de mortalité de 25%, atteignant jusqu'à 50% à 5 ans (Norgren et al. 2007; Jaff et al. 2015). De plus, chez les patients en ICC dits « **sans option** », les taux de mortalité et d'amputation majeure à 6 mois peuvent atteindre 40% et 20% respectivement (Norgren et al. 2007; Hankey, Norman, et Eikelboom 2006; Sprengers et al. 2010).

Les patients atteints d'AOMI et d'ICC ont une prévalence accrue d'athérosclérose coexistant dans d'autres territoires; il a été démontré que près de deux tiers des patients atteints d'ICC ont une coronaropathie significative à l'angiographie (Hertzer et al. 1984), et un quart des patients atteints d'AOMI ont une sténose carotidienne significative (S. W. Cheng et al. 1999). En conséquence, il existe un taux annuel élevé de 5% à 7% d'événements cardiovasculaires (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral et décès vasculaire) chez les patients atteints d'AOMI, qui est probablement encore plus élevé chez ceux atteints d'ICC (Lambert et Belch 2013) puisque le risque de décès est multiplié par près de 3 chez les patients présentant une perte tissulaire majeure (Soga et al. 2014).

C. Physiopathologie

Bien que l'ICC puisse être causée par une vascularite, un événement thrombo-embolique, un traumatisme, un kyste adventiciel, un piège poplité ou une maladie de Buerger, elle est le plus souvent associée à une athérosclérose progressive, diffuse et multi-segmentaire.

La très grande majorité des patients présente une atteinte infra-inguinale significative, bien qu'une atteinte occlusive aorto-iliaque puisse être observée chez les fumeurs (Ciavarella et al. 1993). Les personnes atteintes de diabète et d'insuffisance rénale chronique présentent généralement une pathologie occlusive artérielle infra-poplitée diffuse et sévère.

La physiopathologie de l'ICC implique des anomalies micro et macro vasculaires qui conduisent à une perfusion artérielle réduite. Par conséquent, les besoins métaboliques au repos des tissus en aval dépassent l'apport en oxygène et en nutriments. Les artérioles distales s'adaptent à l'ischémie chronique en diminuant l'épaisseur de la paroi et la vasodilatation, ce qui conduit à une augmentation orthostatique dépendante de la pression hydrostatique distale et de l'œdème distal. L'inflammation concomitante et la production de radicaux libres de l'oxygène contribuent à l'apparition de lésions endothéliales. Ainsi, une dysfonction endothéliale, une agrégation plaquettaire inappropriée et une activation des leucocytes prédisposent à des microthromboses et un œdème des membres inférieurs. L'angiogenèse se produit en réponse à l'hypoxie tissulaire, conduisant au développement d'une collatéralité nourricière et à la formation de petits vaisseaux. La dysrégulation cellulaire et l'œdème tissulaire créent un environnement local défavorable à la cicatrisation des plaies (Lambert et Belch 2013; Coats et Wadsworth 2005).

De plus, il a été démontré dans un modèle murin d'ischémie subaiguë de patte par utilisation de constricteurs artériels, une nécrose tissulaire significative et des déficits de perfusion des membres chez les souris BALB/c (connues comme étant génétiquement plus sensibles au modèle de ligature exérèse artérielle, avec notamment des auto-amputations fréquentes) mais pas chez les souris C57BL/6 (McClung et al. 2016). Les souris BALB/c présentaient des lésions musculaires significativement plus importantes, avec une inflammation accrue et une atrophie des myofibres, malgré l'absence de différence de densité et de surface vasculaire CD31+ et SMA+. Les souris BALB/c ont également présenté significativement plus de myonoyaux centraux, indiquant une régénération musculaire accrue, indépendante

de la densité vasculaire et au moins en partie génétiquement déterminée (McClung et al. 2016). Ainsi, ces résultats démontrent que le fond génétique est un déterminant essentiel des conséquences globale après une ischémie aiguë ou subaiguë de membres. L'étude des effets myopathiques de l'ischémie dans d'autres fonds génétiques pourrait permettre d'identifier des gènes spécifiques responsables de ces différences et conduire à de nouvelles thérapies ciblées qui pourraient être utilisées seules ou en combinaison avec des stratégies de revascularisation.

D. Le muscle squelettique

1. Généralité

L'unité de base du tissu musculaire squelettique est la **fibre** musculaire. Les fibres ont une forme cylindrique allongée et contiennent de nombreux noyaux, des mitochondries, un réticulum endoplasmique et des **myofibrilles** (structures contractiles obtenues par fusion de plusieurs centaines de **myoblastes**). Les fibres sont disposées parallèlement. Elles mesurent de 10 à 100µm de diamètre et peuvent atteindre 30cm de longueur.

Plusieurs couches de tissu conjonctif séparent et protègent les composantes des muscles squelettiques. L'**endomysium** sépare chaque fibre musculaire, le **périmysium** organise de 10 à 100 fibres musculaires en faisceaux et l'**épimysium** est la couche extérieure qui enveloppe tout le muscle. Ces membranes fournissent des fibres collagènes aux tissus conjonctifs qui attachent le muscle à d'autres structures (muscle, os, tendons) (**Figure 10**).

Il existe trois principaux types de fibres musculaires squelettiques qui possèdent des métabolismes différents, notamment une teneur variée en ATPase, qui se traduit par différentes vitesses de contraction et différentes résistances à la fatigue :

- **Fibres de Type I** : fibres oxydatives à contraction lente et résistantes à la fatigue. Ces fibres contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires. Ce sont des fibres de petit diamètre qui scindent lentement l'ATP (adénosine-triphosphate). Elles sont prédominantes dans le muscle tibial antérieur et le gastrocnémien.

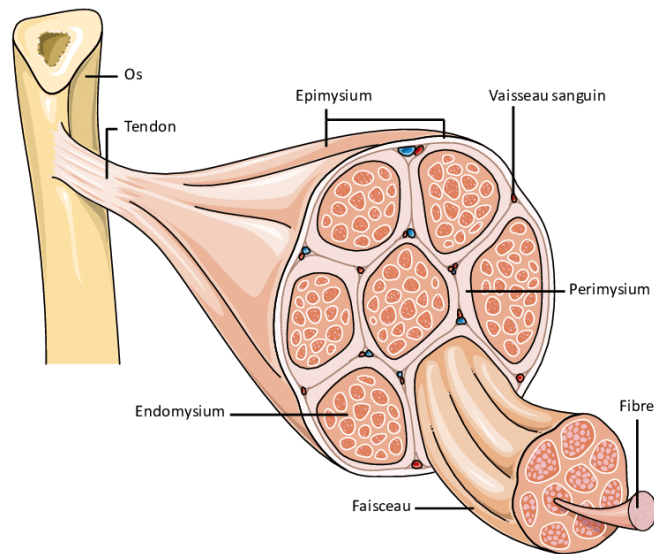
- **Fibres de Type IIA** : fibres oxydatives à contraction rapide et résistantes à la fatigue. Ces fibres contiennent beaucoup de myoglobine, de mitochondries et de capillaires.
- **Fibres de Type IIB** : fibres glycolytiques à contraction rapide et sensibles à la fatigue. Ces fibres contiennent peu de myoglobine, de mitochondries et de capillaires. Ce sont des fibres de gros diamètre avec une haute teneur en glycogène.

Les fibres oxydatives produisent de l'ATP par le système aérobie, tandis que les fibres glycolytiques le produisent par le système anaérobie plus lent (ce qui explique que les fibres soient plus sensibles à la fatigue). Même si la plupart des muscles squelettiques contiennent une combinaison des trois types de fibres, les fibres d'une même unité motrice sont toutes d'un seul type.

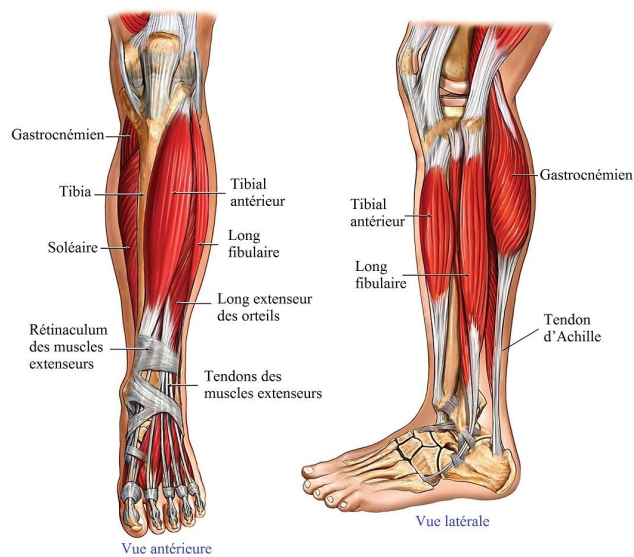
Une **unité motrice** est formée par un neurone moteur ainsi que toutes les fibres musculaires que ce dernier stimule. Au niveau de la plaque motrice (jonction nerf-muscle), des neurotransmetteurs (comme l'ACh) transmettent l'influx nerveux initial à la fibre musculaire sous la forme d'un potentiel d'action électrique. Ce potentiel se propage ensuite par l'intermédiaire de canaux ioniques et conduit à sa contraction. Les différents types de fibres musculaires sont utilisés selon le besoin de la contraction. Par exemple, un effort léger, nécessitant une faible contraction, n'activera que les unités motrices reliées aux fibres de type I (contraction lente), un effort plus soutenu (contraction forte) activera les fibres à contraction rapide de type IIB et un effort intense, nécessitant une contraction maximale, activera en plus les fibres IIA qui sont résistantes à la fatigue.

Dans le muscle squelettique, l'énergie et l'oxygène sont apportées par un réseau vasculaire sanguin abondant et le muscle se contracte et se relâche sous l'action de commandes émises par les nerfs.

A. Structure du muscle strié squelettique



B. Muscles étudiés chez l'homme



C. Muscles étudiés chez la souris

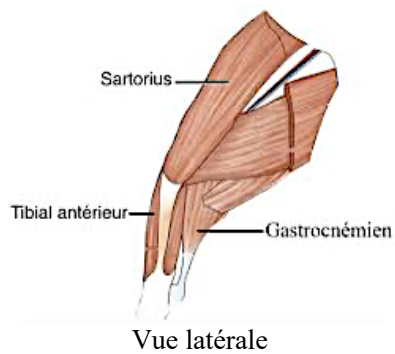


Figure 10. Structure du muscle strié squelettique

2. Vascularisation du muscle squelettique

La vascularisation du muscle squelettique est abondante. Elle est constituée d'un **réseau anastomotique de capillaires** très bien organisé en **mailles rectangulaires** distribuées autour des fibres musculaires. Le réseau capillaire est alimenté par des artérioles afférentes. Des veinules réparties régulièrement le long des fibres musculaires ramènent le sang vers les veines. Ce sont les fibres lentes qui demandent le plus d'énergie pour fonctionner et qui sont les plus riches en capillaires (Narkar et al. 2011).

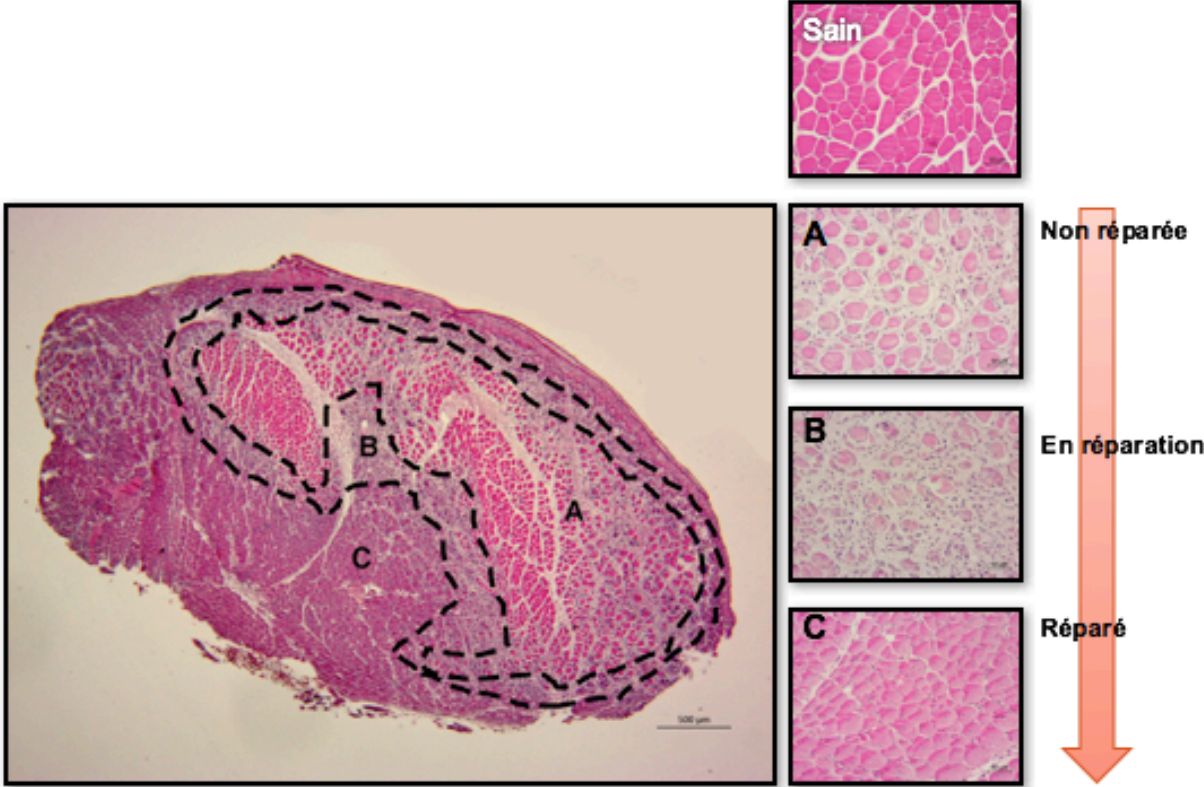
3. Régénération du muscle squelettique

Chez les mammifères, de nombreux tissus possèdent une capacité de régénération notamment les os, le muscle squelettique, les nerfs périphériques et les vaisseaux sanguins. Le processus de régénération musculaire est habituellement initié après altération directe des fibres (par traumatisme mécanique, ischémique ou lésions thermo-induites) ou indirecte (par des substances chimiques toxiques).

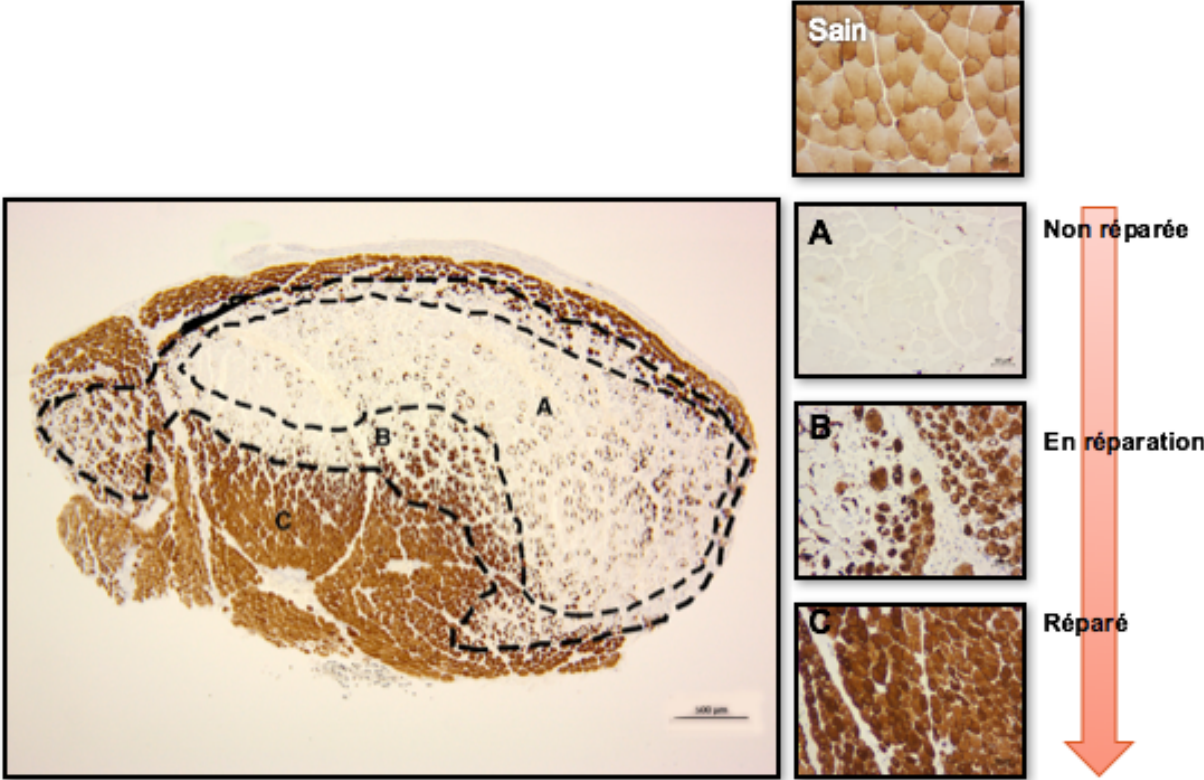
L'ischémie musculaire provoque une **nécrose** rapide des myofibres, initiée par des dommages membranaires. L'activité de protéases calciques provoque la destruction des sarcomères quelques minutes après la lésion. Une nouvelle **lame basale** marque la frontière entre **zone saine** et **zone lésée** ; elle limite l'extension de la nécrose myofibrillaire (Papadimitriou et al. 1990) et constitue un filtre sélectif qui maintient les fibroblastes à l'extérieur de la zone lésée et les cellules satellites (principale source de myoblastes) à l'intérieur (Snow 1977).

S'ensuit une réponse immunitaire locale cruciale pour la régénération musculaire : le muscle endommagé est envahi par des neutrophiles (dès J2 post-ischémie), puis par des macrophages (**Figure 11A et B encadré B**).

A. Mesure des aires de régénération chez la souris en coloration Hemalun-éosine



B. Mesure des aires de régénération chez la souris en Immuno-marquage Desmine



C. Mécanisme de régénération d'une myofibre ischémique - adapté de (Abmayr et Pavlath 2012)

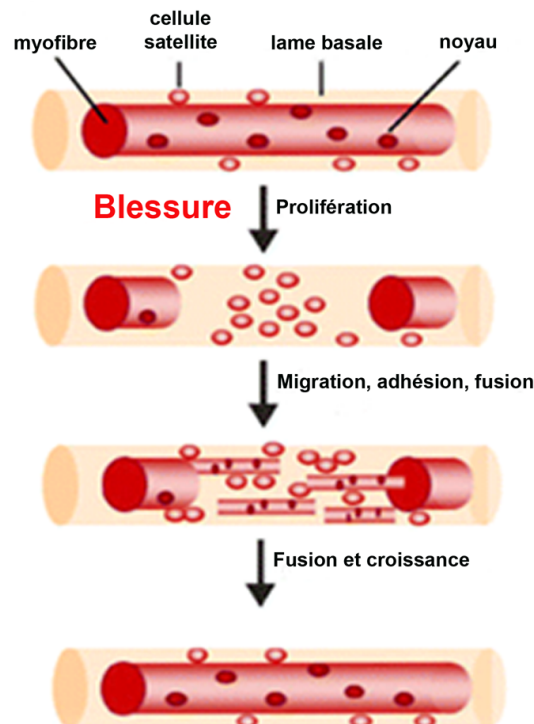


Figure 11. Régénération musculaire du muscle de souris adulte

Les figures A et B représentent du muscle tibial antérieur de souris prélevé après sacrifice post ligature exérèse de l'A. fémorale, provoquant ainsi une ischémie aigue de patte.

A gauche de l'image, les aires de régénération sont représentées sur une coupe au grossissement x20
Les encadrés : Sain (tissu sain), A (tissu post ischémie non réparé), B (tissu post ischémie en cours de réparation) et C (tissu post ischémie réparé) sont des photos au grossissement x260

Le muscle endommagé contient plusieurs populations de **macrophages**, résidents et non-résidents (McLennan 1996). Les macrophages sont extrêmement importants pour les phases précoces de la régénération musculaire, ils éliminent les débris cellulaires et tissulaires et stimulent la prolifération des cellules satellites en retardant leur différenciation via la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance (Merly et al. 1999; Arnold et al. 2007).

La lame basale et la matrice extracellulaire au sein de la zone lésée sont également des sources de facteurs de croissance et de facteurs chimiotactiques pour les cellules satellites (Grounds 1999). En réponse à ces facteurs, les cellules satellites commencent à proliférer (T. A. Robertson et al. 1993) et à migrer.

Puis les cellules satellites se différencient et fusionnent les unes avec les autres ou avec des fibres préexistantes pour former des myotubes multi-nucléés dont la maturation conduit à la formation des fibres musculaires (**Figure 11C**). Chez les mammifères, l'une des différences principales entre les fibres originelles et les fibres en régénération est le maintien du **noyau central dans les fibres régénérées** (vs périphérique) (**Figure 11A et B encadré C**).

Des cellules souches résidentes et quelques cellules souches issues de la moelle osseuse participent également à la régénération musculaire (Jankowski, Deasy, et Huard 2002; McKinney-Freeman et al. 2002).

La morphogénèse du muscle en régénération dépend aussi de l'action de facteurs physiques, comme la tension transmise par les tendons. Le tissu conjonctif est responsable de la transmission de ces forces mécaniques (Young et al. 2000) et la perte de tension induite dans des modèles de ténotomie conduit à une régénération musculaire anormale.

4. Vascularisation du muscle en régénération

La progression du processus de régénération nécessite un apport sanguin local concrétisé par le développement de la micro-vascularisation (Burton, Carlson, et Faulkner 1987) :

- A **J2 post-ischémie**, correspondant à la **phase aigüe inflammatoire**, le réseau vasculaire au sein du muscle squelettique en régénération est presque inexistant.
- Entre **J7 et J25**, correspondant à la **phase de réparation tissulaire**, le réseau vasculaire se développe et se densifie.
- Au-delà de **J25**, le réseau vasculaire apparaît similaire à celui du muscle sain (**Figure 12**).

Le sang garantit l'apport en oxygène et nutriments et permet le transport des macrophages et autres cellules phagocytaires sur le site de la nécrose. Les macrophages favorisent la pousse vasculaire. L'un des régulateurs majeurs de ce

phénomène est le facteur angiogénique HIF, activé par la destruction ou l'ischémie tissulaire, qui permet aux tissus endommagés de déclencher leur processus de réparation tissulaire. De plus, HIF est connu pour augmenter la transcription du VEGFA, l'un des facteurs les plus importants pour le bourgeonnement des CE à partir des vaisseaux préexistants sur le site de la nécrose (Maxwell et Ratcliffe 2002).

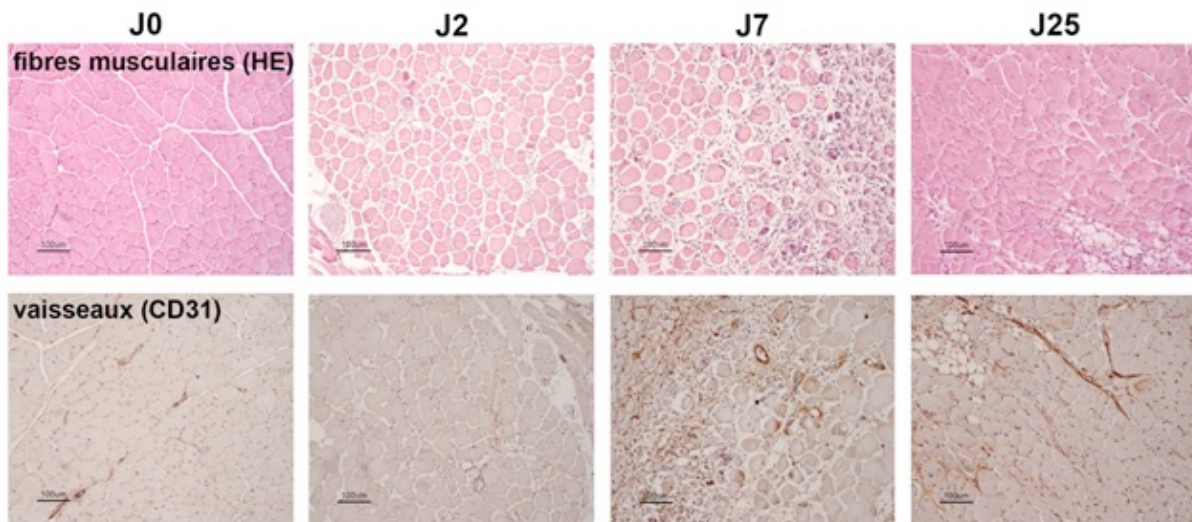


Figure 12. Développement du réseau de capillaires sanguins dans le muscle de souris adulte en régénération (de J0 à J25 post ischémie)

5. Prise en charge thérapeutique

Les objectifs thérapeutiques sont le sauvetage de membre (Jaff et al. 2015), mais aussi l'optimisation de l'état cardio-vasculaire global du patient.

La prise en charge des membres se concentre principalement sur la revascularisation artérielle (**Figure 13**) pour augmenter le flux distal afin de soulager les douleurs ischémiques et de cicatriser les plaies pour préserver un membre fonctionnel, maintenir l'autonomie (et donc la marche) et prévenir l'amputation majeure du membre.

Les techniques chirurgicales conventionnelles visant à revasculariser le membre incluent les **pontage anatomiques ou extra-anatomiques**, et la **thrombo-endarterectomie**. Le but de la revascularisation est de permettre la cicatrisation des troubles trophiques en rétablissant un flux pulsatile direct vers le pied. Pour la prise en charge de douleurs de décubitus isolées, le traitement de deux niveaux

lésionnels est en général suffisant. En cas de pathologie occlusive aorto-iliaque, l'utilisation de matériel prothétique a montré d'excellents résultats, avec une perméabilité primaire à 5 ans de 79.8% des pontages anatomiques aorto-bifémoraux pour prise en charge d'une ICC (Chiu et al. 2010). Les pontages extra-anatomiques présentent des taux de perméabilité généralement inférieurs et sont donc réservés aux patients à trop haut risque chirurgical pour pouvoir bénéficier d'un pontage anatomique (Setacci et al. 2011). Les pathologies occlusives du trépied fémoral sont généralement traitées par thrombo-endartériectomie avec d'excellents taux de perméabilité primaire de 90% à 5 ans (Kang et al. 2008). Cependant, la plupart des patients atteints d'ICC présentent une maladie occlusive infra-inguinale significative, ce qui a fait du pontage distal la pierre angulaire de la revascularisation de ces patients jusqu'à l'avènement du traitement endovasculaire. Ces pontages, permettent d'obtenir des taux de perméabilité secondaire et de sauvetage de membre à 5 ans de 81% et 95%, respectivement (Shah et al. 1995) lorsqu'ils sont réalisés avec une veine saphène autologue. Il s'agit, en effet, du meilleur substitut pour ce type de reconstruction et les résultats sont largement dépendants de la qualité du greffon utilisé et de son type (Schanzer et al. 2007; Conte et al. 2009). De plus, ces pontages sont associés à un taux non négligeable d'infection de site opératoire (11.1%) (Greenblatt, Rajamanickam, et Mell 2011), de thrombose à 30 jours (6.3%) (Lancaster et al. 2012), et d'évènements indésirables graves cardiovasculaires (6.2%, englobant les décès, les infarctus du myocarde, et les accidents vasculaires cérébraux) (Conte et al. 2009).

Durant les deux dernières décennies, l'utilisation croissante de **techniques endovasculaires** a conduit à une augmentation majeure de leur utilisation dans le contexte d'ICC. Ces techniques consistent à franchir la lésion à l'aide de guides et de cathéters de support, puis à traiter les lésions à l'aide de ballons simples, de stents ou de ballons et stents actifs, c'est-à-dire pouvant délivrer sur la paroi artérielle une molécule visant à limiter les phénomènes de resténose fréquemment observés dans ces localisations, par le biais notamment de paclitaxel (un poison du fuseau mitotique inhibant les phénomènes d'hyperplasie myointimale). Des outils d'athérectomie ont même fait leur apparition et visent à préparer les vaisseaux à ces traitements en diminuant le volume des séquestres athéromateux. Il est

généralement admis que les patients à haut risque chirurgical bénéficient d'un traitement endovasculaire (Hirsch et al. 2006; Rooke et al. 2011) et qu'une approche endovasculaire première doit être considérée pour les pathologies occlusives aorto-iliaques (Setacci et al. 2011). Cependant, en l'état actuel des connaissances il n'est pas possible de trancher sur le bénéfice ou non d'une approche endovasculaire première pour les patients à faible risque chirurgical pouvant bénéficier d'un pontage sous inguinal. Les essais randomisés BEST-CLI (« Best Endovascular Versus Best Surgical Therapy for Patients With Critical Limb Ischemia ») et BASIL-2 ont pour but de répondre à cette question, tandis que l'essai BASIL-3 tentera de répondre à la question de la meilleure modalité de traitement endovasculaire entre ballon simple, ballon actif et stent actif afin de guider au mieux le geste de revascularisation des patients en ICC.

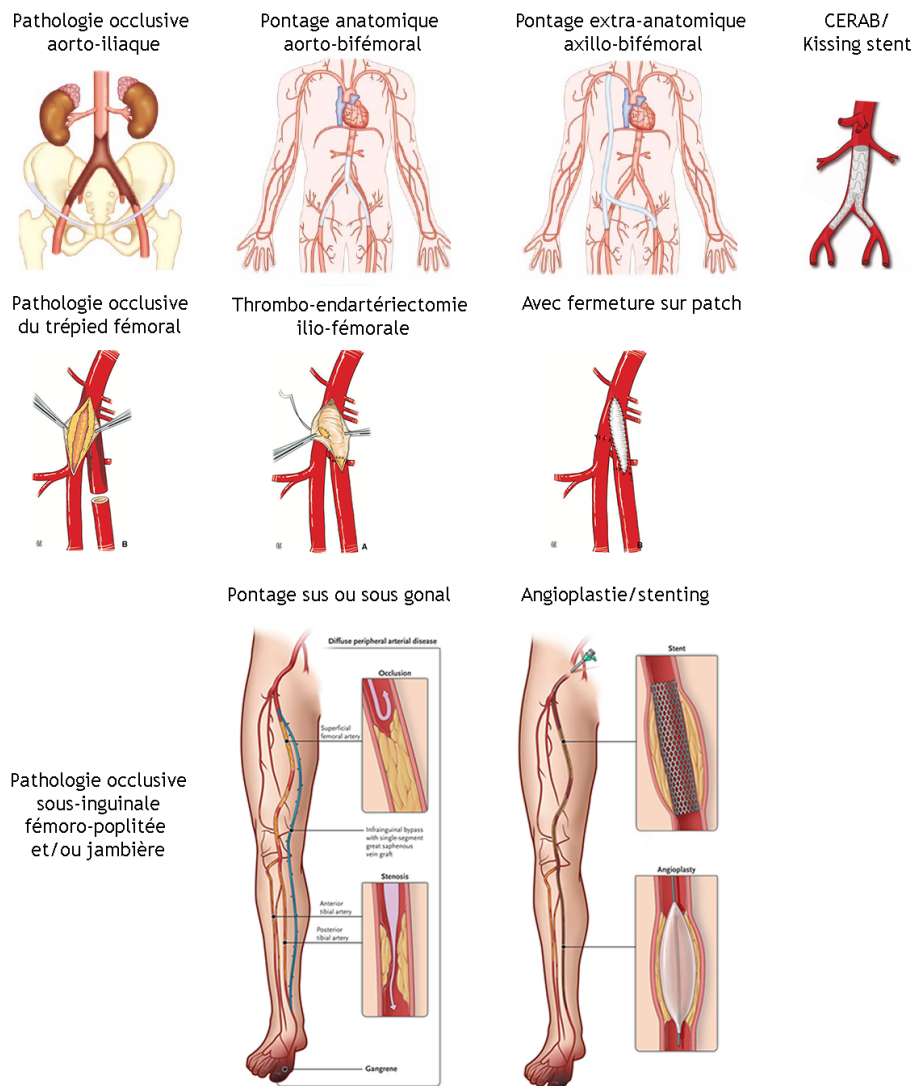


Figure 13. Techniques de revascularisation chirurgicale

L'amputation majeure sus ou sous gonale est quant à elle recommandée comme traitement de première intention pour les patients en ICC présentant une nécrose extensive du pied sans possibilité de reconstruction, une pathologie artérielle sévère sans possibilité de revascularisation chirurgicale, un état de choc septique en lien avec les troubles trophiques ou une maladie en phase terminale, et aux patients grabataires présentant une attitude de triple retrait irréductible (Norgren et al. 2007).

Le traitement médical comprend l'utilisation d'antiagrégants plaquettaires (une simple antiagrégation plaquettaire est recommandée, et une double antiagrégation plaquettaire peut être discutée chez les patients à haut risque), de bêtabloquants, de statines, d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou des antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II.

De plus, les différents facteurs de risque cardio-vasculaires doivent être pris en charge de manière optimale dans un cadre de prévention secondaire, avec notamment une aide au sevrage tabagique (Das et Eberhardt 2013), et selon les dernières recommandations (Aboyans et al. 2018), un niveau de LDL (« low-density lipoprotein ») cholestérol <100mg/dL, une tension artérielle <130/80mmHg pour les patients diabétiques et insuffisants rénaux, un niveau d'hémoglobine glyquée <7% en association avec une estimation régulière de l'évolution de la neuropathie diabétique et une prise en charge podologique.

Des traitements alternatifs, tels que la sympathectomie lombaire, la stimulation médullaire électrique ou la compression pneumatique intermittente ont été étudiés mais n'ont pas fait la preuve d'une efficacité suffisante pour soutenir leur utilisation systématique (Conte et al. 2019), de même que les perfusions d'agents vasodilatateurs ou vaso-actifs et l'utilisation du caisson hyperbar (Conte et al. 2019). Néanmoins, la prise en charge de patients « sans option » s'avère tellement difficile qu'en pratique 88% de ces patients reçoivent des perfusions de prostaglandines, 17% font du caisson hyperbar et 3% bénéficient de la stimulation médullaire électrique dans l'espoir d'observer une amélioration clinique (Martini et al. 2012).

6. Situation actuelle des recherches en médecine régénérative

Les thérapies de médecine régénérative comprennent la thérapie génique et la thérapie cellulaire. Elles visent essentiellement à favoriser l'angiogenèse. Elles offrent le potentiel de favoriser la cicatrisation des plaies et de prévenir l'amputation chez les patients dits « sans option » de revascularisation.

Ce concept d'angiogenèse a été introduit dans les années 1990 par Jeffrey Isner (Isner et al. 1996). Plusieurs **protéines pro-angiogéniques**, dont le VEGF, l'HGF (hepatocyte growth factor) et le FGF, ont montré qu'elles favorisaient l'angiogenèse dans des modèles animaux (Jerome Roncalli et al. 2008).

La courte demi-vie de ces protéines a conduit à l'utilisation de la **thérapie génique** pour maintenir une expression soutenue dans le membre ischémique. À ce jour, la plupart des essais cliniques ont utilisé l'injection intramusculaire d'un gène ou une thérapie cellulaire. Dans le cas de la thérapie génique, l'expression de la protéine est maintenue pendant 2 à 6 semaines. Les recherches en cours dans ce domaine comprennent des vecteurs alternatifs pour améliorer en toute sécurité l'expression des gènes à long terme.

La **thérapie cellulaire** utilise des cellules souches ou de la moelle osseuse. Son mécanisme d'action présumé implique soit la différenciation des cellules souches en cellules vasculaires après injection dans le membre hypoxique, soit l'induction de l'expression de facteur de croissance angiogéniques.

Les principaux essais thérapeutiques dont les résultats ont été publiés chez l'homme sont résumés dans le **Tableau 2**.

Selon une récente méta-analyse, la plupart des études ont été réalisées chez des patients ne présentant pas de risque immédiat d'amputation majeure (Compagna et al. 2015).

En effet, les essais impliquant des patients atteints d'ischémie critique sont de réalisation difficile et les principaux facteurs d'échec retrouvés sont le **diabète** et le recours à l'**hémodialyse**. Les comorbidités globales de ces patients entraînent une incidence élevée d'événements indésirables, et la nature hétérogène de l'ischémie

critique menaçant le membre se traduit par une histoire naturelle très variable et une faible reproductibilité des résultats. Dans ces essais, le taux d'amputation majeure à 1 an atteignait 35% chez les patients avec des troubles trophiques, contre <10% chez les patients souffrant uniquement de douleurs de décubitus. En outre, la FDA (« Food and drug administration ») recommande que la survie sans amputation majeure soit le critère de jugement principal d'efficacité dans un essai de phase 3 sur les ischémies critiques, ce qui nécessiterait l'inclusion d'au moins 500 patients pour atteindre une puissance statistique suffisante.

Par ailleurs, il n'y a pas de définition stricte d'ischémie critique « sans option ». Les études publiées ont généralement inclus des individus considérés comme de mauvais candidats pour la revascularisation chirurgicale ou endovasculaire, soit pour des raisons techniques (greffon veineux inadéquat, anatomie défavorable telle que l'absence d'artère cible dans le mollet en continuité avec le pied) soit pour des raisons cliniques (patient à haut risque chirurgical, mais douleurs de décubitus ou trouble trophique à faible probabilité de nécessiter une amputation majeure dans le mois).

Les inquiétudes générales sur les risques d'angiogenèse « hors cible » pouvant entraîner une progression de la rétinopathie proliférative diabétique ou la croissance d'une tumeur occulte ont également entraîné des restrictions importantes dans les critères d'inclusion et d'exclusion de ces études. À ce jour, aucune de ces complications n'a été observée dans les essais de thérapie clinique angiogénique qui se sont achevés, ce qui a permis de limiter les restrictions actuelles.

Cependant, malgré de premiers résultats prometteurs chez l'animal, aucun essai de phase 3 n'a démontré l'efficacité de ces thérapies. La conception actuelle des essais cliniques sur l'ischémie critique s'est améliorée et plusieurs essais cliniques de phase 3 incluent activement mais en attendant des résultats plus probants, ces thérapies restent considérées comme expérimentales (Conte et al. 2019).

De plus en plus d'études suggèrent que ces échecs pourraient s'expliquer par le fait que l'ICC ne serait pas secondaire à une carence en facteurs de croissance

angiogéniques mais plutôt à une altération de la signalisation en aval (Pérez-Cremades, Cheng, et Feinberg 2020). En effet, les patients atteints d'ICC présenteraient des taux plus élevés de facteurs proangiogéniques circulants (VEGF-A, Tie2 et angiopoïétine-2) par rapport à ceux présentant une claudication intermittente ou sans AOMI (Findley et al. 2008). De plus, malgré l'absence de différence d'expression de VEGF dans les modèles précliniques, la phosphorylation d'AKT/eNOS serait significativement réduite dans les pattes de souris diabétiques par rapport aux pattes de souris contrôles (Hazarika et al. 2007).

Essai clinique	Traitement	No. de participants	Survie sans amputation majeure à 12 mois (traité vs placebo)	Autres critères de jugement	Reference
<i>Thérapie génique</i>					
TALISMAN	FGF	125	73% vs 48% (p= .009)		(Nikol et al. 2008)
TAMARIS	FGF	525	63% vs 67% (p= .48)		(Belch et al. 2011)
HGF-STAT	HGF	104	NS	Modification de TcPO ₂ : 25.2 mmHg vs 9.4mm Hg à 6 mois (p= .0015)	(R.J. Powell et al. 2008)
HGF-0205	HGF	27	NS	Modification de PSO : +0.05 vs -0.17 (p= .047)	(Richard J. Powell et al. 2010)
Shigematsu et al.	HGF	40	NS	Diminution des douleurs de décubitus ou de taille de l'ulcère : 70.4% vs 30.8% (p= .014)	(Shigematsu et al. 2010)
<i>Thérapie cellulaire</i>					
Iafrati et al	Moelle osseuse autologue	97	NS	Diminution des douleurs de décubitus: 58% vs 26% à 6 mois (p= .025)	(Iafrati et al. 2011; 2016)
RESTORE-CLI	Cellules souches autologues	72	NS	Amélioration de PSO : 0.48 vs 0.012 à 6 mois (p= .02) Critère combiné (à 1 an absence d'amputation majeure, mortalité, augmentation de taille d'ulcère, nouvelle gangrène) : 40% vs 67% (p= .045)	(Richard J Powell et al. 2012)
MOBILE	Cellules de Moelle osseuse autologue	152	80% vs 69% (NS)		(Murphy et al. 2011)
JUVENTAS	Cellules mononucléées de Moelle osseuse	160	77% vs 84% à 6 mois (NS)	Amputation majeure à 6 mois : 19% vs 13% (NS)	(Teraa et al. 2015)

FGF :fibroblast growth factor, HGF :hepatocyte growth factor, NS-non significatif, TcPO₂-pression transcutanée en oxygène, PSO-pression systolique d'orteil

Tableau 2. Principaux Essais cliniques de thérapie génique et de thérapie cellulaire dans l'ischémie critique

D'autres essais thérapeutiques ciblent actuellement la **dysfonction endothéliale** et notamment le processus inflammatoire y participant afin de limiter leur évolution vers une lésion endothéliale et l'athérosclérose (Bäck, Weber, et Lutgens 2015) ou à limiter le stress oxydatif dans l'endothélium de modèles murins, notamment par le biais des inhibiteurs de LOX-1 (Lectin-like oxidized low-density lipoprotein) (Hanna et Shevde 2016). Cependant, il est important de considérer les éventuels effets systémiques d'un traitement anti-inflammatoire au long cours (Moss et Ramji 2015), avec le risque d'altérer la performance globale de la réponse immunitaire (Gotsman et Lichtman 2007).

Enfin, les ARN non codants (microARN ou ARN non codants longs) sont des régulateurs essentiels de l'expression génique qui contrôlent des mécanismes d'action pertinents dans l'ICC, comme l'angiogenèse/artériogenèse, l'hypoxie, l'inflammation, les cellules souches/progénitrices et le diabète de type 2. Plusieurs études ont montré qu'ils pourraient être des médiateurs de fonction ou des biomarqueurs dans la physiopathologie de l'ICC (Pérez-Cremades, Cheng, et Feinberg 2020).

III. VOIE DE SIGNALISATION HEDGEHOG

A. Généralités

La famille des morphogènes **Hh**, qui comprend les protéines **Sonic Hedgehog** (Shh), **Indian Hedgehog** (Ihh) et **Desert Hedgehog** (Dhh), a été identifiée il y a près de 4 décennies chez la drosophile comme régulateur essentiel de la détermination du destin cellulaire lors de l'embryogenèse (Nusslein-Volhard et Wieschaus 1980). L'origine de ce nom provient de l'aspect de la cuticule de la larve de drosophile mutée pour ce gène qui est courte et couverte de spicules.

Shh est la plus largement exprimée et étudiée. Elle est impliquée dans le développement de nombreux organes dont le système nerveux central (SNC), les poumons, l'estomac, le cœur et les membres (Bitgood et McMahon 1995a) en

participant à l'**orientation axiale** et en orchestrant la **morphogenèse** ramifiée (Kolesová, Roelink, et Grim 2008).

Le rôle d'Ihh et de Dhh est limité à un nombre restreint d'organes. Alors qu'Ihh participe au développement de l'intestin, des os et des reins (Ramalho-Santos, Melton, et McMahon 2000; St-Jacques, Hammerschmidt, et McMahon 1999), Dhh orchestre le développement des testicules et des nerfs périphériques (Bitgood, Shen, et McMahon 1996a; Parmantier et al. 1999a). Chez l'adulte, la signalisation Hh est généralement silencieuse mais participe au **maintien et à la régénération des tissus** en contrôlant le **renouvellement et la différenciation des cellules souches**, notamment dans la zone sous-ventriculaire cérébrale et dans les follicules pileux (Petrova et Joyner 2014). En outre, une activation inappropriée de la signalisation Hh a été reliée à plusieurs **cancers** chez l'homme, notamment le carcinome basocellulaire, le médulloblastome, le cancer du poumon et l'adénocarcinome pancréatique (Scales et de Sauvage 2009).

Le rôle de la signalisation Hh dans la biologie vasculaire a d'abord été mis en évidence dans les embryons par Pepicelli *et al.* en 1998 (Pepicelli, Lewis, et McMahon 1998) et Rowitch *et al.* en 1999 (Rowitch et al. 1999). En effet, alors que la première étude révèle un réseau vasculaire pulmonaire plus clairsemé chez l'embryon déficient en Shh, la deuxième étude montre que l'expression ectopique de Shh induit une hypervascularisation suggérant un **rôle pro-angiogénique** de la signalisation Hh.

Depuis lors, le rôle proangiogénique des ligands Hh a été confirmé chez l'adulte, notamment dans des conditions pathologiques (R. Pola et al. 2001; M.-A. Renault et al. 2010; Fujita, Miyamoto, et Saika 2009). De plus, il a été démontré que les ligands Hh **régulent la maturation des vaisseaux sanguins** (Q. Yao et al. 2014) en contrôlant le recrutement des cellules murales (Kengo F. Kusano et al. 2004; 2005; Qinyu Yao et al. 2014), l'**intégrité** (J. I. Alvarez et al. 2011) et la **différenciation artérielle** (N. D. Lawson, Vogel, et Weinstein 2002).

B. Gènes et protéines Hh chez le mammifère

Les orthologues du gène Hh de la drosophile codant pour Shh, Ihh et Dhh se localisent sur des chromosomes différents :

- Chromosome 5, 14 et 15 chez la souris
- Et chromosome 7, 2 et 12 chez l'Humain, respectivement.

Ces gènes présentent une forte homologie de séquence et les protéines sont hautement conservées entre les différentes espèces (Marigo et al. 1995; Pathi et al. 2001) (Tableau 3).

Identité de la protéine Shh murine avec différentes espèces			
	Drosophile Hh	Poisson zèbre Shh	Poulet Shh
Humain Shh	62%	68%	84%

Identité des différentes protéines Hh entre Humain et souris			
	Shh/shh	Ihh/ihh	Dhh/dhh
	92.4%	96.8%	97.3%

Tableau 3. Identité des différentes protéines Hh entre espèces - inspiré de (Marigo et al. 1995; Pathi et al. 2001)

De plus, au sein d'une même espèce, les différentes protéines Hh possèdent entre elles un niveau d'homologie très élevé, en particulier pour la partie N-terminale des protéines. Ainsi, chez l'humain, Shh a 91% d'homologie avec Ihh et 76% avec Dhh, tandis que l'homologie entre Ihh et Dhh est de 80%.

Les 3 protéines Hh des vertébrés sont synthétisées sous la forme de **pré-protéines** d'environ 45kDa. Celles-ci possèdent un peptide d'adressage à leur extrémité N-terminale, qui est reconnu par une PRS (Particule de Reconnaissance de Signal) durant sa translocation dans le réticulum endoplasmique. Au terme de la translocation, la séquence signal est retirée par une peptidase spécifique.

C. Voie de signalisation Hh et régulation

1. Régulation de la sécrétion des ligands Hh

Les pro-protéines Hh sont ensuite clivées par autoprotéolyse de la partie C-terminale (Carboxy-) en libérant deux polypeptides :

- Une séquence N-terminale de 19kDa, appelée N-Hh;
- Une séquence C-terminale de 26 kDa, dégradée après le clivage.

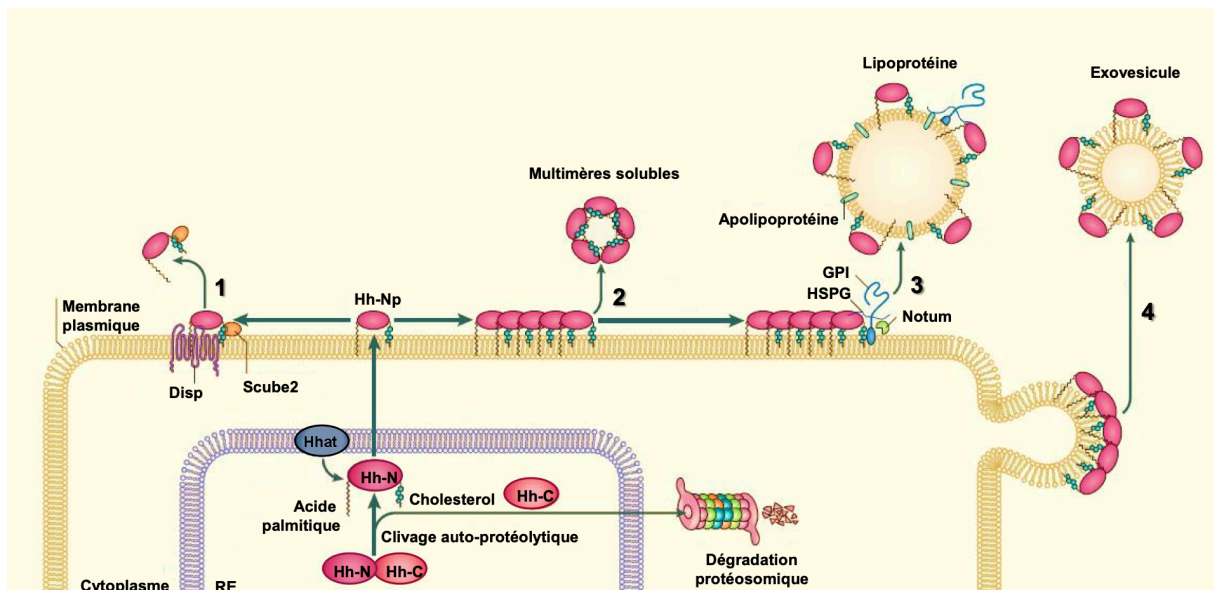


Figure 14. Modification et sécrétion post-transcriptionnelle des protéines Hh

La maturation post-traductionnelle de la protéine Hedgehog (Hh) se déroule dans le réticulum endoplasmique (RE). Shh est synthétisée sous forme d'une protéine pleine longueur de 45kDa. Après l'hydrolyse du peptide signal, la partie C-terminale du précurseur (Hh-C) est libérée par autoprotéolyse et un groupement cholestérol est ajouté à l'extrémité C-terminale de Hh-N. Hhat catalyse alors l'ajout d'un acide palmitique à l'extrémité N-terminale de Hh-N alors que la protéine Hh-C est envoyée hors du RE pour être dégradée par le protéasome. (1) La protéine mature Hh-Np est sécrétée sous forme lipidique grâce à la protéine transmembranaire Dispatched (Disp), et à la protéine Scube2 qui se lie sur le groupement cholestérol de Hh-Np. (2) Les protéines Hh-Np sont capables de s'associer pour former des multimères solubles. (3) Les multimères peuvent également s'associer avec des héparanes sulfates protéoglycanes (HSPG). Les HSPG sont attachées à la membrane plasmique de la cellule par une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) et recrutent des lipoprotéines. Les protéines Hh-Np peuvent s'insérer aux lipoprotéines et la protéine Notum de type phospholipase-C permet la libération de Hh-Np en clivant l'ancre GPI de la membrane plasmique. (4) Alternativement, les protéines Hh-Np peuvent également être libérées à la surface d'exovesicules - adapté de (Briscoe et Théron 2013).

La protéine Shh attache ensuite un fragment **cholestérol** à l'extrémité C-terminale nouvellement exposée. Shh est en outre modifiée par Hhat (Hedgehog acyltransferase) qui a catalysé l'addition d'un **palmitate** à l'extrémité N-terminale (Farzan et al. 2008) (**Figure 14**). Les modifications post-transcriptionnelles d'Ihh et Dhh ont été mal étudiées et pourraient différer. Ainsi, il est suggéré que Dhh ne subit pas de clivage autocatalytique (Pettigrew, Asp, et Emerson 2013).

La sécrétion et la solubilité des ligands Hh après modifications post-transcriptionnelles dépendent de la protéine transmembranaire Disp1 (membre de la famille des transporteurs dispatched RND) et de la protéine de surface cellulaire Scube2 (peptide signal, domaine CUB et EGF like domain containing 2) (Tukachinsky et al. 2012) qui se lie à l'ancre cholestérol de Shh.

2. Signalisation Hh

L'interaction des protéines Hh avec leur récepteur spécifique **Ptch1** (Patched) lève son inhibition sur la protéine transmembranaire **Smo** (Smoothened), ce qui active les voies de signalisation en aval dont :

- La **voie canonique Hh** conduisant à l'activation des facteurs de transcription **Gli**
- Et les **voies non canoniques Hh**, qui sont indépendantes de Smo et/ou Gli (David J. Robbins, Fei, et Riobo 2012) (**Figure 15**).

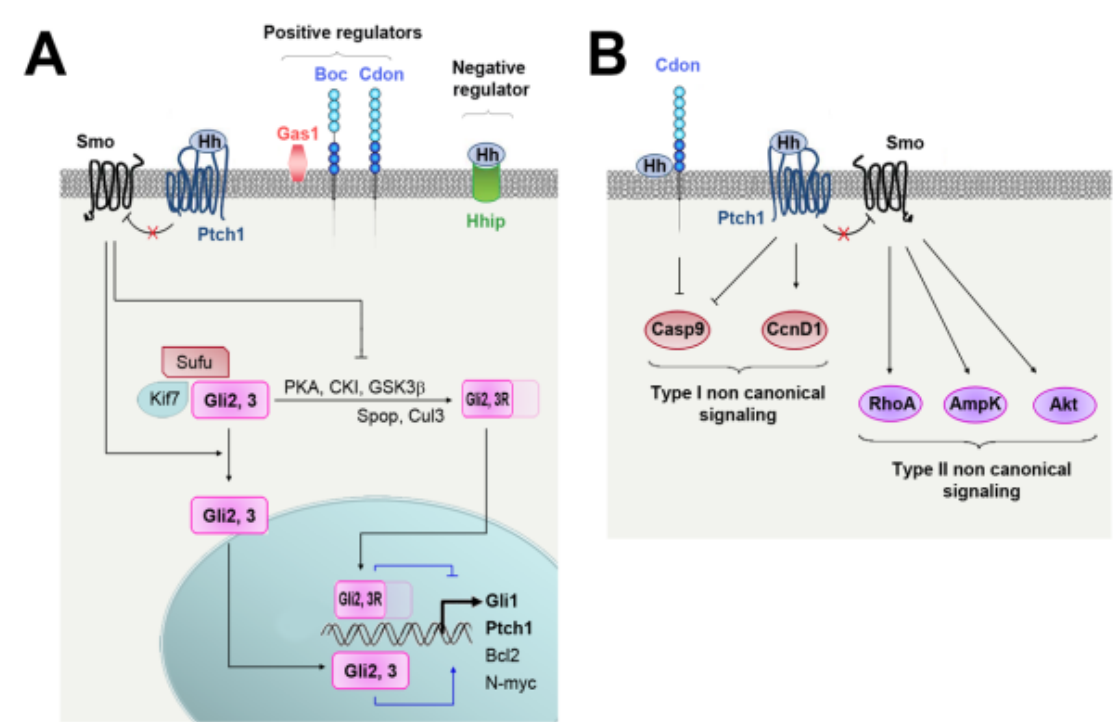


Figure 15. Voies de signalisation Hh - issu de (Chapouly et al. 2019)

A. Voie canonique Hh. En l'absence de ligands Hh, Smo est inhibé par Ptch1 et les facteurs de transcription Gli sont associés à Sufu et Kif7. Ce dernier complexe favorise la phosphorylation de Gli3 et Gli2 par PKA, CK1 et GSK3 β . Une fois phosphorylées, Gli2 et Gli3 sont traitées par le complexe d'ubiquitine ligase Spop/Cul3 pour générer respectivement Gli2R et Gli3R (formes répressives). La liaison des ligands Hh à Ptch1 conduit à l'activation de Smo qui empêche le clivage de Gli2 et Gli3. Gli2 et Gli3 de pleine longueur peuvent ensuite être transloqués vers le noyau et activer la transcription.

B. Voie non canonique Hh. La liaison de Hh à Ptch1 ou Cdon peut, indépendamment de Smo, favoriser la survie ou la prolifération cellulaire en modulant respectivement l'activité Casp9 ou CcnD1. Il s'agit de la signalisation non canonique de type I. Alternativement, les ligands Hh peuvent activer PI3K/Akt, RhoA/ROCK ou AMPK, via Smo, mais indépendamment des facteurs de transcription Gli. Il s'agit de la signalisation non canonique de type II.

L'activation de la voie canonique Hh favorise la survie et la prolifération cellulaire par la régulation de Bcl2, N-myc et CyclinD1, tandis que la signalisation non canonique a été impliquée dans les changements du cytosquelette et la migration cellulaire (D. J. Robbins, Fei, et Riobo 2012). La signalisation paracrine induite par Hh sur les cellules adjacentes est le mode de signalisation le plus courant, bien qu'une signalisation autocrine de Hh ait également été proposée.

3. Régulation de la signalisation Hh

La liaison de Hh à Ptch1 est régulée par plusieurs co-récepteurs. Parmi ceux-ci, Cdon (Cell adhesion molecule-related/down-regulated by oncogenes), Boc (Brother of Cdon) et Gas1 (Growth arrest specific) sont suggérés comme promoteurs de l'interaction du ligand Hh avec Ptch1, tandis que Hhip (protéine interagissant avec Hedgehog) l'inhibe (Ramsbottom et Pownall 2016).

De plus, il a été démontré que l'activité de signalisation Hh dépend du **cil primaire**. Le cil primaire est une fine protrusion d'environ 1-5µm de longueur présente à la surface de la majorité des cellules des vertébrés (**Figure 16**) (Bettencourt-Dias et al. 2011). Il est constitué d'une membrane ciliaire entourant un axonème composé de neuf paires de microtubules. Le cil primaire n'est présent à la surface des cellules qu'en phase de quiescence puisque les centrioles qui composent le corps basal de l'axonème sont nécessaires à la division cellulaire.

Cette structure sert d'antenne à la cellule et permet de capter de nombreux signaux extérieurs en regroupant des récepteurs membranaires. C'est le corps basal qui agit comme une zone d'ancrage pour un grand nombre de protéines péricentriolaires. Les fibres de transition, situées entre le corps basal et l'axonème, créent une barrière perméable entre le cil et le reste de la cellule. Une machinerie permettant le transport bidirectionnel de complexes protéiques est mise en place le long de l'axonème. Ce système de transport intraflagellaire (IFT) est possible notamment grâce à des protéines motrices, nommées kinésines pour le transport antérograde et dynéines pour le transport rétrograde.

Plusieurs éléments des voies de signalisation Hh dont Smo, Sufu, Kif7, Gli2 et Gli3 ont été localisés au cil primaire, et la perturbation des gènes codant pour les protéines du cil primaire comme les protéines IFT, talpid3 et Dzip1 (Zinc finger protein)/Iguana reproduisent la plupart des caractéristiques du déficit en Shh (Bangs et Anderson 2017).

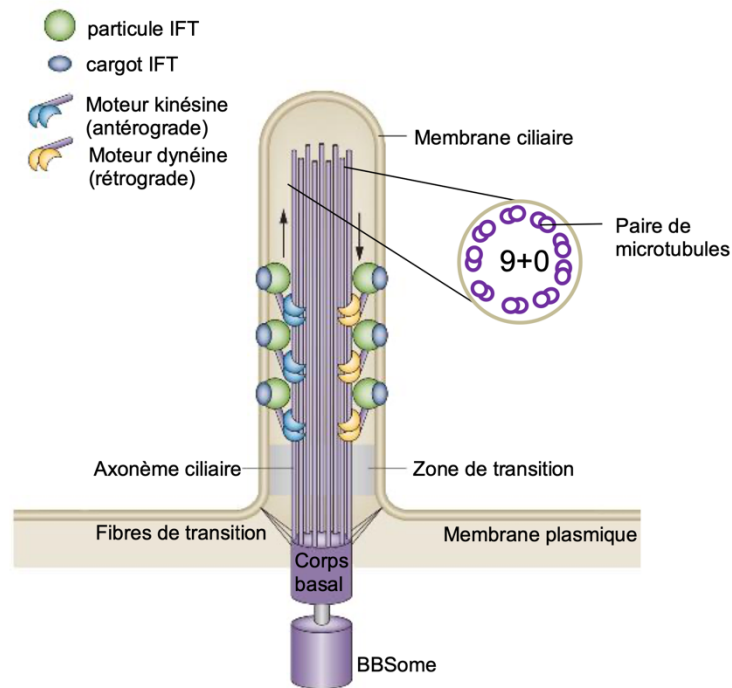


Figure 16. Structure du cil primaire

Le cil primaire est composé d'un axonème ciliaire formé de neuf doublets de microtubules (structure 9+0), d'une membrane ciliaire et d'un corps basal. Les fibres de transition forment une barrière perméable entre le cil et le reste de la cellule. Les protéines cargo sont transportées par des particules IFT de haut en bas du cil grâce aux moteurs kinésine et dynéine qui se déplacent le long de l'axonème. Le BBSome régule le transport et l'assemblage des particules IFT sur l'axonème - adapté de (Valente et al. 2014).

4. Protéine Smo

Smo est une protéine à sept domaines transmembranaires qui appartient à la famille des récepteurs frizzled/taste2. Ce groupe de récepteurs se lie généralement aux **protéines G monomériques** pour transduire le signal et stimuler l'activité des lipides et des protéines kinases. Le couplage de Smo aux protéines G reste cependant controversé. Les études réalisées chez les vertébrés suggèrent la capacité de Smo à s'associer directement et de façon sélective aux membres de la famille des protéines G_i . Cependant, ces données ne sont pas concordantes avec le consensus issu des travaux effectués chez la drosophile suggérant que Smo ne s'associe pas aux protéines G. Ces résultats conflictuels pourraient s'expliquer par le fait qu'il existe des différences significatives en termes de structure primaire de la protéine Smo entre la drosophile et les vertébrés.

L'extrémité C terminale de Smo est également un site important pour la production d'un signal agissant sous le contrôle de la β arrestine2 qui interagit avec des protéines G monomériques, des composants de la cascade de signalisation de la MAPK (mitogen-activated protein kinase) et des tyrosines kinases non-récepteurs (Riobo et Manning 2007; Ayers et Thérond 2010).

Plusieurs hypothèses sont évoquées pour expliquer la levée de la répression de Smo par Ptch1 :

- la première suggère que Ptch1 agit via un mécanisme catalytique (1 molécule de Ptch1 inhibe 250 molécules de Smo),
- la seconde suggère que la répression est induite par la formation d'un complexe physique entre Smo et Ptch1,
- la troisième suggère que Ptch1 agit via une activité mimant celle d'un canal qui met en jeu son domaine stérol (Huangfu et Anderson 2006).

La transduction du signal à partir de Smo conduit à l'activation des facteurs de transcription Gli1, Gli2 et Gli3, qui sont des protéines de liaison à l'ADN de 5 domaines de type doigts de zinc, et qui présentent un certain nombre de domaines communs mais différent par leur extrémité N-terminale. Dans la structure des protéines Gli, on observe la présence de séquences de dégradation (les degrons) à proximité desquelles se trouve le site de liaison de Su(Fu) (suppressor of fused) (Figure 17).

Chez les mammifères, la protéine Su(Fu) participe à la régulation de la transduction des facteurs de transcriptions Gli. Actuellement, le mode de fonctionnement de Su(Fu) est assez mal connu. Deux hypothèses sont évoquées :

- la première suggère que lorsque Su(Fu) et Gli1 sont co-exprimés, Su(Fu) est capable de séquestrer Gli1 dans le cytoplasme et donc d'inhiber son activité transcriptionnelle (Kogerman et al. 1999).
- La seconde suggère que Su(Fu) fonctionne comme un co-répresseur de la transcription des facteurs Gli via le recrutement d'un complexe répresseur transcriptionnel formé par la protéine Sin3A et l'HDAC (histone déacétylase) (S. Y. Cheng et Bishop 2002).

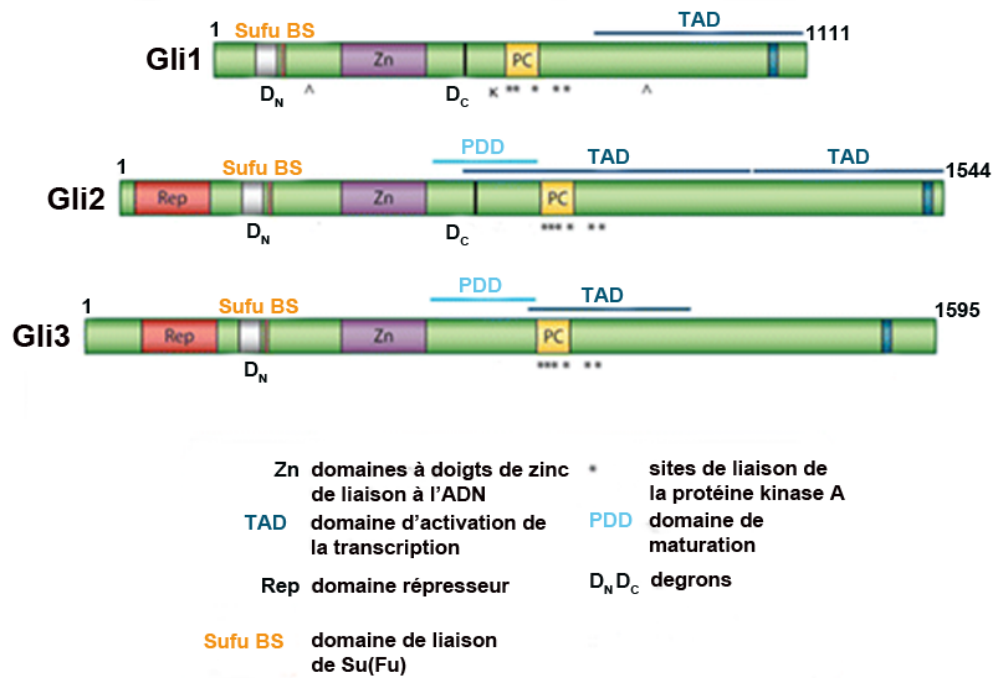


Figure 17. Schéma de la structure comparative des facteurs de transcriptions Gli1, Gli2 et Gli3 - issue de (C.-C. Hui et Angers 2011)

En l'absence des ligands Hh, Ptch inhibe Smo ; Su(Fu) est alors associé aux facteurs Gli. Cela conduit à la formation d'un complexe de dégradation cytoplasmique dans lequel les membres de la famille Gli (Gli1, 2 et 3) sont phosphorylés par des kinases (CKI (caséine kinase I), GSK3 β (glycogène synthase kinase-3 β) et PKA (protéine kinase A)) (Price 2006). Les facteurs Gli phosphorylés sont alors ubiquitylés et pris en charge par le protéasome. Gli1 est totalement dégradé. Gli2 et Gli3 sont eux partiellement dégradés, libérant leur extrémité N-terminale qui fonctionne comme un répresseur transcriptionnel (Koike et al. 2000; Saitoh et Katoh 2001).

En présence des ligands Hh, Smo active la sérine/thréonine kinase STK36 qui phosphoryle Su(Fu), cela a pour conséquence la libération des facteurs Gli de leur complexe répresseur et leur translocation nucléaire sous leur forme complète. Dans le noyau, les facteurs Gli vont alors activer la transcription de gènes cibles (Hallikas et al. 2006; Kasper et al. 2006).

Gli2 et Gli3 sont des médiateurs primaires de la signalisation Hh et sont indispensables au cours de l'embryogenèse, contrairement à Gli1 (Park et al. 2000; Bai et al. 2002), notamment pour le développement du système nerveux central, du squelette, de l'œsophage, de la trachée et des poumons (Mo et al. 1997; Ding et al. 1998; Motoyama et al. 1998). Gli1 semble fonctionner dans le cadre d'une boucle de rétrocontrôle positif, et bien que Gli2 agisse principalement comme facteur transcriptionnel activateur et Gli3 comme facteur transcriptionnel répresseur de la voie Hh, l'ensemble des protéines Gli partagent une fonction activatrice commune (Motoyama et al. 1998; Buttitta et al. 2003; Bai, Stephen, et Joyner 2004; McDermott et al. 2005).

Lors de la liaison des ligands Hh à leur récepteur, l'initiation du signal par les protéines Hh nécessite la formation d'un complexe ternaire qui comprend Hh, Ptch1 et les protéines BOC (Brother of CDO) ou CDO (homologues of the drosophila iHog). BOC et CDO sont des protéines à simple domaine transmembranaire et appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Elles s'associent aux Hh et régulent leur gradient de concentration à la membrane afin de permettre l'action des Hh (Riobo and Manning 2007). D'autres protéines interagissent avec les protéines Hh : Hip1 (Hedgehog Interacting Protein 1) qui code pour une glycoprotéine associée à la membrane (Chuang et McMahon 1999) et Gas1 (Growth Arrest Specific) qui lie le GPI (glycophosphatidylinositol) (Del Sal et al. 1992). Il a été montré que Gas1 est capable d'activer la signalisation Hh (Martinelli et Fan 2007) alors que Hip1 l'inhibe (Hammond et Whitfield 2009). Ptch2 interagit également avec Hip1 et Gas1, et ensemble, leur liaison aux Hh régule le niveau et l'efficacité de leur signalisation (Yu Wang, McMahon, et Allen 2007; Abe et al. 2008).

D. Modulateurs pharmacologiques de la voie Hh dans les essais cliniques

1. Antagonistes de la voie de signalisation Hh

La modulation de la voie de signalisation Hh par des outils pharmacologiques s'est rapidement révélée prometteuse pour le traitement des cancers Hh-dépendants. Dans les années 1950, dans une ferme de l'Idaho (Etats-Unis), plusieurs moutons consommant des graines de fleur sauvage de la famille *oxysepalum* ont donné

naissance à des cyclopes. Après 11ans d'investigation, un alcaloïde produit par cette plante et responsable de la malformation a été découvert et nommé **cyclopamine** (dérivé du terme cyclope) (Keeler et Binns 1968). La cyclopamine inhibe Smo via une interaction directe avec cette protéine : le **premier inhibiteur de la voie Hh** était né (Incardona et al. 1998; Berman et al. 2002; J. K. Chen et al. 2002).

Des molécules capables de réduire l'activité constitutive du récepteur Smo, ainsi que des molécules ayant pour cible Shh ou les facteurs de transcription Gli ont alors pu voir le jour.

Un dérivé de la cyclopamine, l'**IPI-926** ou Pipeline-Saridegib (Infinity Pharmaceuticals), plus facile à produire et plus soluble, a également été étudié comme agent thérapeutique potentiel. **IPI-926**, en inhibant la prolifération des cellules stromales, favorise la perfusion de la tumeur et améliore la concentration de la chimiothérapie dans le tissu cancéreux (Kenneth P. Olive et al. 2009). Le potentiel synergique de l'association entre cette molécule et une chimiothérapie est à l'étude et cette molécule est également en phase I d'un essai clinique pour le traitement du carcinome baso-cellulaire (Jimeno et al. 2013).

Puis de nombreux inhibiteurs de Smo, qui diffèrent en structure de la cyclopamine ont été développés : le **GDC-0449** ou **Vismodegib** (Genentech/Curis), le LDE225 et le LEQ506 (Novartis Pharmaceuticals), le BMS-833923 ou XL-139 (Bristol-Myers Squibb), le PF-0449913 (Pfizer), le LY2940680 (Lilly) et les **SANT74** et **75** (Merck Chemicals). L'ensemble de ces molécules empêche le passage de Smo de sa forme inactive à sa forme active.

Des inhibiteurs du transport de Smo inactif du cytoplasme vers le cil primaire sont également développés : les **SANT1-4** (Merck Chemicals) (Katoh et Katoh 2005; Rudin et al. 2009; Tremblay et al. 2009; Hongbo Yang et al. 2009; Buonamici et al. 2010).

Si les études actuelles se focalisent sur les inhibiteurs de Smo, il existe également des molécules qui agissent sur d'autres cibles de la signalisation Hh : certaines bloquent la transcription de Gli comme les **GANT58** et **61** (Tocris Bioscience) (Lauth

et al. 2007), d'autres comme la **robotnikinin** (Harvard Scientists) se fixent à Shh et empêchent sa fixation sur Ptch1 (Stanton et al. 2009). Un anticorps dirigé contre **Ptch1** est également à l'étude (Nakamura et al. 2007) (**Figure 18**).

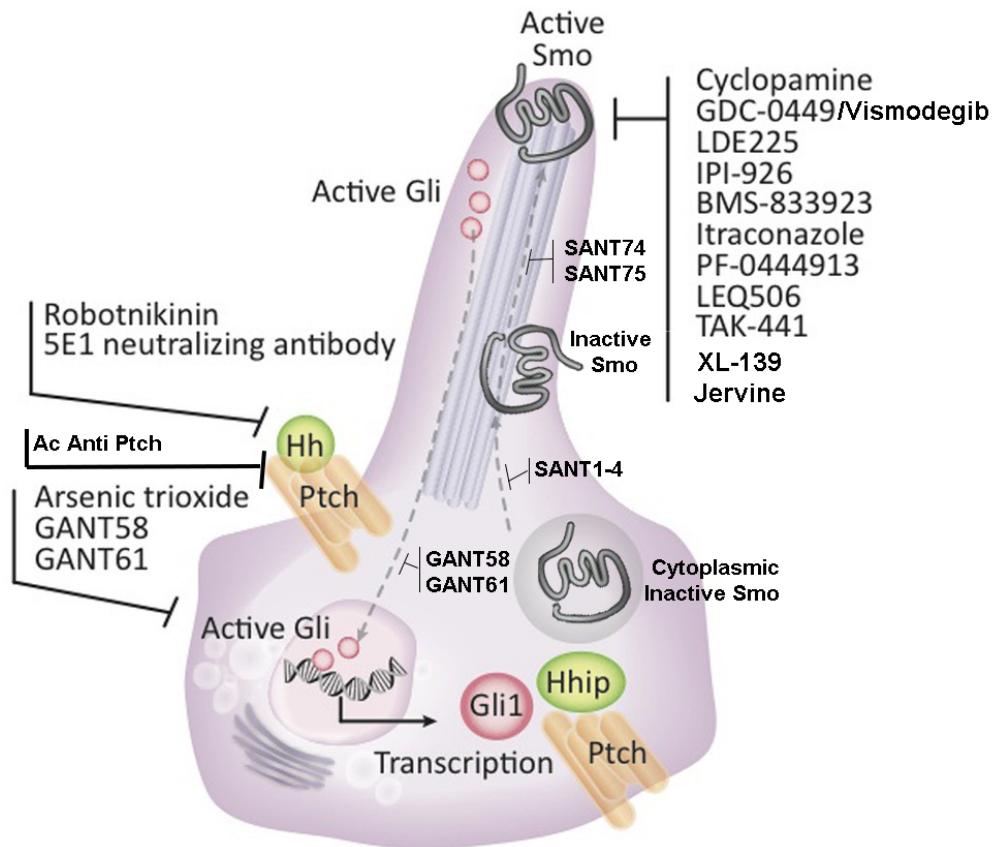


Figure 18. Sites d'action des différents inhibiteurs pharmacologiques de la voie de signalisation Hh - inspiré de (Onishi et Katano 2011; M. Hui et al. 2013)

Certaines de ces molécules font l'objet d'essais cliniques et en janvier 2012, le **vismodegib** est devenu le premier agent thérapeutique ciblant la voie Hh à recevoir l'approbation de la FDA, puis en juillet 2013 l'approbation de l'Agence européenne des médicaments, pour le traitement des patients adultes présentant un **carcinome baso-cellulaire** métastatique ou localement avancé et inéligible à un traitement chirurgical ou par radiothérapie (Meiss, Andrlová, et Zeiser 2018). Les résultats semblent prometteurs avec une réduction partielle et parfois totale de la tumeur.

En 2015, un essai de phase II démontrait une réduction de l'invasion métastatique chez des patients atteints de **médulloblastome** (Robinson et al. 2015). Cependant,

un patient chez qui les lésions métastatiques avaient régressé de façon importante a rechuté un mois plus tard du fait d'une mutation du gène codant pour Smo (substitution d'un résidu acide aspartique de Smo). Cette mutation n'avait aucun impact sur la voie de signalisation Hh mais empêchait le vismodegib de se fixer sur sa cible et donc d'inhiber la signalisation Hh (Rudin et al. 2009; Yauch et al. 2009). Les données cliniques sont encore limitées, mais pour les patients récidivants ou réfractaires, il pourrait représenter une option thérapeutique (Lou, Nelson, et Kool 2019).

Cette molécule est également en essai clinique pour le traitement du **cancer colorectal** métastatique (Berlin et al. 2013), du **cancer du poumon à petites cellules** (Tian et al. 2012), du **cancer pancréatique** (B. N. Singh et al. 2011) du **cancer de la prostate**, du **chondrosarcome** (Sandhiya et al. 2013), du **cancer de l'ovaire** (Kaye et al. 2012).

Elle aurait également montré son efficacité sur des lignées cellulaires de **leucémie myéloïde chronique BCR-ABL** positives, mais pour l'instant aucun essai clinique n'a été publié à ce sujet (Katagiri et al. 2013; Okabe et al. 2012).

2. Agonistes de la voie de signalisation Hh

L'implication de la voie de signalisation Hh dans la structuration et la croissance des structures cérébrales, le développement de nombreux organes au cours de l'embryogenèse, la biologie des cellules souches et l'homéostasie tissulaire chez l'adulte ont ouvert la voie à l'étude de petites molécules modulatrices de cette voie dans les processus de **réparation tissulaire** dans diverses pathologies.

Bien qu'un nombre impressionnant d'antagonistes de Smo aient été développés (F. Wu et al. 2017), seul un nombre limité d'**agonistes** ont été caractérisés (**Figure 19**) et aucun n'a atteint les essais cliniques (Ruat et al. 2014).

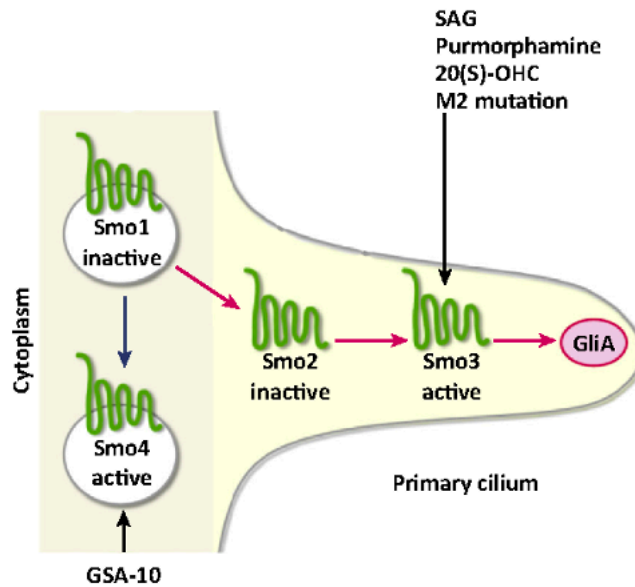


Figure 19. Sites d'action des principaux agonistes pharmacologiques de la voie de signalisation Hh - adapté de (Ruat et al. 2014)

OHC-hydroxycholestérol

2.1. Agonistes endogènes

Smo est un récepteur à sept domaines transmembrannaires ayant la particularité d'être constitutivement actif et régulé par un récepteur à 12 domaines transmembrannaires : Ptch (Hadden 2014). Une des hypothèses permettant d'expliquer le mécanisme d'inhibition exercé par Ptch sur Smo serait que Ptch pourrait réduire la quantité de ligand endogène disponible pour moduler l'activité de Smo.

Une étude a fourni des preuves solides que Ptch régule la concentration de cholestérol intracellulaire de cellules Hh-dépendantes, en contribuant à l'efflux du cholestérol (c'est-à-dire en captant du cholestérol à partir des macrophages afin de l'évacuer des vaisseaux), et que cette activité pourrait être un facteur de prévention de l'accumulation de Smo à la membrane plasmique (Bidet et al. 2011). Le **cholestérol et ses dérivés** ont donc été proposés comme des ligands potentiels naturels du récepteur Smo. En effet, la déplétion cellulaire génétique ou pharmacologique en stérols rend les cellules moins sensibles au ligand Shh (Cooper et al. 2003; Corcoran et Scott 2006). De plus, le 20(S)-OH (hydroxycholestérol) est

capable d'activer la voie de signalisation Hh (Corcoran et Scott 2006; Nachtergaele et al. 2012). L'étude des mécanismes d'action par lesquels ces oxystérols activent la voie Hh montre que les **oxystérols** se lient directement à Smo.

2.2. Agonistes synthétiques

Plusieurs agonistes synthétiques ont été caractérisés (**Figure 20**). Ils se fixent directement sur le récepteur Smo et entraînent son activation via un changement de conformation protéique (Stanton et Peng 2010).

La molécule **SAG** (Hh-Ag 1.3) a été découverte parmi une famille de benzothiophènes biaryliques (Hh-Ag 1.1 - Hh Ag 1.5) lors d'un criblage à haut débit basé sur l'inhibition de l'activité du gène rapporteur Gli-luciférase stimulée par la protéine Shh. Les premières études visant à déterminer le mode d'action de la molécule SAG ont été réalisées à l'aide d'un dérivé tritié de Hh-Ag 1.5 et ont démontré que le SAG inhibe la liaison du radio-ligand au récepteur Smo (Frank-Kamenetsky et al. 2002). Des études similaires avec un dérivé photosensible du SAG radiomarqué ont démontré que ce dérivé se lie également sur Smo au niveau des domaines transmembranaires du récepteur. Ce dérivé inhibe aussi la liaison de la cyclopamine, suggérant qu'il se fixe sur le même site que cet antagoniste (J. K. Chen et al. 2002). Tout comme le ligand Shh, le SAG induit la prolifération des précurseurs des cellules granulaires dans le cervelet et la **translocation du récepteur Smo au niveau du cil primaire** (Rohatgi et al. 2009).

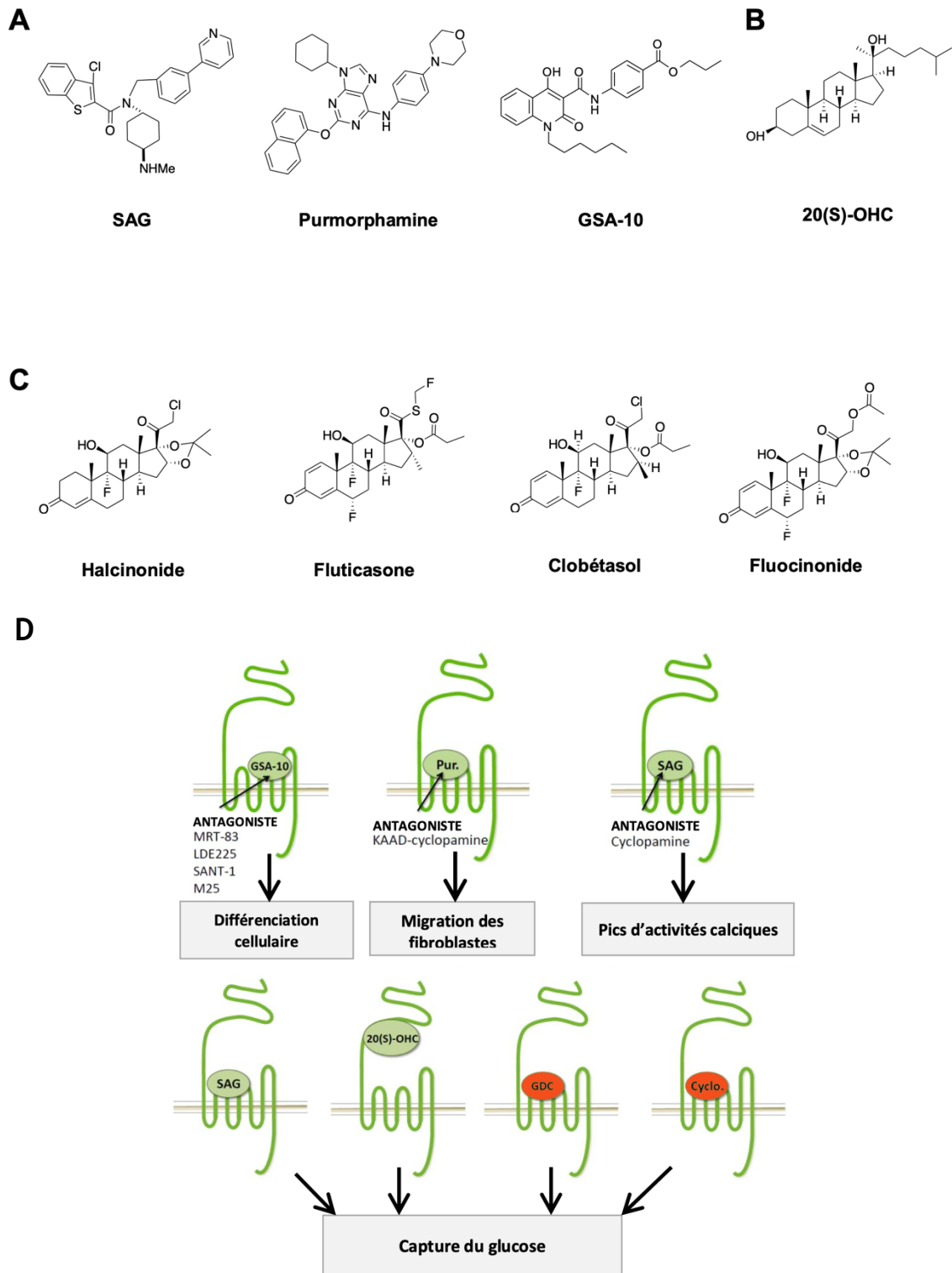


Figure 20. Structures des principales molécules agonistes du récepteur Smo et régulation des voies de signalisation Hh non canoniques par les modulateurs de Smo

A. Structures du SAG, un dérivé de benziothiophène, de la Purmorphamine, un dérivé des purines et du GSA-10, un dérivé des quinolones - d'après (Hadden 2014)

B. Structure du 20(S)-OHC (hydroxycholestérol) - d'après (Hadden 2014)

C. Structures de dérivés glucocorticoïdes proposés comme agonistes de Smo - d'après (Hadden 2014)

D. Les protéines Hh et les ligands de Smo, le SAG, la Purmorphamine (Pur.), le GSA-10, le 20(S)-OHC, le GDC-0449 et la Cyclopamine (Cyclo) induisent des réponses cellulaires par des voies de signalisation Hh non canoniques - adapté de (Ruat et al. 2014)

La Purmorphamine induit la migration de fibroblastes par de petites GTPases, Rac1 et RhoA (Ariel H. Polizio et al. 2011).

Le SAG stimule des pics d'activités calciques dans le cil primaire des neurones post-mitotiques de la moelle épinière en développement (Belgacem et Borodinsky 2015).

Le SAG induit également, par l'intermédiaire d'une protéine kinase activée par l'AMP (Ampk), dépendante du Calcium une **absorption rapide de glucose dépendante du cil primaire** (Teperino et al., 2012). Le 20(S)-OHC mais aussi deux antagonistes de la voie Hh canonique (le GDC et la Cyclopamine (Cyclo.)) ont des propriétés agonistes envers cette réponse (Ruat et al. 2014).

Le SAG a la particularité de présenter une **courbe d'activité biphasique**. En effet, à partir de concentrations supérieures à $1\mu\text{M}$, le SAG inhiberait la voie Hh (Frank-Kamenetsky et al. 2002). Il a été montré que cette perte d'activité n'est pas due à des effets cytotoxiques du composé. Ce dernier pourrait inhiber un composant cellulaire nécessaire à l'activation de la voie Hh (J. K. Chen et al. 2002). Cependant, dans un modèle d'explant de tube neural de poulet, des concentrations croissantes de SAG ($0.1-1\mu\text{M}$) miment de façon dose-dépendante l'effet de Shh sur la différenciation des cellules du tube neural (Frank-Kamenetsky et al. 2002).

Deux études ont ensuite permis de mieux comprendre les exigences structurelles pour l'activation de la voie de signalisation Hh par cette classe d'agonistes, et ont conduit au développement de composés dérivés du SAG plus puissants et moins toxiques (Brunton et al. 2009; Seifert et al. 2012).

La **purmorphamine** appartient à une deuxième famille chimique agoniste de Smo dérivée des purines et a été découverte lors d'un criblage à haut débit basé sur l'induction de la différenciation de cellules mésenchymateuses en ostéoblastes mettant en jeu différentes voies de signalisation, dont la voie Hh (X. Wu et al. 2002). Cette molécule ostéogénique s'est ensuite révélée capable d'induire la transcription des gènes Gli1, Gli2 et Ptch, démontrant clairement que ses effets résultaient d'une activation de la voie Hh (X. Wu et al. 2004). Une série d'expériences a permis d'identifier Smo comme étant la cible de la purmorphamine. En effet, la purmorphamine est inactive sur des cellules MEF Smo^{-/-} (fibroblastes embryonnaires de souris) mais restaure l'activité de la voie Hh sur des cellules MEF Ptch^{-/-} (Sinha et

Chen 2006). De plus, la purmorphamine inhibe la liaison de la cyclopamine sur le récepteur Smo (Sinha et Chen 2006). Elle a été utilisée dans plusieurs systèmes *in vitro* pour étudier le potentiel thérapeutique de l'activation de la voie Hh (Beloti, Bellesini, et Rosa 2005b; 2005a; Fontaine et al. 2008), et plusieurs études rapportent les effets neuroprotecteurs de la purmorphamine *in vivo* sur des modèles murins (Chechneva et al. 2014a; Shao et al. 2017).

Le **GSA-10** diffère par le fait qu'il ne reconnaît pas le site de liaison de la cyclopamine. Il est le seul à stimuler Smo pour induire la différenciation cellulaire par un mécanisme qui n'implique ni l'augmentation de la transcription des gènes Ptch et Gli1, ni la translocation de Smo dans le cil primaire (Gorojankina et al. 2013). Il est fortement potentialisé par la toxine cholérique et la forskoline (inhibiteur de l'adénylate cyclase) et il favorise la différenciation des cellules progénitrices mésenchymateuses multipotentes en ostéoblastes. Le GSA-10 a permis de mettre en évidence deux formes conformationnelles de Smo, SmoSAG et SmoGSA-10, pouvant être discriminées pharmacologiquement par les antagonistes de Smo. Ainsi, plusieurs antagonistes comme le GDC-0449, le CUR61414, la cyclopamine ou le MRT-92 perdent leur sensibilité pour inhiber le SmoGSA-10 (Gorojankina et al. 2013).

Enfin, le criblage de molécules approuvées par la FDA et utilisées en clinique a permis d'identifier plusieurs **glucocorticoïdes synthétiques** comme agonistes potentiels de la voie de signalisation Hh et plus particulièrement du récepteur Smo. Ces composés sont capables de stabiliser la β -arrestine favorisant l'internalisation de Smo au sein de vésicules, mais aussi d'induire l'activité Gli-luciférase, la prolifération des précurseurs de cellules granulaires du cervelet et de potentialiser l'effet prolifératif de Shh sur ces cellules (J. Wang et al. 2010). Cependant, ces composés n'inhibent que partiellement la liaison de la cyclopamine (20 à 25%), suggérant des sites d'interaction différents (J. Wang et al. 2010). Initialement, quatre glucocorticoïdes fluorés de synthèse (halcinonide, fluticasone, clobétasol et fluocinonide) ont été identifiés comme agonistes de Smo. Une seconde étude basée sur l'accumulation du récepteur Smo au niveau du cil primaire a mis en évidence d'autres glucocorticoïdes, tels que la fluocinolone ou la triamcinolone, comme agonistes du récepteur Smo (Yu Wang et al. 2012). Cependant, parmi ce second criblage, deux glucocorticoïdes, le budénoside et le ciclésone, ont montré des

effets antagonistes, suggérant que des molécules ayant des structures chimiques très proches peuvent avoir des effets opposés.

IV. VOIE DE SIGNALISATION HH ET VAISSEAUX

A. Embryogenèse

Plusieurs études réalisées chez l'embryon ont permis de mettre en évidence l'implication des morphogènes Hh dans l'angiogenèse et la vasculogenèse au cours du développement.

1. Vascularisation du sac vitellin

Le sac vitellin est un bon modèle expérimental pour l'étude de la transition vasculogenèse-angiogenèse. Or, il a été démontré que la **signalisation Hh orchestre l'angiogenèse** dans le sac vitellin puisque les embryons Smo^{KO} ne parviennent pas à former les vaisseaux sanguins du sac vitellin (Byrd et al. 2002). *Ihh*, sécrétée par l'endoderme primitif, semble être le principal ligand responsable de cet effet (Dyer et al. 2001).

Néanmoins, alors que les embryons Smo^{KO} ne forment aucun vaisseau sanguin, les embryons Ihh^{KO} forment des vaisseaux qui ne subissent pas de remodelage vasculaire, c'est-à-dire pas de ramification en grandes et petites branches ni de couverture par les péricytes (Byrd et al. 2002; T. Nagase et al. 2006).

Cela suggère :

- soit que *Shh* et/ou *Dhh* participent également à la vascularisation du sac vitellin,
- soit que les effets d'*Ihh* sont partiellement compensés par *Shh* et/ou *Dhh* en l'absence d'*Ihh*.

Il a été démontré que la **signalisation Hh favorise la vasculogenèse** via *FoxF1* (Forkhead box protein F1) et *BMP4* (Bone morphogenetic protein) (Dyer et al. 2001; Astorga et Carlsson 2007) tandis que le remodelage des vaisseaux semble dépendre

de VEGF, Flk-1 (Flowering locus K homology domain) et Notch-1 (M. Nagase et al. 2006) (Figure 21).

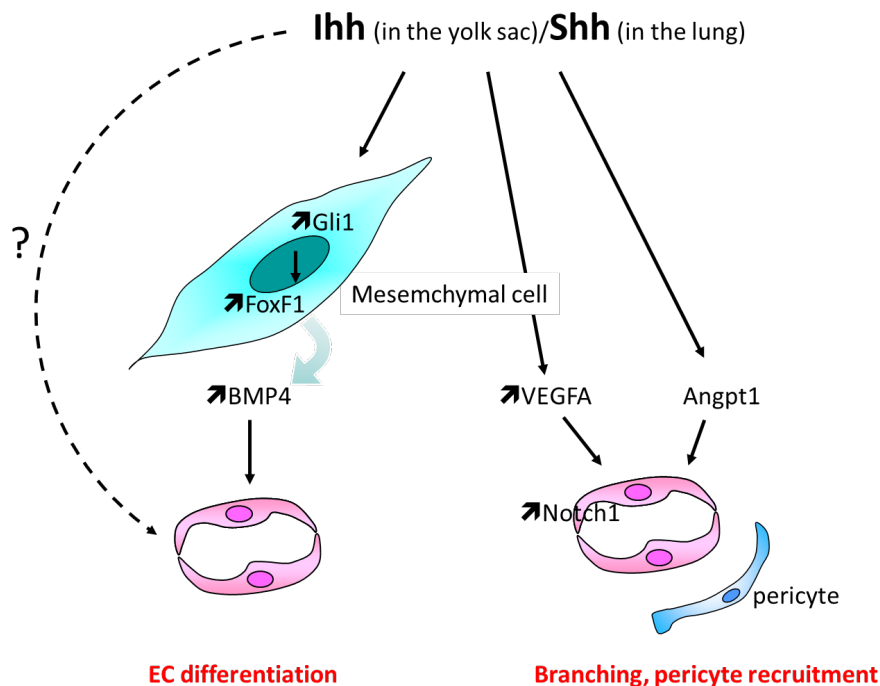


Figure 21. Schéma représentant les principaux événements cellulaires impliqués dans la vasculogénèse induite par la signalisation Hh et le remodelage du plexus vasculaire primaire - issu de (Chapouly et al. 2019)

Au niveau cellulaire, on ne sait toujours pas quels types de cellules répondent aux signaux Ihh: *in vitro*, les CE semblent répondre directement à Ihh puisque les cellules C166 (une lignée de CE de sac vitellin de souris) répondent à la protéine recombinante Shh en surexprimant Gli1 et Ptch1 et en migrant davantage. De plus, dans ces cellules, Shh augmente également l'expression de Nrp1 (Neuropilin), Klf4 (Krueppel-like factor), Jag1 (Jagged) et Col4a1 (Collagen type IV alpha 1 chain), principaux facteurs impliqués dans la biologie de la CE (Hochman et al. 2006a).

2. Développement vasculaire des poumons

Les premiers rapports d'un défaut de vascularisation secondaire à un déficit en Shh ont été réalisés dans des poumons de souris (Pepicelli, Lewis, et McMahon 1998). Plus tard, un système vasculaire altéré caractérisé par un réseau clairsemé avec de grands espaces entre les capillaires a été décrit dans la partie distale des poumons

d'embryons de souris Shh^{KO} et Smo^{KO} (Miller et al. 2004; A. C. White, Lavine, et Ornitz 2007).

L'expression de VEGFA dépend de Smo dans la partie distale du poumon tandis que son expression dans le mésenchyme sous-épithélial semble être moins dépendante de la signalisation Hh (A. C. White, Lavine, et Ornitz 2007). Cependant, le lit vasculaire pulmonaire est diminué dans les embryons Shh^{KO} proportionnellement à la diminution de la ramification des voies aériennes et l'expression de VEGFA ne serait pas différente de celle du poumon témoin (van Tuyl et al. 2007). Le développement vasculaire précoce dans les poumons, médié par la signalisation VEGF/VEGFR-2, semble ensuite se dérouler normalement dans les embryons Shh^{KO} , probablement en raison d'effets compensatoires possibles des autres ligands Hh. Au contraire, la stabilisation vasculaire est défectueuse en raison de la régulation négative de l'Angpt1 (van Tuyl et al. 2007).

Au niveau cellulaire, le développement du réseau capillaire pulmonaire ne dépend pas d'un effet direct de Shh sur la CE car il est normal dans les poumons Smo^{ECKO} (A. C. White, Lavine, et Ornitz 2007). Au contraire, il dépend de l'expression de FoxF1 induite par Shh, via des sites de liaison Gli, dans des cellules non identifiées, très probablement de type mésenchymateux (Seo et al. 2016) (**Figure 20**).

3. Formation de l'aorte et des vaisseaux intersomitiques

La signalisation Hh est également nécessaire à la formation de l'aorte. Dans les embryons aviaires, l'inhibition de Smo et Shh, en utilisant respectivement la cyclopamine et les anticorps bloquant 5E1, entraverait à la fois la formation et le remodelage de l'aorte (S. A. Vokes et al. 2004; Kolesová, Roelink, et Grim 2008; Moran, Salanga, et Krieg 2011).

De plus, l'activation de la voie Hh avec le **SAG (Smoothened agonist)** conduit à la formation d'une aorte ectasique. Il a également été souligné que les angioblastes d'embryons de souris Smo^{KO} ne parviennent pas à organiser et à former une aorte, en particulier dans les deux tiers antérieurs de l'embryon (S. A. Vokes et al. 2004), tandis que l'activation de la voie Hh par la suppression de Ptch1 (régulateur négatif

de la signalisation Hh) se traduit par une aorte dorsale ectasique (Coultas et al. 2010).

De manière cohérente, des études menées sur des embryons de poisson zèbre signalent que des mutations de *Syu* (Sonic-you, un orthologue de Shh), *yot* (You-too, un orthologue de Gli2) ou *Smo*, ou des poissons-zèbres traités par cycloamine ne forment pas d'aorte dorsale (Brown et al. 2000; Nathan D. Lawson, Vogel, et Weinstein 2002; Williams et al. 2010a) et que l'administration d'anticorps bloquant 5E1 entraîne de nombreux défauts vasculaires, y compris une fusion retardée de l'aorte dorsale et des hémorragies (Kolesova, Roelink, et Grim 2008). En outre, Shh favorise la **différenciation artérielle**, car les poissons zèbres mutants *Syu*, *yot* et *Smo* ne parviennent pas à exprimer EphrinB2, un marqueur spécifique artériel (N. D. Lawson, Vogel, et Weinstein 2002) (**Figure 22**).

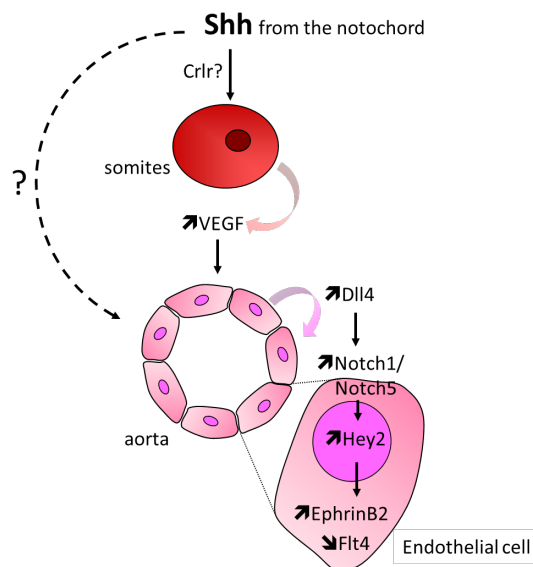


Figure 22. Schéma représentant les principaux événements cellulaires impliqués dans la différenciation artérielle induite par Hh - issu de (Chapouly et al. 2019)

Shh favoriserait la formation des tubes artériels et l'identité artérielle via VEGFA (N. D. Lawson, Vogel, et Weinstein 2002; Coultas et al. 2010; T. Nagase et al. 2006). Plus spécifiquement, Shh peut induire l'expression de VEGFA dans des somites via un récepteur de type calcitonine (Nicoli et al. 2008) qui à son tour favorise l'expression de Notch5 dans les CE. L'activation de la signalisation Noth,

inhibe Flt4 et favorise l'expression d'EphrinB2 (N. D. Lawson, Vogel, et Weinstein 2002).

Une autre hypothèse suggère que Shh serait nécessaire à l'organisation des angioblastes et favoriserait l'identité artérielle en réprimant le sort des cellules veineuses dans les angioblastes (Williams et al. 2010a). Ceci est soutenu par le fait que les angioblastes, et plus tard les CE aortiques, expriment Ptch1, Ptch2 et Smo (S. A. Vokes et al. 2004).

Dhh est, quant à elle, exprimée par l'endothélium des gros vaisseaux au cours du développement embryonnaire (Bitgood et McMahon 1995b). Dhh est fortement surexprimée lors des contraintes de cisaillement à la fois *in vitro* et *in vivo* (Ni et al. 2010). En conséquence, son expression est principalement retrouvée au niveau des CE artériolaires chez l'adulte (Vanlandewijck et al. 2018). Les souris Dhh^{KO} sont viables avec des atteintes des nerfs périphériques, une perméabilité accrue des vaisseaux endo-neuraux (Sharghi-Namini et al. 2006a) et une atteinte de la fertilité des mâles (Bitgood, Shen, et McMahon 1996b; Parmantier et al. 1999b).

4. Implication de la signalisation Hh dans le développement d'autres lits vasculaires

La signalisation Hh est impliquée dans le développement vasculaire d'autres organes, notamment la rétine, le cerveau, le squelette et le cœur.

La rétine: la signalisation Hh est impliquée dans l'angiogenèse rétinienne, car la cyclopamine inhibe l'angiogenèse rétinienne (Surace et al. 2006) qui s'avère nécessaire pour la survie de la CE rétinienne et des péricytes. En effet, Shh promeut Ptch1, Gli2, Notch1, Notch3, Bcl2 et Bclxl mais inhibe l'expression de Bax dans les CE rétiniennes alors qu'il promeut Ptch1, Gli2, Notch1 et Bcl3 dans les péricytes. Cependant, alors que le flux pulsatile favorise la signalisation Hh et la survie de la CE rétinienne, il l'inhibe dans les péricytes rétiniens (Walshe et al. 2011).

Le cerveau: les embryons déficients en Gli2 sont dépourvus de tronc basilaire (Berrios-Otero et al. 2009) probablement en lien avec une diminution de la

production de Shh par les CE du plexus choroïde du Rhombencéphale, alors qu'il favorise sa vascularisation à l'état physiologique. Shh adresse très probablement des signaux aux péricytes et non pas aux CE, car seuls les péricytes expriment Ptch1 dans cette étude (Nielsen et Dymecki 2010).

Le squelette: Ihh favorise l'organisation et la stabilité tridimensionnelle des vaisseaux sanguins squelettiques (Colnot et al. 2005), et la protéine recombinante Shh améliore l'angiogenèse et l'ostéogenèse dans un système de co-culture composé d'ostéoblastes primaires et de CE (Eva Dohle et al. 2010). Dans les os, Ihh agirait en aval de la signalisation VEGF car la signalisation VEGFA/VEGFR-2 stimule son expression et son activité (Duan et al. 2015).

Le cœur: Shh est nécessaire à l'expression de VEGFA, VEGFB, VEGFC et Angpt2 induite par FGF9 dans les cardiomyocytes et les cellules périvasculaires (Lavine et al. 2006). Dans les cardiomyocytes, la signalisation Hh permettrait le développement des veines coronaires, tandis que dans les cellules périvasculaires, la signalisation Hh serait nécessaire à la croissance coronaire artérielle (Lavine et al. 2008).

Les somites: Dans les embryons aviaires, l'inhibition de Smo et de Shh compromet la croissance des vaisseaux intersomitiques (Moran et al. 2012), tandis que l'activation de la voie Hh par le SAG conduit à une densification des plexus vasculaires. En outre, le nombre de filopodes des CE est corrélé avec l'activité de la signalisation Hh puisque le nombre de filopodes diminue dans les embryons traités par cycloamine, tandis qu'il augmente dans ceux traités par le SAG (Moran, Salanga, et Krieg 2011). Au niveau moléculaire, la croissance des vaisseaux intersomitiques semble dépendre de VEGFA mais être indépendante de Notch ou BMP (Moran et al. 2012).

Enfin, il a été démontré que la surexpression ectopique de Shh dans le **tube neural dorsal** induit une hyper-vascularisation de la moelle épinière (Rowitch et al. 1999), tandis que l'expression ectopique d'une forme constitutivement active de Smo (SmoM2) dans les ovaires augmente la densité de tubes endothéliaux CD31+ chez les souris (Ren et al. 2012).

B. Angiogenèse post-natale

1. Dans un contexte ischémique

Au-delà de son rôle dans la vascularisation des embryons, la signalisation Hh a également été identifiée comme régulant l'angiogenèse post-natale, en particulier dans un contexte post-ischémique (R. Pola et al. 2001) et dans les cancers (W. Chen et al. 2011).

Les propriétés pro-angiogéniques des ligands Hh ont été confirmées notamment au niveau **du cœur** (K. F. Kusano et al. 2005; Ahmed et al. 2010), **du cerveau** (Y. Jin et al. 2017; Chechneva et al. 2014b; S.-C. Chen et al. 2017), de **la peau** (J. Asai et al. 2006) et des **nerfs périphériques** (K. F. Kusano et al. 2004).

Dans chacun de ces organes, l'administration de Shh (ou d'un agoniste de Smo) augmente la densité capillaire après ischémie. Conformément aux résultats obtenus dans le muscle squelettique de patte, l'angiogenèse induite par Shh dans le **cœur** n'implique pas l'activation de la signalisation Hh dans les CE (Gupta et al. 2018a). Au contraire, l'angiogenèse induite par Shh est associée à une **augmentation des niveaux de VEGFA** dans tous ces tissus (K. F. Kusano et al. 2005; Jun Asai et al. 2006; S.-C. Chen et al. 2017), même s'il a été décrit que Shh est aussi capable d'agir directement sur les CE *in vitro* en stimulant leur migration et la morphogenèse capillaire (P. Chinchilla et al. 2010; M.-A. Renault et al. 2010).

De façon similaire, l'**angiogenèse rétinienne** provoquée par un processus ischémique est à l'origine d'une surexpression de Shh et de VEGF, effets inhibés par la cyclopamine, antagoniste pharmacologique de Smo (Surace et al. 2006).

Le rôle du VEGFA dans l'angiogenèse induite par Shh a été prouvé à la fois dans la **peau** (J. Asai et al. 2006) et dans le **cerveau** (S.-C. Chen et al. 2017) en utilisant des anticorps anti-VEGFA. Dans le modèle de **cicatrisation de la peau**, la transfection d'ADN nu codant pour Shh stimule la réparation tissulaire via la vasculogenèse et le recrutement de **cellules progénitrices de la moelle osseuse**.

Shh favoriserait également les capacités angiogéniques des cellules dérivées de la moelle osseuse dans le cœur (K. F. Kusano et al. 2005; Bueno-Betí et al. 2019). Cependant, le rôle de la signalisation endogène Hh dans le cœur n'est pas claire ; tandis que Lavine KJ et al. ont rapporté que l'administration d'anticorps bloquant Hh diminue la densité capillaire et la survie des cardiomyocytes post infarctus du myocarde (Lavine, Kovacs, et Ornitz 2008), il a également été démontré que l'administration de cyclopamine améliore la fonction cardiaque (Bijlsma et al. 2008). Dans l'infarctus, la transfection d'ADN codant pour la protéine Shh humaine permet non seulement de stimuler la néovascularisation via le recrutement de progéniteurs endothéliaux mais aussi de réduire la fibrose et l'apoptose cardiaque. De plus, de nombreux facteurs angiogéniques comme le VEGF ou les Angpt sont stimulés par Shh dans les fibroblastes cardiaques (Kengo F. Kusano et al. 2005). L'ensemble de ces données suggère que la signalisation Hh, pendant l'ischémie, par sa capacité à induire la surexpression de facteurs proangiogéniques, stimule de façon indirecte l'angiogénèse.

2. Dans un contexte de Cancer

L'hyperactivation de la signalisation Hh observée dans les tumeurs favoriserait l'angiogénèse tumorale. Plus précisément, le blocage de la signalisation Hh avec les antagonistes de Smo, y compris le GDC-0449 et la cyclopamine, réduit la densité vasculaire des xénogreffes de **cancer du côlon** productrice de Hh (W. Chen et al. 2011), de **carcinomes épidermoïdes linguaux** (Kuroda et al. 2017) ou de **mélanomes** (Geng et al. 2007).

Inversement, l'expression ectopique de Shh dans les xénogreffes DLD-1 exprimant faiblement Hh augmente la densité vasculaire de la tumeur et augmente l'angiogénèse (W. Chen et al. 2011), et les tumeurs implantées chez les souris Hhip^{+/-} présentent une angiogénèse tumorale accrue (Agrawal, Kim, et Kwon 2017). Shh serait également impliquée dans le développement du **carcinome baso-cellulaire**, du **cancer du poumon** et le **medulloblastome** (Athar et al. 2006; Dellovade et al. 2006) en stimulant l'angiogénèse tumorale (Velcheti 2007). Enfin, des niveaux

d'expression élevés de Gli1 ont été corrélés avec une densité microvasculaire accrue dans les Gliomes (Cui et al. 2012) et une expression élevée de VEGFR2 dans les **cancers du sein triple négatifs** (Di Mauro et al. 2017) tandis que l'expression d'Ihh a été associée à l'expression de VEGF et la présence de cellules CD34+ dans le **carcinome hépatocellulaire** (Y. Li et al. 2018).

L'hyperactivation de la signalisation Hh dans les cellules cancéreuses elles-mêmes (c'est-à-dire la surexpression de Gli1 ou Shh) **augmente l'expression de facteurs proangiogéniques**, comme le VEGFA (X. Cao et al. 2012; Cui et al. 2012; X. Liao et al. 2009), MMP2, MMP9 (Cui et al. 2012) et l'héparanase (Zhu et al. 2014) dans les cellules de Gliome ou Cyr61 dans les cellules de cancer du sein (Harris et al. 2012).

Une nouvelle forme tronquée alternativement épissée de Gli1 (mais pas de Gli1 de pleine longueur) se lie au promoteur VEGFA. Ainsi, la protéine Shh produite par les cellules cancéreuses pourrait promouvoir l'expression de VEGFA dans les fibroblastes stromaux (Agrawal, Kim, et Kwon 2017; W. Chen et al. 2011) et induire par la suite la prolifération des CE.

De plus, les ligands Hh produits par les cellules cancéreuses serait également des modulateurs directs de la fonction des CE: Shh est fortement exprimée dans le carcinome épidermoïde lungual humain tandis que les protéines Ptch1, Gli1 et Gli2 sont exprimées dans les cellules microvasculaires du front invasif tumoral (Kuroda et al. 2017; Valverde Lde et al. 2016). Dans des HUVEC en culture, Shh favoriserait la prolifération cellulaire (Geng et al. 2007) tandis que Gli1 favorise l'expression de VEGFR-2 (Di Mauro et al. 2017).

D'autre part la protéine Hhip, antagoniste naturel des ligands Hh, habituellement fortement exprimée par les CE vasculaires, est sous exprimée dans les CE de plusieurs cancers humains lors du processus d'angiogenèse (Olsen et al. 2004). Ces résultats suggèrent que l'expression réduite de Hhip dans la néovascularisation tumorale contribuerait à l'augmentation de la signalisation Hh dans la tumeur et favoriserait l'angiogenèse tumorale (Olsen et al. 2004). Enfin, la protéine Shh produite par les cellules cancéreuses adéno-pancréatiques pourrait promouvoir les propriétés

angiogéniques des cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse (Yamazaki et al. 2008) (Figure 23).

En plus d'être exprimés par les cellules cancéreuses, les ligands Hh (Shh et Ihh) sont également exprimés par les CE (Becher et al. 2008; Valverde Lde et al. 2016; Yan et al. 2014), en particulier dans les carcinomes épidermoïdes oraux et les gliomes, les macrophages (Valverde Lde et al. 2016) et les astrocytes (Becher et al. 2008). Notamment, l'inhibition de Scube2 endothélial supprime l'angiogenèse tumorale (Y.-C. Lin et al. 2018) et Shh peut être transportée par des microvésicules à partir du carcinome épidermoïde oral (Huaitong et al. 2017).

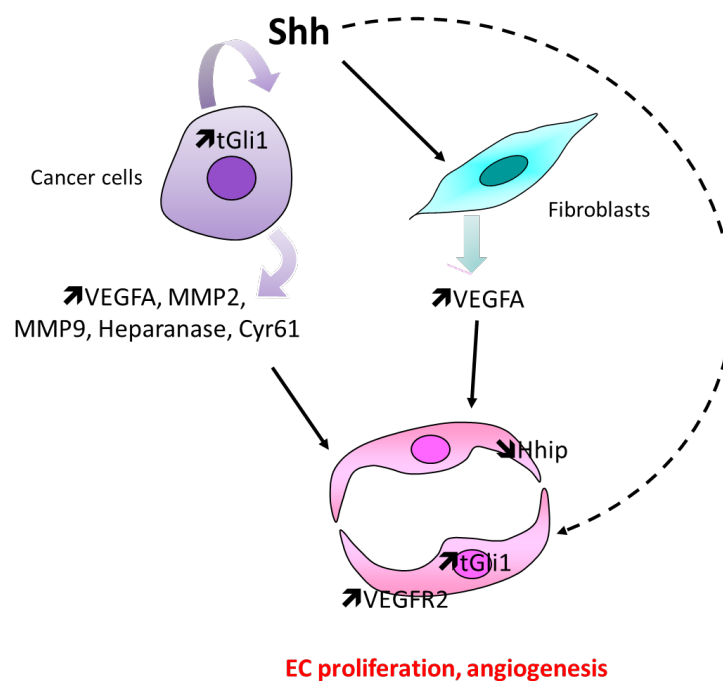


Figure 23. Schéma représentant les principaux événements cellulaires impliqués dans l'angiogenèse tumorale induite par Hh - issu de (Chapouly et al. 2019)

Alors que la plupart des études s'accordent à dire que la signalisation hyper-activée de Hh dans les tumeurs peut favoriser l'angiogenèse tumorale, quelques études ont montré des résultats opposés:

- L'inhibition de Smo par IPI-926 augmenterait la densité des vaisseaux tumoraux dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique (K. P. Olive et al. 2009).

- et les tumeurs déficientes en Shh seraient plus agressives et présenteraient une histologie indifférenciée, une vascularisation accrue et des caractéristiques de prolifération accrue qui sont toutes présentes dans le phénotype de souris témoins traitées par IPI-926.

De plus, l'administration d'un anticorps bloquant VEGFR améliore sélectivement la survie des tumeurs déficientes en Shh (Rhim et al.2014). Par ailleurs, un autre inhibiteur de Smo, NVP-LDE225 (érismodegib), restaure la densité vasculaire dans l'adénocarcinome canalaire pancréatique, diminue la couverture par les péricytes et améliore la perméabilité des vaisseaux, suggérant une proportion accrue de micro-vaisseaux immatures (Roy Chaudhuri et al. 2016).

3. Autres cas d'angiogenèse pathologique

La signalisation Hh a été impliquée dans **l'angiogenèse de la plaque d'athérosclérose**. Notamment, les exosomes dérivés des adipocytes résistant à l'insuline (IRADE) sont porteurs de Shh, ce qui favoriserait la vulnérabilité de la plaque en induisant une angiogenèse des vasa vasorum, en association avec une augmentation des niveaux d'expression de Gli1 et VEGFA (F. Wang et al. 2018).

De plus, Shh et Ptch1 sont surexprimés dans la **rétinopathie** de la prématurité (Surace et al. 2006) et dans la néovascularisation choroïdienne induite par laser (Surace et al. 2006; H. He et al. 2010) favorisant l'angiogenèse pathologique. L'inhibition de la voie Hh (cyclopamine) entraîne une réduction de l'angiogenèse et de VEGFA et Ptch1, plaçant l'activation de Shh en amont de VEGFA dans l'angiogenèse rétinienne expérimentale (Surace et al. 2006).

Par ailleurs, chez les souris présentant une **lésion hépatique** chronique ou des souris qui ont subi une hépatectomie partielle aiguë, l'administration d'un antagoniste de Smo (GDC-0449 ou cyclopamine) empêche la capillarisation de la CE sinusoidale hépatique (Xie et al. 2013).

Enfin, une étude suggère que l'Annexine A2 favoriserait la prolifération et l'angiogenèse de la CE en augmentant *Ihh* et *Gli1* dans le contexte de la **polyarthrite rhumatoïde** (Yi et al. 2016).

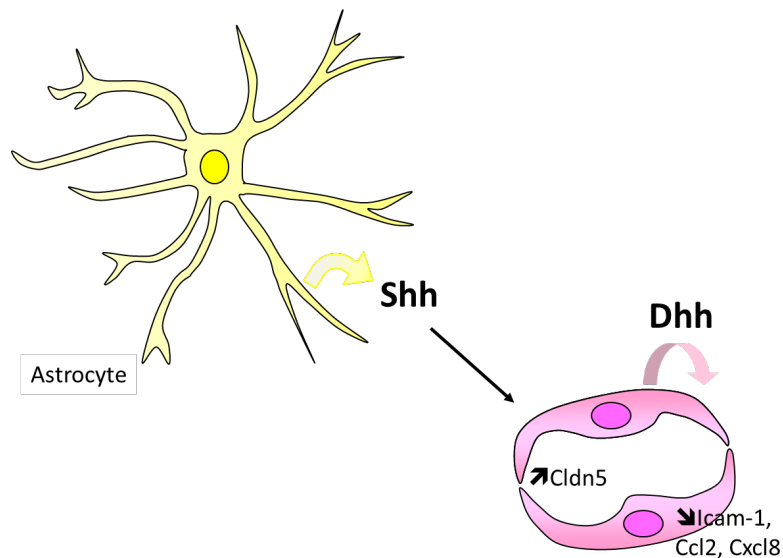
C. Rôle de la voie de signalisation Hh dans le maintien de l'intégrité vasculaire et de la quiescence des cellules endothéliales

1. À la barrière hémato-encéphalique (BHE)

Le rôle essentiel de la signalisation Hh dans le maintien de l'intégrité de la BHE a été mis en évidence pour la première fois en 2011 (J. I. Alvarez et al. 2011). Cette étude a révélé que la signalisation Hh favorise l'intégrité de la BHE à la fois chez les embryons et chez les adultes, car les embryons *Shh*^{KO} et les souris adultes traitées par cyclophamide présentent une fuite vasculaire cérébrale (J. I. Alvarez et al. 2011). Dans cet article, le même phénotype est présent chez les souris *Smo*^{ECKO} (*Tie2-Cre*; *Smo*^{Flox/Flox}), démontrant que les CE sont les cellules médiatrices de la régulation Hh de l'intégrité de la BHE.

L'activation de la signalisation Hh dans les CE diminue la perméabilité de la BHE et augmente la résistance électrique trans-endothéliale des CE du cerveau en favorisant l'expression des protéines de jonctions serrées (*Claudin-3*, *Claudin-5*, *Occludin*, *Jam-A*, *ZO-1*) (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011; Yue Wang et al. 2014) et de jonctions adhérentes (*Cdh5*, *p120*) (J. I. Alvarez et al. 2011). Ainsi, *Shh* est capable de moduler l'expression de protéines de jonction spécifiques des CE: l'occludine, la claudine-3 et -5, la protéine *ZO-1* et la *p120* (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011; Xia et al. 2013a).

Il est important de noter que la régulation positive des protéines de jonction est associée à une augmentation de l'expression de *Gli1*, *Sox18* (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011, 2; Brilha et al. 2017) et *Netrin1* (Podjaski et al. 2015). Enfin, la signalisation Hh empêcherait l'activation des CE, puisque *Shh* et la purmorphamine régulent négativement l'expression de *Ccl2*, *Cxcl8* et *ICAM-1* dans les CE de cerveau en culture, entraînant une diminution de l'adhésion et de la transmigration des cellules T CD4⁺ (J. I. Alvarez et al. 2011) (**Figure 24**).



Maintenance of BBB integrity

Figure 24. Schéma représentant les principaux événements cellulaires impliqués dans le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique - issu de (Chapouly et al. 2019)

L'administration d'agonistes de la signalisation Hh (rec NShh, SAG ou Purmorphamine) augmente l'expression des protéines de jonction serrée et diminue la perméabilité de la BHE (Xia et al. 2013b; Chechneva et al. 2014a; V. B. Singh et al. 2016b; 2017), tandis que l'administration d'un antagoniste de Smo augmente la perméabilité de la BHE et l'inflammation cérébrale (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011; T. Li et al. 2013).

Ces données sont étayées par quelques études *in vitro* dans lesquelles les astrocytes ont été co-cultivés avec des CE cérébrales. La première étude rapporte que la Purmorphamine, agoniste de Smo, diminue les perturbations de la BHE induites par *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* n'affecte pas l'expression astrocytaire de Shh mais diminue l'expression de Scube2 et empêche la sécrétion de Shh (Brilha et al. 2017). Dans la deuxième étude, la phosphatase Wip1, empêche la dégradation de la BHE et la production de cytokines pro-inflammatoires en augmentant l'expression de Shh et Gli1 (Zhen et al. 2018). Un autre article met en évidence la capacité d'oxLDL à promouvoir l'apoptose de CE cérébrales en diminuant la signalisation autocrine induite par Shh (Jiang, Chen, et Zhang 2015). Enfin, Shh pourrait promouvoir l'intégrité de la BHE en augmentant l'expression d'Angpt1 de façon autocrine dans les astrocytes (Xia et al. 2013b).

Cependant, un article récent sur le glioblastome a mis en évidence un effet opposé de la signalisation Hh sur la BHE. Cette étude rapporte que les «cellules de patient initiatrices de glioblastome» sécrètent Dhh qui interagit avec Ptch2 endothélial via un mécanisme paracrine pour exacerber la perméabilité de la BHE (Azzi et al. 2015a). De plus, il a été démontré que la surexpression ectopique de Shh dans le tube neural dorsal induit une hypervascularisation et une hémorragie dans la moelle épinière (Rowitch et al. 1999). Enfin, une autre étude contradictoire rapporte que Shh transportée par des microparticules régule positivement ICAM-1 (Soleti et al. 2009a).

2. À la barrière hémato-nerveuse

Il est également démontré que l'activation de la signalisation Hh dans les CE favorise l'intégrité de la barrière hémato-nerveuse, car les souris Smo^{ECKO} présentent une perméabilité capillaire endoneurale anormale et une inflammation nerveuse (Chapouly et al. 2016a). Dhh dérivée des cellules de Schwann serait responsable de cet effet (Chapouly et al. 2016a; Sharghi-Namini et al. 2006b).

En accord avec les données obtenues dans le système nerveux central (SNC), la signalisation Hh semble promouvoir l'intégrité de la barrière hémato-nerveuse en augmentant l'expression de *Cldn5* et *Ocln* et en diminuant l'expression de *Ccl2* et *Il1- β* (Chapouly et al. 2016a; Nathan Moreau et al. 2016).

De plus, il a été démontré que l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-nerveuse associée à la **neuropathie diabétique** résulte d'une **régulation négative de Dhh** (Chapouly et al. 2016a). Dans le contexte de lésion nerveuse par constriction chronique, l'expression de Shh est transitoirement augmentée tandis que l'expression de *Gli1* et *Ptch1* sont toutes deux diminuées (Nathan Moreau et al. 2016; N. Moreau et al. 2017). Enfin, l'administration locale de cyclopaamine mime les altérations vasculaires induites par constriction chronique, y compris l'inflammation nerveuse et l'ouverture de la barrière hémato-nerveuse (Nathan Moreau et al. 2016), confirmant le rôle essentiel de la signalisation Hh dans la promotion de l'intégrité de la barrière hémato-nerveuse et la prévention de l'inflammation nerveuse.

3. En dehors du système nerveux

La régulation de la survie des vaisseaux sanguins, en particulier dans le **cœur**, semble également dépendre de l'activité de signalisation Hh dans les cardiomyocytes et de la surexpression résultante de VEGFA, VEGFB, VEGFC, Angpt1 et Angpt2 (Lavine, Kovacs, et Ornitz 2008).

Dans la **rétilne** des souris diabétiques Akita (modèle de diabète de type 1 par mutation spontanée du gène de l'insuline 2 entraînant un repliement incorrect de la protéine insulique et un diabète insulino-dépendant), la diminution de l'expression de Shh semble associée à une diminution de l'expression d'Angpt1, une augmentation de la perméabilité capillaire et une perte des péricytes (Huang et al. 2015).

En plus de réguler les jonctions intercellulaires endothéliales et la quiescence immunitaire endothéliale, les ligands Hh pourraient également réguler les **propriétés vasoactives** des CE car il a été démontré que l'administration de microparticules porteuses de Shh favorise à la fois l'expression de NOS3 et sa phosphorylation (Agouni et al. 2007; Benameur et al. 2010). En outre, les microparticules porteuses de Shh permettraient de **corriger les syndromes d'ischémie/reperfusion** ou les phénomènes de vasorelaxation induits par l'Angiotensin-II (Marrachelli et al. 2013). De plus, dans un contexte de réaction aiguë du greffon contre l'hôte (GVH), une expression accrue de Hhip à la surface des microparticules dérivées de l'endothélium favorise l'apoptose de la CE, diminue l'expression de NOS3 et augmente l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 (Nie et al. 2016).

D. Implication de la voie de signalisation Hh dans le diabète

La signalisation Hh joue un rôle dans l'organogenèse précoce du pancréas en régulant la taille du tissu pancréatique en formation. L'action synergique d'Ihh et Dhh, exprimés par les cellules pancréatiques au cours de l'embryogenèse, est indispensable au développement normal du pancréas (Kawahira et al. 2005). Chez l'adulte, Ihh et Dhh sont exprimées par les cellules des îlots de Langerhans et la signalisation Hh intervient dans la régulation de la sécrétion d'insuline par les

cellules β pancréatiques notamment via l'activation du facteur de transcription de l'insuline Pdx1 (Pancreatic and duodenal homeobox) (Hebrok et al. 2000; M. K. Thomas et al. 2000; 2001; Kawahira et al. 2003; Nakayama et al. 2008).

Des données récentes montrent l'implication d'une dérégulation de la voie de signalisation Hh dans le diabète de type 2 ; une réduction du niveau d'expression de Pdx1, connu pour être activé par la voie de signalisation Hh, provoque l'apparition d'une hyperglycémie chez la souris adulte (Ahlgren et al. 1998; Dutta et al. 1998; Lau, Kawahira, et Hebrok 2006). D'autre part, lorsque les niveaux des protéines Hh sont perturbés pendant le développement, cela a des répercussions sur les cellules β matures (Lau, Kawahira, et Hebrok 2006).

Dans la **neuropathie diabétique**, l'administration systémique de la protéine Shh influe sur les vaisseaux du nerf mais les données sont contradictoires ; Kusano *et al.* montrent que la thérapie par Shh rétablit la densité vasculaire, augmente le nombre de péricytes des vaisseaux épineuraux et périneuraux et le flux sanguin dans les nerfs diabétiques (Kengo F. Kusano et al. 2005) alors que Calcutt *et al.* n'observent pas de modifications de flux sanguin dans les mêmes conditions (Calcutt et al. 2003).

Ainsi, si l'on considère que la voie Hh est inhibée dans la pathologie diabétique et impliquée dans le défaut de perfusion dans le contexte d'ICC, un agoniste de la voie de signalisation Hh pourrait représenter une cible d'intérêt pour promouvoir la perfusion et la réparation tissulaire post-ischémie chez le sujet diabétique.

OBJECTIFS

A l'heure actuelle l'ICC reste une pathologie incurable et de mauvais pronostic. La dysfonction vasculaire et endothéliale induite par le diabète apparaît comme un déterminant de l'étiologie de l'ICC. La limitation de ces atteintes vasculaires et endothéliales multifactorielles semble ainsi être une stratégie prometteuse pour prévenir l'importante morbi-mortalité de l'ICC.

Dans ce contexte bibliographique et suite aux travaux majeurs de notre équipe sur la compréhension des mécanismes d'action de la voie de signalisation Hh, l'objectif principal de ce travail de thèse était d'explorer les mécanismes physiopathologiques conduisant au défaut de réparation tissulaire et de perfusion en utilisant un nouveau modèle murin associant neuropathie diabétique et ICC avec pour hypothèse que la dysfonction endothéliale pourrait représenter une cible d'intérêt pour promouvoir la perfusion et la réparation tissulaire post-ischémie.

En effet, les connaissances sur la fonction de la voie de signalisation Hh et en particulier Shh, Dhh et Smo en font des candidats sérieux pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement de l'ICC. C'est pourquoi le développement de nouvelles approches, permettant la récupération de la fonction Hh notamment par administration d'agonistes de la voie Hh, apparaît comme une stratégie thérapeutique séduisante.

Ce travail de thèse s'est orienté autour de 4 axes principaux :

- **Mieux comprendre le rôle de la signalisation Hh dans l'angiogenèse et la fonction vasculaire post-ischémique**
 - *Rôle de Shh*
 - *Rôle et régulation de Dhh dans la CE*
 - *Rôle de Dhh dans l'artériogenèse*
- **Mieux comprendre la physiopathologie de l'ICC chez l'Homme dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques**
- **Établir un modèle expérimental chez la souris de diabète et d'ICC se rapprochant du phénotype humain**
- **Tester le potentiel thérapeutique d'un agoniste de la voie Hh améliorant**

l'intégrité de l'endothélium.

L'ensemble de ce travail a été réalisé en associant diverses approches biologiques, histologiques et pharmacologiques : des tests cellulaires *in vitro*, des techniques de biologie moléculaire et de biochimie et des prélèvements tissulaires pour la réalisation de techniques histologiques.

MATERIELS ET METHODES

I. Souris

Les souris ont été traitées conformément aux directives 2010/63/EU du Parlement européen sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et approuvées par le Comité d'éthique en expérimentation animale n° 50. Elles ont été élevées dans une animalerie conventionnelle avec boisson et nourriture standard à volonté et un cycle jour/nuit 12h/12h.

1. Souris modifiées pour la voie Hh

1.1. Souris *Dhh*

1.1.1. $Dhh^{Flox/Flox}$

Les souris déficientes en *Dhh* ($Dhh^{Flox/Flox}$) ont été obtenues en collaboration avec Martial Ruat et Elisabeth Traiffort (CNRS, institut de neurologie Alfred Fessard, Laboratoire de Neurobiologie et de Développement, UPR-3294, transduction du signal et neuropharmacologie développementale, Gif-sur-Yvette, France) sous fond génétique CD1-C57BL/6. L'inactivation du gène *Dhh* a été réalisée par excision des exons 1 et 2 et d'une partie de l'exon 3 qui ont été remplacés par une cassette de sélection (néomycine phosphotransférase). Le segment délété code pour la partie terminale active de la protéine *Dhh*. Ainsi, aucune protéine fonctionnelle ne peut être produite chez les souris homozygotes pour cette délétion (Bitgood, Shen, et McMahon 1996b).

Pour réaliser les expérimentations, des souris $Dhh^{+/-}$ ont été croisées avec d'autres souris $Dhh^{+/-}$ de façon à obtenir dans une même portée des souris $Dhh^{-/-}$, des souris $Dhh^{+/-}$ et leurs contrôles sauvages ($Dhh^{+/+}$).

1.1.2. Souris $Pdgfb-CreER^{T2/+}; Dhh^{Flox/+}$

Les souris $Pdgfb-CreER^{T2/+}$ ont été obtenues en collaboration avec Marcus Fruttiger (National Institute of Medical Research, MRC, London, United Kingdom). Les souris $PDGFB-CreER^{T2/+}; Dhh^{Flox/+}$ sont produites dans le laboratoire par croisement des souris $PDGFB-CreER^{T2/+}$ (Claxton et al. 2008) avec les souris $Dhh^{Flox/Flox}$. Elles sont

issues du croisement des souris PDGFB-Cre^{ERT2/+} où la recombinaise Cre est sous la dépendance d'un promoteur spécifique (Pdgf) avec les souris Dhh^{Flox/Flox} dans lesquelles le locus de Dhh est encadré par deux sites loxP. Ainsi à l'issue de ce croisement et suite à l'injection de tamoxifène (1mg/100µL/souris) pendant 5 jours consécutifs, la recombinaise Cre permet l'ablation du locus Dhh au niveau des sites loxP. La souris PDGFB-CreER^{T2/+} ; Dhh^{Flox/+} permet l'inhibition spécifique de Dhh dans les CE (Figure 25).

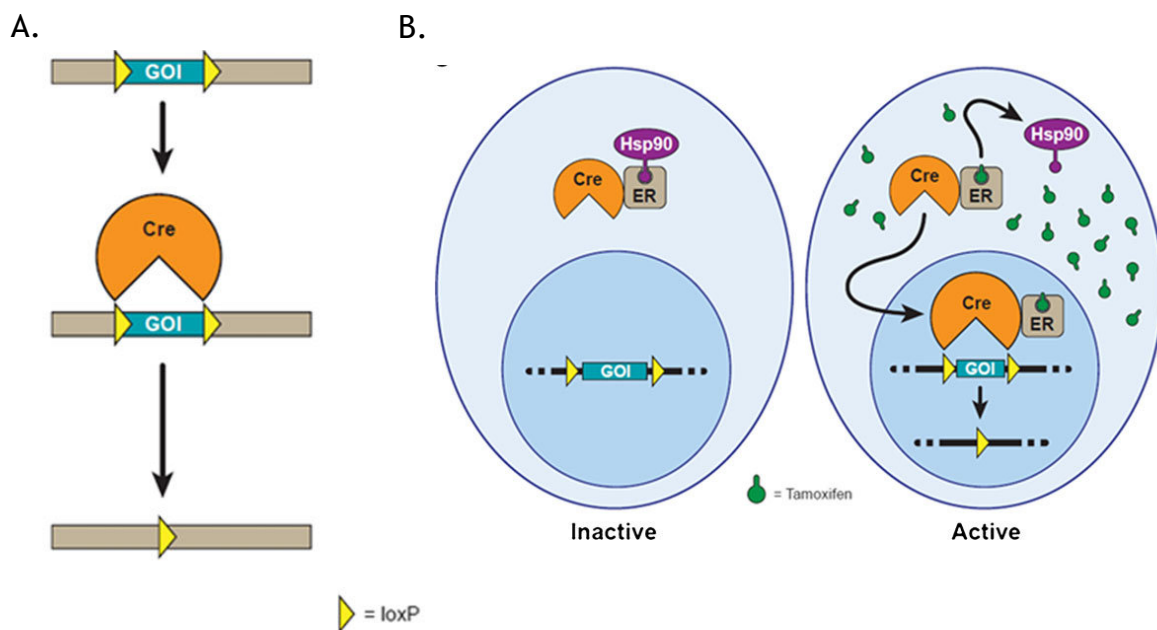


Figure 25. Excision médiée par Cre et le mécanisme de CreER inducible - issu de (Cox et al. 2012)

A. Suppression médiée par Cre d'un gène d'intérêt (GOI) flanqué de sites loxP.

B. Excision induite par le CreER: En l'absence de tamoxifène, CreER est séquestré dans le cytoplasme par Hsp90. En présence de tamoxifène, CreER est transféré vers le noyau où il reconnaît les séquences loxP et clive l'ADN

1.1.3. Souris Cdh5-CreER^{T2/+} ; Dhh^{Flox/+}

La souris Cdh5-CreER^{T2/+} ; Dhh^{Flox/+} permet également l'inhibition spécifique de Dhh dans les CE (Figure 25). L'expression de Cre chez ces souris transgéniques peut être observée dans l'embryon et dans l'endothélium adulte des vaisseaux en développement et au repos, ainsi que dans un sous-ensemble de cellules hématopoïétiques. Ce second type de souris transgénique endothéliale a été utilisé car la comparaison de l'efficacité de la recombinaison et de la spécificité envers la

lignée sanguine a révélé des différences majeures entre les souris transgéniques endothéliales $Pdgfb-CreER^{T2}$ et $Cdh5-CreER^{T2}$ (Kilani et al. 2019). En effet, la recombinaison médiée par Cre se produit uniquement dans un petit nombre de cellules souches hématopoïétiques adultes chez les souris transgéniques $Pdgfb-CreER^{T2}$. Ainsi, lorsqu'une forte expression d'un transgène est requise dans les CE du sang adulte sans aucune expression concomitante dans les cellules sanguines, les souris $Cdh5-CreER^{T2}$ peuvent être utilisées.

Les souris $Cdh5-CreER^{T2/+}$ ont été obtenues en collaboration avec Ralph H. Adams (Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Department of Tissue Morphogenesis, and University of Munster, Faculty of Medicine, Munster, Germany). Les souris $Cdh5-CreER^{T2/+}$; $Dhh^{Flox/+}$ sont produites dans le laboratoire par croisement des souris $Cdh5-CreER^{T2/+}$ (Azzoni et al. 2014) avec les souris $Dhh^{Flox/Flox}$ selon un processus similaire à celui décrit chapitre 1.1.2.

1.2. Souris *Shh*

Les souris déficientes en *Shh* ($Shh^{Flox/Flox}$) ont été obtenues auprès du laboratoire Jackson. L'inactivation du gène *Shh* a été réalisée en flanquant l'exon2, qui code pour environ la moitié du signal *Shh* N-terminal actif, avec des sites loxP. Ainsi, aucune protéine fonctionnelle ne peut être produite chez les souris homozygotes pour cette délétion (Dassule et al. 2000).

Pour réaliser les expérimentations, des souris $Shh^{+/-}$ ont été croisées avec d'autres souris $Shh^{+/-}$ de façon à obtenir dans une même portée des souris $Shh^{-/-}$, des souris $Shh^{+/-}$ et leurs contrôles sauvages ($Shh^{+/+}$).

1.3. Souris *Smo*

1.3.1. Souris $Pdgf-CreER^{T2/+}$; $Smo^{Flox/+}$

Les souris $Pdgf-CreER^{T2/+}$ ont été obtenues en collaboration avec Marcus Fruttiger (National Institute of Medical Research, MRC, London, United Kingdom). Les souris $Smo^{Flox/+}$ ont été obtenue auprès du laboratoire Jackson. Les souris $Pdgf-CreER^{T2/+}$;

$Smo^{Flox/+}$ sont produites dans le laboratoire par croisement des souris $Pdgf-CreER^{T2/+}$ (Claxton et al. 2008) avec les souris $Smo^{Flox/Flox}$ (Long et al. 2001) selon un processus similaire à celui décrit chapitre 1.1.2. La souris $Pdgf-CreER^{T2/+}; Smo^{Flox/+}$ permet l'inhibition spécifique de la voie de signalisation Hh dans les CE (**Figure 26**).

1.3.2. Souris $Cdh5-CreER^{T2/+}; Smo^{Flox/+}$

Selon les raisons évoquées au chapitre 1.1.3, des souris $Cdh5-CreER^{T2/+}; Smo^{Flox/+}$, qui permettent également l'inhibition spécifique de Smo dans les CE, ont été utilisées (**Figure 25**). Les souris $Cdh5-CreER^{T2/+}$ ont été obtenues en collaboration avec Ralph H. Adams (Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Department of Tissue Morphogenesis, and University of Munster, Faculty of Medicine, Munster, Germany). Les souris $Cdh5-CreER^{T2/+}; Smo^{Flox/+}$ sont produites dans le laboratoire par croisement des souris $Cdh5-CreER^{T2/+}$ (Azzoni et al. 2014) avec les souris $Smo^{Flox/Flox}$ (Long et al. 2001) selon un processus similaire à celui décrit chapitre 1.1.2.

1.3.3. Souris $HSA-CreER^{T2/+}; Smo^{Flox/+}$

Les souris $HSA-CreER^{T2}$ ont été obtenues auprès du laboratoire Jackson. Dans ces souris transgéniques, le gène de la recombinaise Cre est entraîné par le promoteur de l'actine alpha-squelettique humaine (HSA), la modification médiée par $CreER^{T2}$ des gènes cibles flanqués de LoxP est donc spécifique du muscle squelettique (Schuler et al. 2005). Les souris $HSA-CreER^{T2}; Smo^{Flox/+}$ sont produites dans le laboratoire par croisement des souris $HSA-CreER^{T2}$ avec les souris $Smo^{Flox/Flox}$ (Long et al. 2001) selon un processus similaire à celui décrit chapitre 1.1.2. La souris $HSA-CreER^{T2}; Smo^{Flox/+}$ permet l'inhibition spécifique de la voie de signalisation Hh dans le muscle squelettique (**Figure 25**).

1.3.4. Souris $LysM-Cre; Smo^{Flox/+}$

Les souris $LysM-Cre$ ont été obtenues auprès du laboratoire Jackson. L'allèle knock-in/knockout $LysMcre$ possède une recombinaise Cre nucléaire insérée dans le premier triplet « ATG » codant du gène du lysozyme 2 ($Lyz2$); abolissant la fonction du gène endogène $Lyz2$ et plaçant l'expression NLS-Cre (nuclear localization sequence) sous

le contrôle des éléments endogènes promoteurs/activateurs *Lyz2*. Ces souris *LysMcre* peuvent être utiles pour les études Cre-lox de la lignée cellulaire myéloïde (monocytes, macrophages matures et granulocytes) et la réponse immunitaire innée. Les souris *LysM-Cre ; Smo^{Flox/+}* sont produites dans le laboratoire par croisement des souris *LysM-Cre* (Clausen et al. 1999) avec les souris *Smo^{Flox/Flox}* selon un processus similaire à celui décrit chapitre 1.1.2. La souris *LysM-Cre ; Smo^{Flox/+}* permet l'inhibition spécifique de la voie de signalisation Hh dans les macrophages notamment (**Figure 25**).

2. Souris *Rosa26^{mT/mG}*

2.1. *Rosa26-CreER^{T2} ; Rosa26^{mT/mG}*

Les souris *Rosa26^{mT/mG}* ont été obtenues auprès du laboratoire Jackson (Muzumdar et al. 2007). *ROSA^{mT/mG}* est un allèle rapporteur Cre fluorescent bicolore ciblant la membrane cellulaire. Avant la recombinaison Cre, l'expression de fluorescence tdTomato (mT, rouge) localisée sur la membrane cellulaire est répandue dans l'ensemble des cellules/tissus. Les cellules exprimant la recombinase Cre (et les futures lignées cellulaires dérivées de ces cellules) ont une expression de fluorescence EGFP (mG, verte) localisée sur la membrane cellulaire remplaçant la fluorescence rouge.

Les souris *Rosa26-CreER^{T2/+}* ont été obtenues en collaboration avec l'Institut Clinique de la Souris (Strasbourg, France) (Hameyer et al. 2007). Le locus *Rosa26* est exprimé de manière ubiquitaire. Les souris *Rosa26-CreER^{T2} ; Rosa26^{mT/mG}* sont produites dans le laboratoire par croisement des souris *Rosa26-CreER^{T2}* avec les *Rosa26^{mT/mG}* selon un processus similaire à celui décrit chapitre 1.1.2. La souris *Rosa26-CreER^{T2} ; Rosa26^{mT/mG}* permet l'obtention d'un signal vert de manière ubiquitaire après induction de la Cre par le tamoxifène (**Figure 26**).

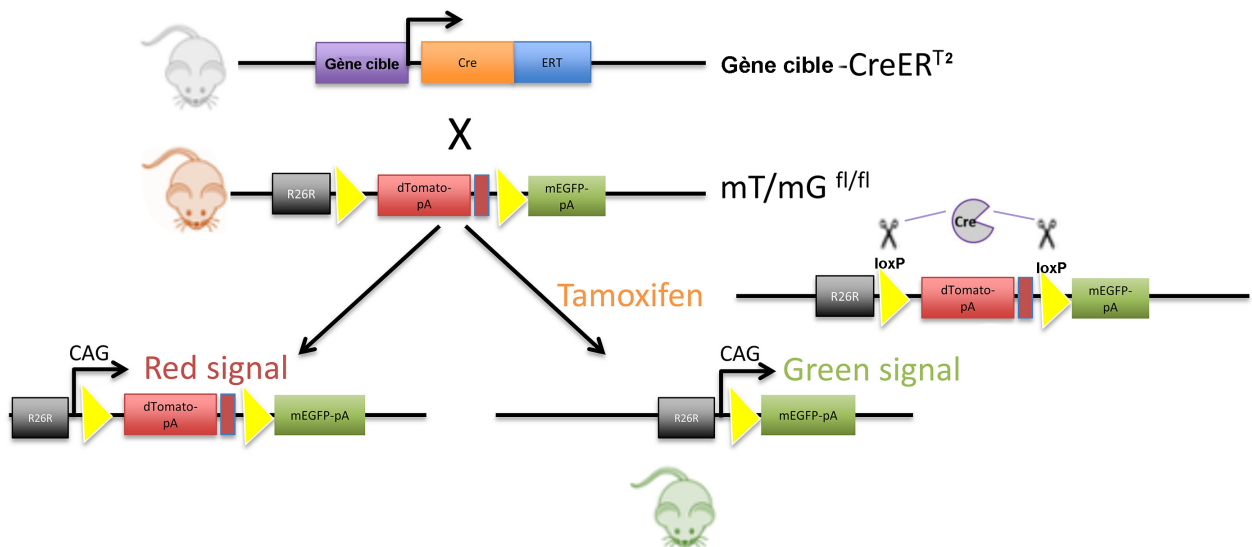


Figure 26. Excision médiée par Cre et le mécanisme de CreER inducible dans des souris $Rosa^{mT/mG}$ présentant un allèle rapporteur Cre fluorescent bicolor

La souris $Rosa^{mT/mG}$ présente un allèle rapporteur Cre fluorescent bicolor (mT/mG), avec une protéine fluorescente rouge tomato (mT) présente sur la membrane dans toutes les cellules et tissus, tandis que la protéine fluorescente verte (mG) n'est pas exprimée. En présence de Cre, mT est excisé et les cellules expriment mG, qui remplace l'expression de mT - inspiré de (Sheller-Miller et al. 2019)

2.2. Souris $LysM-Cre$; $Rosa^{mT/mG}$

Les souris $LysM-Cre$ et les souris $Rosa^{mT/mG}$ ont été obtenues auprès du laboratoire Jackson. Les souris $LysM-Cre$; $Rosa^{mT/mG}$ sont produites dans le laboratoire par croisement des souris $LysM-Cre$ avec les $Rosa^{mT/mG}$ selon un processus similaire à celui décrit chapitre 1.1.2. La souris $LysM-Cre$; $Rosa^{mT/mG}$ permet l'obtention d'un signal vert essentiellement dans les macrophages après induction de la Cre par le tamoxifène (Figure 26).

2.3. Souris $Pdgfb-CreERT^2$; $Rosa^{mT/mG}$

Les souris $Pdgfb-CreERT^{2/+}$ ont été obtenues en collaboration avec Marcus Fruttiger (National Institute of Medical Research, MRC, London, United Kingdom) tandis que les souris $Rosa^{mT/mG}$ ont été obtenues auprès du laboratoire Jackson. Les souris $Pdgfb-CreERT^2$; $Rosa^{mT/mG}$ sont produites dans le laboratoire par croisement des souris $Pdgfb-CreERT^2$ avec les $Rosa^{mT/mG}$ selon un processus similaire à celui décrit chapitre 1.1.2. La souris $Pdgfb-CreERT^2$; $Rosa^{mT/mG}$ permet l'obtention d'un signal vert dans les CE après induction de la Cre par le tamoxifène (Figure 26).

2.4. Souris *Cdh5-CreER^{T2}* ; *Rosa26^{mT/mG}*

Selon les raisons évoquées au chapitre 1.1.3, des souris *Cdh5-CreER^{T2/+}* qui permettent également l'inhibition spécifique d'un gène cible dans les CE, ont été utilisées. Les souris *Cdh5-CreER^{T2/+}* ont été obtenues en collaboration avec Ralph H. Adams (Max Planck Institute for Molecular Biomedicine, Department of Tissue Morphogenesis, and University of Munster, Faculty of Medicine, Munster, Germany) tandis que les souris *Rosa26^{mT/mG}* ont été obtenues auprès du laboratoire Jackson. Les souris *Cdh5-CreER^{T2}* ; *Rosa26^{mT/mG}* sont produites dans le laboratoire par croisement des souris *Cdh5-CreER^{T2}* avec les *Rosa26^{mT/mG}* selon un processus similaire à celui décrit chapitre 1.1.2. La souris *Cdh5-CreER^{T2}* ; *Rosa26^{mT/mG}* permet l'obtention d'un signal vert dans les CE après induction de la Cre par le tamoxifène (Figure 26).

3. Souris diabétiques

3.1. Souris traitées par *Streptozotocine*

Les souris C57BL/6 étaient obtenues auprès du laboratoire de Charles Rivers et amplifiées à l'animalerie. Les souris du groupe diabétique étaient traitées à 6 semaines d'âge par injections intra-péritonéales (IP) quotidiennes de Streptozotocine (STZ) à la dose de 55 mg/kg/j pendant une durée de 5 jours après un jeûne de 4h (O'Brien, Sakowski, et Feldman 2014).

Les souris du groupe contrôle étaient traitées avec le tampon de citrate de sodium seul selon le même protocole. Un glucomètre permettait de mesurer la glycémie à partir d'un prélèvement veineux réalisé à l'extrémité de la queue à la 4^{ème} semaine post-injection puis tous les 15 jours jusqu'au sacrifice. Dans le même temps, une mesure du poids était réalisée.

La STZ présente une cytotoxicité spécifique des cellules bêta des îlots de Langerhans pancréatiques. Ce schéma d'administration permet d'obtenir le développement d'un modèle de diabète de type 1 avec une insulino-déficience plus qu'une insulino-

résistance, une hyperglycémie chronique et une augmentation des lésions d'athérosclérose en comparaison aux témoins traités par le tampon citrate (x17 avec l'apparition de stries lipidiques et de cellules spumeuses) (Kunjathoor, Wilson, et LeBoeuf 1996). Il permet d'obtenir une stabilité relative du poids des souris et les complications du diabète, dont la neuropathie, apparaissent après 12 semaines d'hyperglycémie constante (>2.5g/L). Il est largement employé dans l'analyse de la dysfonction endothéliale en raison de l'absence d'action directe connue de la STZ à ce niveau.

3.2. Souris *Lepr^{db/db}* (*db/db*)

Les souris diabétiques *Lepr^{db/db}* dérivent à l'origine d'une mutation spontanée autosomique récessive dans l'allèle *Lepr^{db}*, localisé sur le chromosome 4, découverte par Coleman et Hummel en 1967 (Hummel, Coleman, et Lane 1972). Cette mutation correspond au remplacement d'une guanidine par une thymidine dans cet allèle, ce qui crée un site d'épissage anormal et conduit à l'insertion de 106 nucléotides dans le transcrit. Cette insertion provoque la perte de fonction du signal de transduction normalement induit par le récepteur à la leptine. Des souris *db/db*, sous le fond génétique C57BL/KsJ, ont été obtenues auprès du laboratoire Charles River.

Les animaux mutants sont spontanément hyperphagiques et hyper-sécrètent de l'insuline, ils deviennent obèses, hyperglycémiques, hyper-insulinémiques et insulino-résistants dans les premiers mois de leur vie puis, plus tard, développent une hypo-insulinémie associée à une hyperglycémie avec un pic entre 3 et 4 mois. Au-delà de cet âge, les animaux développent une cétose et perdent progressivement du poids ; les souris *db/db* vivent rarement au-delà de 8-10 mois.

Des souris sont croisées entre-elles de façon à obtenir dans une même portée des souris *db/db* et leurs contrôles *db/-*. Les souris sont phénotypées par leur poids et leurs glycémies. Les souris hétérozygotes sont non obèses, non diabétiques tandis que les souris *db/db* sont obèses et diabétiques.

Des souris hétérozygotes et *db/db*, avec un âge compris entre 12 et 20 semaines, ont été utilisées pour les expérimentations.

II. Chirurgie

1. Ischémie de patte postérieure

1.1. *Ligature exérèse*

L'analgésie était assurée par l'injection intra-péritonéale (IP) pré-opératoire de 150µg/kg de buprénorphine. La procédure était réalisée sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane (induction à 4% d'isoflurane et entretien à 2%). Les souris étaient positionnées en décubitus dorsal, après désinfection bétadinée, une incision longitudinale d'environ 1cm était réalisée au pli inguinal gauche. Une première ligature était réalisée au niveau de l'artère fémorale commune avec du prolène 7/0 et une seconde ligature était réalisée au niveau de l'A. poplitée en regard du genou (**Figure 27A**). L'artère était excisée entre les deux ligatures. L'incision était refermée par un surjet de monocryl 6/0 (dans les protocoles suivants cette opération est définie comme J0). Lors de cette exérèse artérielle, le reste du pédicule vasculo-nerveux (veine et nerf fémoraux) est en général emporté. Cette chirurgie diminue de façon drastique la perfusion du muscle et des tissus en aval de la ligature, induit une **ischémie aigue** et la dégénérescence du tissu musculaire.

1.2. *Ligature séquentielle*

L'analgésie était assurée par l'injection intra-péritonéale (IP) pré-opératoire de 150 µg/kg de buprénorphine. La procédure était réalisée sous anesthésie générale par inhalation d'isoflurane (induction à 4% d'isoflurane et entretien à 2%). Les souris étaient positionnées en décubitus dorsal, après désinfection bétadinée, une incision longitudinale d'environ 1cm était réalisée au pli inguinal gauche et une première ligature était réalisée au niveau de l'artère fémorale commune gauche et de 3 collatérales systématisées au prolène 7/0, après avoir bien libéré l'artère des veines et du nerf adjacents. Cette première intervention était notée comme J0. Puis à J4 une seconde ligature était réalisée par voie rétropéritonéale au niveau de l'artère iliaque commune gauche (**Figure 27B**). Chaque incision était refermée par un surjet de monocryl 6/0.

2. Dénervation sciatique

Selon les mêmes protocoles pré et post-opératoires, les souris étaient positionnées en décubitus ventral, une incision était réalisée en regard de l'échancrure ischiatique gauche et le nerf sciatique était réséqué sur une longueur d'1cm (**Figure 27C**). Cette chirurgie provoque une paralysie sensitivo-motrice par démyélinisation massive d'aval.

Ce modèle expérimental nous a permis de démontrer que la thérapie SAG n'est pas dépendante du système nerveux périphérique en utilisant un bras contrôle et un bras dénervation sciatique subissant tous deux une ligature séquentielle. Ces données sont détaillées dans le chapitre résultats.

3. Prélèvements du muscle tibial antérieur

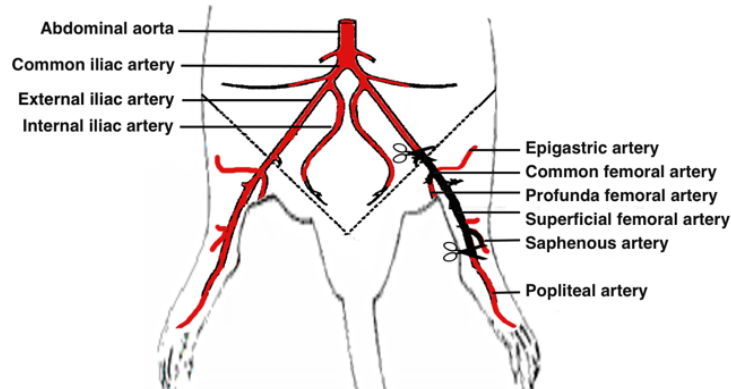
Les souris étaient euthanasiées à J14 et J28 par dislocation cervicale. Les muscles tibial antérieur (MTA) gauche (ischémié) et droit (contrôle) étaient prélevés. La moitié supérieure de chaque muscle était congelée dans l'azote liquide et conservée à -80°C pour réaliser l'extraction des acides ribonucléiques messagers (ARNm). La moitié inférieure était fixée dans du méthanol avant d'être incluse en paraffine pour analyse immuno-histologique.

4. Angiogenèse de cornée

Des « micropellets » étaient réalisés sur un treillis de nylon de 4mm × 4mm (approximativement 120 mailles) en répartissant uniformément la substance à tester à l'aide d'une spatule afin d'obtenir des « micropellets » reproductibles de taille homogène (300µm) (R. Cao et al. 2011). Ceux-ci contenaient soit la thérapie SAG à tester (10ng/µL) et le polymère, soit le milieu de dilution de la thérapie seul et le polymère (contrôle négatif), soit du VEGF (100ng/µL) et le polymère (contrôle positif). Le polymère était composé d'un mélange de sucralfate et d'hydron dans 99.5% (vol/vol) d'éthanol. Les « micropellets » étaient laissés à sécher pendant 10min à température ambiante puis libérés en déchirant soigneusement chaque corde de nylon avec une paire de pinces. Les souris étaient anesthésiées par injection

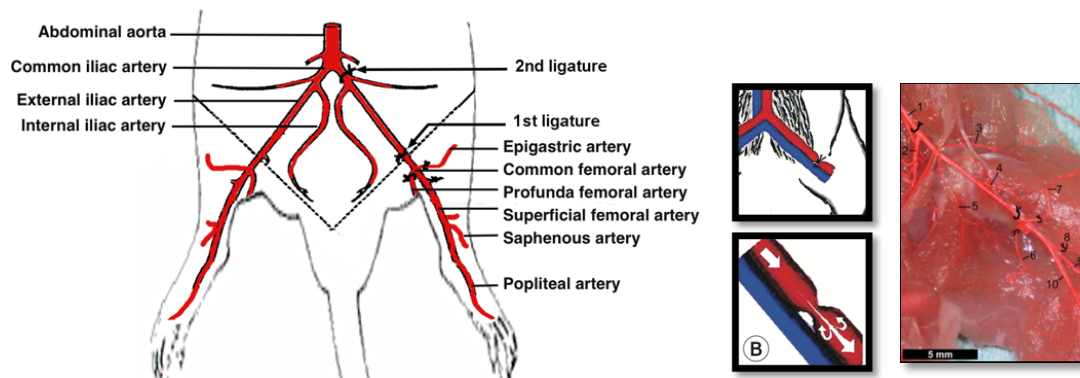
IP d'un mélange anesthésique de kétamine (50 μ L), xylazine (10 μ L) et sérum physiologique (40 μ L) puis une micropoche était réalisée dans l'œil afin d'y placer le « micropellet » (**Figure 27D**). Les souris étaient sacrifiées à J10 pour le prélèvement de cornées qui étaient montées entières à plat entre lame et lamelle après réalisation d'encoches.

A. Modèle d'ischémie par ligature-exérèse



La zone de ligature exérèse est représentée en noir entre les deux ciseaux

B. Modèle d'ischémie par ligature séquentielle

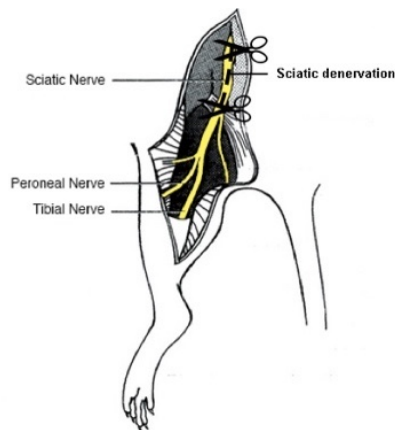


1st ligature : Common femoral artery and 3 collaterals on J0

2nd ligature : Common iliac artery by retroperitoneal approach on J4

(1) common iliac artery, (2) internal iliac artery, (3) iliocofemoral artery, (4) lateral circumflex femoral artery, (5) deep femoral artery, (6) proximal caudal femoral artery, (7) superficial caudal epigastric artery, (8) medial proximal genicular artery, (9) popliteal artery, (10) saphenous artery

C. Modèle de dénervation sciatique



D. Modèle d'angiogenèse cornéenne

La zone de dénervation sciatique est représentée en noir entre les deux ciseaux

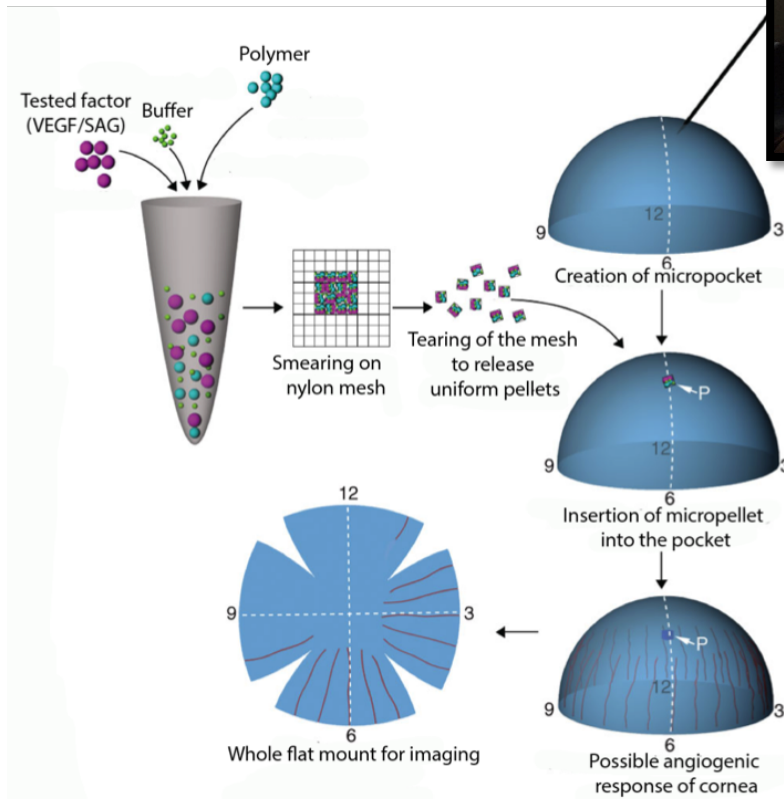


Figure 27. Modèles chirurgicaux

III. Tests comportementaux et étude de perfusion/vasomotricité

1. Evaluation de la neuropathie

Tous les tests étaient réalisés dans une pièce maintenue à température constante (18°C).

1.1. Test d'allodynie mécanique

Le test d'allodynie mécanique était réalisé avec des filaments de Von Frey (Bioseb) calibrés de 0.16 à 2 grammes (g). Pour chaque évaluation, la souris était placée sur une plate-forme de treillis et recouverte d'un récipient en verre transparent. Après une période d'acclimatation de 20 minutes, 7 mesures étaient prises sur la patte postérieure gauche pour chaque animal. L'observation d'une réponse négative était suivie par l'application d'un filament plus épais. Une réponse positive était notée lorsque la souris mobilisait la patte ou la léchait dans les cinq secondes suivant l'application du filament. Une période de latence de 5 minutes était respectée entre chaque application. Le seuil douloureux était admis lorsque le nombre de réponses dépassait 50% (4 reflexes de retrait sur 7 applications).

Numéro	1	2	3	4	5	6	7	8
Force (g)	0,07	0,16	0,40	0,60	1,00	1,40	2,00	4,00

Tableau 4. Forces des filaments de Von Frey (<http://www.bioseb.com>)

1.2. Test analgésique plantaire

Le test analgésique plantaire était réalisé à l'aide du Plantar test (Bioseb) composé d'une cage transparente en acrylique avec un sol de verre et d'une source de chaleur infra-rouge mobile. L'intensité de la source de chaleur était ajustée à l'étape 90 avec un seuil de 15sec pour éviter le risque de brûlure. Après une période d'acclimatation de 20min, le temps de réaction de l'animal était mesuré par un contrôleur en pas de 0.1sec après positionnement de la source de chaleur au niveau

de la patte arrière gauche. Le test était répété 3 fois par souris en respectant une période de latence de 5min entre chaque mesure.

1.3. *Electromyogramme (EMG)*

Après anesthésie par isoflurane, des électrodes d'enregistrement et de stimulation étaient placées en sous cutané (SC), au niveau de la patte postérieure ou de la queue pour mesurer les potentiels d'action et ainsi évaluer la présence d'une éventuelle neuropathie motrice ou sensitive. L'évaluation des potentiels moteurs de la patte était réalisée en stimulant le nerf par une décharge de 3V successivement au niveau de l'échancrure ischiatique et de la cheville. La latence entre l'apparition des deux potentiels d'action correspond au temps de conduction et la vitesse de conduction nerveuse était évaluée en calculant le rapport de la distance entre les points de stimulation et le temps de conduction. Dans la queue le même principe était utilisé, avec une stimulation de 5V. L'évaluation des potentiels sensitifs de la patte était réalisée en stimulant le nerf par une décharge de 10V au niveau de la voûte plantaire de la patte postérieure et en enregistrant la réponse au niveau de la cheville. Les signaux étaient récupérés à l'aide d'un amplificateur de signal (AD instruments) et traités par le logiciel Labchart (AD instruments) (Schulz et al. 2014).

2. Laser doppler perfusion imaging

Les souris étaient anesthésiées par un mélange anesthésique de kétamine (50 μ L), xylazine (10 μ L) et sérum physiologique (40 μ L) injecté en IP puis la perfusion tissulaire superficielle des pattes postérieures était visualisée par laser doppler perfusion imaging (LDPI) (Moor instruments) et analysée à l'aide du logiciel dédié (Moor LDI V51) permettant d'obtenir un ratio de perfusion patte ischémisée/patte contrôle.

3. Test de vasomotricité

L'artère fémorale était prélevée, isolée et sectionnée en anneaux de 2mm de longueur, cathétérisés chacun par deux fils de tungstène afin de permettre leur montage sur un myographe (Myograph DMT A/S) dans le cadre d'une collaboration

avec l'unité INSERM 1045. Les tissus étaient alors immergés dans une solution de Krebs gazée avec un mélange de 95% d'O₂ et 5% de dioxyde de carbone (CO₂) et maintenue à 37°C. Une tension de 100mmHg (13.3kPa), dite « Effective Resting Transmural Pressure » (ERTP), était alors appliquée aux segments artériels. Après une période d'équilibration, les artères étaient exposées à une solution de chlorure de potassium (KCl) à la concentration de 80mM afin de mesurer la capacité maximale contractile des segments testés. Les anneaux aortiques étaient ensuite lavés par 4 bains successifs de 10min de solution de Krebs, puis les artères étaient soumises à un agent vasoconstricteur, la phényléphrine (agoniste des récepteurs α1-adrénergiques) à une concentration suffisante pour obtenir une tension équivalente à 80% de la tension maximale obtenue avec le KCl. La vasomotricité des segments artériels était alors évaluée par ajout de concentrations croissantes, allant de 10⁻⁹ à 10⁻⁴M, d'un agent vasodilatateur, l'acétylcholine (ACh). Une courbe concentration/relaxation était ainsi établie.

IV. Tissus humains

Les tissus musculaires humains ont été récupérés dans une bibliothèque de tissus collectés pour un programme hospitalier de recherche clinique intitulé "Ischémie critique des membres inférieurs: caractérisation métabolique, morphologique et immunohistochimique des tissus impliqués" (N ° RCB: 2009-A00889-48, PHRC N ° 09 038 08). Dans cette étude observationnelle multicentrique préliminaire, 30 membres inférieurs de patients consécutifs souffrant d'ICC ont été analysés. Tous les patients ont subi une procédure de revascularisation chirurgicale ouverte ou une amputation majeure entre août 2010 et avril 2012 dans l'un des trois principaux centres vasculaires du sud-ouest de la France (Limoges, Bordeaux, Toulouse). La présence d'une ICC était évaluée cliniquement (classe de Rutherford 4 à 6) et/ou objectivée par la présence d'une pression artérielle systolique de cheville ou d'orteil <50 ou 30mmHg respectivement. En l'absence de contre-indication ou d'impossibilité technique, trois niveaux de biopsies ont été réalisés pour chaque patient, de la zone la plus ischémique à la zone en marge de l'amputation. Les tissus ont été immédiatement fixés dans du méthanol et envoyés à l'Inserm U1034 où les études de morphologie et d'immunohistochimie ont été effectuées. Un total de 25 échantillons

de tissus ont été obtenus de patients répondant aux critères d'ICC, avec une classe de Rutherford de 5 ou 6. Des échantillons musculaires ont également été récupérés de 10 patients témoins (CTRL), exempts de tout antécédent ou signe clinique de maladie artérielle périphérique, bénéficiant d'un « stripping » (ou éveinage) saphène au cours de la même période d'étude. Ces échantillons ont été prélevés sur la partie moyenne du mollet dans le service de chirurgie vasculaire du CHU de Bordeaux et soumis au même protocole de fixation et d'inclusion. Le comité d'examen institutionnel de chaque centre a approuvé la méthodologie et la conception de l'étude, et tous les patients ont donné leur consentement, après avoir reçu des informations écrites.

V. Autres techniques

Les techniques de biologie cellulaire, d'analyse d'expression de gène et d'immunohistologie sont décrites avec précision dans les chapitres Matériels et Méthodes des articles inclus dans la partie Résultats. La méthode de quantification en immuno-marquage est détaillée en **Annexe 1**.

RESULTATS ET PERSPECTIVES

I. Rôle de la signalisation Hh dans l'angiogenèse et la fonction vasculaire post-ischémique

A. Rôle de Shh dans l'angiogenèse post-ischémique

1. *Rationnel de l'étude*

La signalisation Hh est réactivée dans les tissus ischémiques, en particulier dans le muscle squelettique de patte, et participe à l'angiogenèse post-ischémie. Cependant, on ne sait toujours pas quel(s) ligand(s) Hh régule l'angiogenèse post-ischémie.

Shh (R. Pola et al. 2003; M.-A. Renault, Chapouly, et al. 2013), Gli1 (Palladino et al. 2011; M. A. Renault, Robbesyn, et al. 2013), Gli2 et Gli3 (M. A. Renault et al. 2009) sont fortement augmentées dans le muscle ischémique par rapport au muscle controlatéral non ischémique. Ainsi, dans le muscle squelettique ischémique, le taux de Shh est multiplié par 80 par rapport au taux basal, mais son rôle spécifique dans l'angiogenèse post-ischémie n'a pas encore été entièrement étudié. Il est suggéré que la réactivation de la signalisation Hh favorise la revascularisation des tissus ischémiques, car l'administration systémique d'anticorps bloquant anti-Hh (5E1) réduirait la densité capillaire et la reperfusion du membre ischémique (R. Pola et al. 2003) en inhibant la surexpression de VEGF. De plus, la suractivation de la signalisation Hh par l'administration de microparticules portant Shh (Benameur et al. 2010) ou de SAG (Qin et al. 2016) augmente la densité capillaire dans le muscle ischémique.

Il est suggéré que la réactivation de la signalisation Hh est altérée dans le contexte du vieillissement, car l'expression de Gli1 dans le muscle ischémique est diminuée chez les souris âgées (Palladino et al. 2011; M. A. Renault, Robbesyn, et al. 2013). De plus, l'expression de Dhh et Smo est diminuée chez les souris âgées (M. A. Renault, Robbesyn, et al. 2013) contrairement à Shh. En raison des propriétés pro-angiogéniques des ligands Hh, l'altération de l'activation de la signalisation Hh chez les souris âgées pourrait être un facteur compromettant l'angiogenèse post-ischémique. Ce paradigme est soutenu par le fait que l'administration des ligands Hh

systémique (R. Pola et al. 2001) ou locale (Palladino et al. 2011; M. A. Renault, Robbesyn, et al. 2013) augmente la densité capillaire, favorise la perfusion musculaire post-ischémie et le sauvetage de membre chez des souris âgées.

Notre premier objectif était d'étudier le rôle de Shh endogène dans l'angiogenèse post-ischémie.

2. Résultats

Pour étudier le rôle de Shh endogène dans l'angiogenèse post-ischémie, nous avons utilisé des souris inductibles **Shh KO**. Le KO efficace de Shh a été vérifié en mesurant l'expression de l'ARNm de Shh dans le muscle squelettique ischémique et non ischémique de souris Rosa26-Cre^{ERT2}; Shh^{Flox/Flox}. L'expression de l'ARNm Shh était réduite d'environ 85% tandis que l'expression des ARNm Dhh et Ihh n'était pas modulée. Les souris Rosa26-Cre^{ERT2}; Shh^{Flox/Flox} (Shh iKO) et les souris Shh^{Flox/Flox} témoins ont ensuite subi une chirurgie de ligature-exérèse fémorale. La revascularisation de la patte ischémique était évaluée 5 et 10 jours après la chirurgie, en mesurant la densité capillaire dans le muscle ischémique tibial antérieur et la perfusion du pied.

De manière inattendue, nous avons découvert que **la densité capillaire était significativement augmentée** lors de la régénération musculaire des souris déficientes en Shh 5 jours après l'induction de l'ischémie de patte postérieure (Caradu, Guy, et al. 2018). Cependant, 10 jours après la chirurgie, la densité capillaire était équivalente dans les deux groupes. De même, la perfusion du pied a augmenté chez les souris Shh déficientes par rapport aux souris témoins 5 jours après la chirurgie mais était équivalente dans les deux groupes au 10^{ème} jour. Ainsi, **ces résultats démontrent que la carence en Shh conduit à une angiogenèse transitoire dans le muscle squelettique ischémique, cependant, cette réponse semble inefficace et ne conduit pas à une amélioration durable de la perfusion distale.**

Comme ce résultat était inattendu face aux données de la littérature, nous avons administré Shh ectopiquement par thérapie génique, à la fois chez les souris

déficientes en Shh et chez leurs contrôles, pour confirmer que nous pouvions reproduire les résultats de la littérature. La thérapie génique Shh a permis d'augmenter la densité capillaire chez les souris contrôles à la fois au jour 5 et au jour 10, confirmant que, lorsqu'il est administré de manière ectopique, Shh est pro-angiogénique. Cependant, la thérapie génique Shh n'a eu aucun effet chez les souris déficientes en Shh chez lesquelles la densité capillaire était déjà élevée. Par conséquent, nos données démontrent que les effets de Shh endogène et exogène diffèrent, et que contrairement à Dhh, **la protéine Shh endogène a des propriétés anti-angiogéniques plutôt que pro-angiogéniques.**

En outre, il a été démontré que Shh favorise la myogenèse chez les adultes dans les modèles de lésions musculaires induites par cardiotoxine et par écrasement mécanique (Straface et al. 2009) (Piccioni et al. 2013). Nous avons évalué la myogenèse chez des souris déficientes en Shh et leurs contrôles. Dix jours après la chirurgie de ligature-exérèse, la surface du muscle ischémique recolonisé par de nouvelles fibres musculaires (surface desmin + avec noyaux centraux) était la même chez les souris Shh iKO et chez les souris contrôles. De plus, le profil d'expression de MyoD, un marqueur précoce de la myogenèse, et Myh1, un marqueur tardif de la myogenèse, n'étaient pas différents en l'absence de Shh, démontrant que le **Shh endogène n'est pas nécessaire pour la myogenèse post-ischémie** (Caradu, Guy, et al. 2018).

Comme Shh est fortement surexprimé 2 jours après la chirurgie de ligature-exérèse et que son expression revient à son taux basal au jour 5, nous avons testé le rôle de Shh dans les événements précoces post-ischémie, tels que l'inflammation. Les souris Shh iKO et leurs contrôles ont subi une chirurgie de ligature-exérèse, et l'infiltration des neutrophiles a été évaluée 2 jours plus tard. L'infiltration des neutrophiles GR1+ n'était pas différente en présence ou en l'absence de Shh. Ce résultat était confirmé par l'analyse FACS des cellules Ly6C+. En revanche, lorsque nous avons évalué l'infiltration des macrophages, qui culmine généralement 5 jours après l'induction de l'ischémie, nous avons observé une **augmentation significative de l'infiltration des macrophages CD68+ dans le muscle ischémique des souris déficientes en Shh.** De même, le nombre de cellules doublement positives CD11b, CD11c dans le muscle

ischémique était significativement augmenté chez les souris déficientes en Shh. Ainsi, ces données démontrent que **Shh présente une action anti-inflammatoire dans les tissus ischémiques en limitant le recrutement des macrophages.**

Nos données indiquent que cela était dû à une augmentation de l'expression des chimiokines par les myoblastes dans un contexte d'altération de la signalisation Hh (Caradu, Guy, et al. 2018).

Pour mieux comprendre comment Shh limite l'infiltration des macrophages dans le muscle ischémique, nous avons étudié le type de cellule Shh-cible responsable de cet effet. Pour ce faire, nous avons utilisé des souris Smo KO conditionnelles tissus spécifiques (Smo^{Flox}). En effet, comme Smo est un régulateur positif essentiel de la signalisation Hh, les souris Smo^{Flox} sont classiquement utilisées pour perturber la signalisation Hh dans des types de cellules spécifiques. Les souris Smo^{Flox/Flox} et leurs contrôles subissaient ensuite une chirurgie de ligature-exérèse.

Le KO de Smo a d'abord été induit dans des cellules inflammatoires (macrophages et neutrophiles) en élevant des souris Smo^{Flox} avec des souris LysM-Cre. La densité des macrophages a été évaluée par immunohistochimie et cytométrie en flux. Le nombre de cellules CD68+ comptées sur les coupes transversales musculaires et le nombre de cellules CD11b, CD11c doubles positives comptées par cytométrie en flux étaient équivalents chez les souris LysM-Cre, Smo^{Flox/Flox} et leurs contrôles, démontrant que **Shh ne limite pas le recrutement des macrophages en signalant aux macrophages directement.**

De la même manière, nous avons ensuite montré que **Shh ne limite pas la densité des macrophages en modulant le phénotype des CE** dans des souris Pdgfb-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox}.

Enfin, nous avons spécifiquement perturbé l'expression de Smo dans les myocytes, en élevant des souris Smo^{Flox} avec des souris HSA-Cre^{ERT2}. La densité des macrophages était significativement augmentée chez les souris HSA-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox}. Ce résultat était confirmé par une analyse FACS de cellules CD11b, CD11c doublement

positives. Ensemble, ces résultats démontrent que **Shh ne limite pas le recrutement des macrophages dans le muscle squelettique en modulant directement les cellules inflammatoires ou le phénotype des CE, mais par son action sur les myocytes.**

Comme les macrophages sont connus pour produire des molécules pro-angiogéniques, nous avons évalué l'angiogenèse dans les souris HSA-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox} et conformément aux résultats obtenus chez les souris déficientes en Shh, nous avons observé une augmentation significative de la densité capillaire dans le muscle squelettique ischémique des souris HSA-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox} comparées à leurs contrôles 5 jours après ligature-exérèse, ce qui a entraîné une augmentation significative de la perfusion du pied au 10^{ème} jour. **Cette augmentation de densité capillaire était associée à une augmentation significative des taux de VEGFA dans le muscle ischémique.**

Ainsi, l'augmentation de l'infiltration des macrophages chez les souris déficientes en signalisation Hh dans les myocytes a été associée à une augmentation de l'expression de VEGFA et une augmentation transitoire de l'angiogenèse, démontrant que **Shh endogène limite l'inflammation et l'angiogenèse indirectement par une signalisation aux myocytes.**

Résumé des principaux résultats

- La carence en Shh conduit à une angiogenèse transitoire dans le muscle squelettique ischémique, cependant, cette réponse semble inefficace et ne conduit pas à une amélioration durable de la perfusion distale.
- La protéine Shh endogène a des propriétés anti-angiogéniques plutôt que pro-angiogéniques.
- Shh endogène n'est pas nécessaire pour la myogenèse post-ischémie.
- Shh présente une action anti-inflammatoire dans les tissus ischémiques en limitant le recrutement des macrophages.
- Shh endogène limite l'inflammation et l'angiogenèse indirectement par une signalisation aux myocytes.

3. Discussion

La présente étude est la première à utiliser des outils spécifiques (c'est-à-dire des souris déficientes en Shh) pour étudier le rôle de Shh endogène dans l'angiogenèse chez les souris adultes.

Bien qu'il ait été précédemment démontré que l'administration ectopique de Shh favorise l'angiogenèse post-ischémie, la présente étude révèle que **Shh endogène ne favorise pas l'angiogenèse post-ischémie**, ce qui suggère que **le ligand Hh ectopique et le ligand Hh endogène contrôlent l'angiogenèse post-ischémie par le biais de mécanismes distincts**.

La protéine Shh administrée par voie ectopique augmente l'expression de VEGFA dans les fibroblastes, tandis que l'absence de Shh endogène entraîne une inflammation aberrante des tissus ischémiques et une angiogenèse transitoirement accrue. Ainsi, **la protéine Shh endogène diminue l'expression de Ccl2 dans les myoblastes, ce qui entraîne une diminution de l'invasion des macrophages et une diminution des niveaux de VEGFA dérivés des macrophages dans le muscle ischémique** (Caradu, Guy, et al. 2018) (Figure 28).

En outre, l'angiogenèse est altérée chez les souris Dhh KO constitutives (M. A. Renault, Chapouly, et al. 2013), mais cela résulte probablement d'une altération du développement du nerf périphérique puisque le même phénotype est présent chez les souris dénervées mais pas chez les souris dont le KO de Dhh est induit à l'âge adulte (données du laboratoire non publiées). Ainsi, **selon les résultats obtenus jusqu'à présent, ni Shh ni Dhh ne semblent favoriser l'angiogenèse dans le cadre de l'ischémie de patte**.

Une autre hypothèse est que la signalisation Hh peut être activée par une signalisation non canonique, quels que soient les ligands Hh. Par exemple, Gli3 qui est nécessaire pour l'angiogenèse post-ischémie (M. A. Renault et al. 2009), est régulée positivement par E2F1 dans les myoblastes (M. A. Renault, Vandierdonck, et al. 2013).

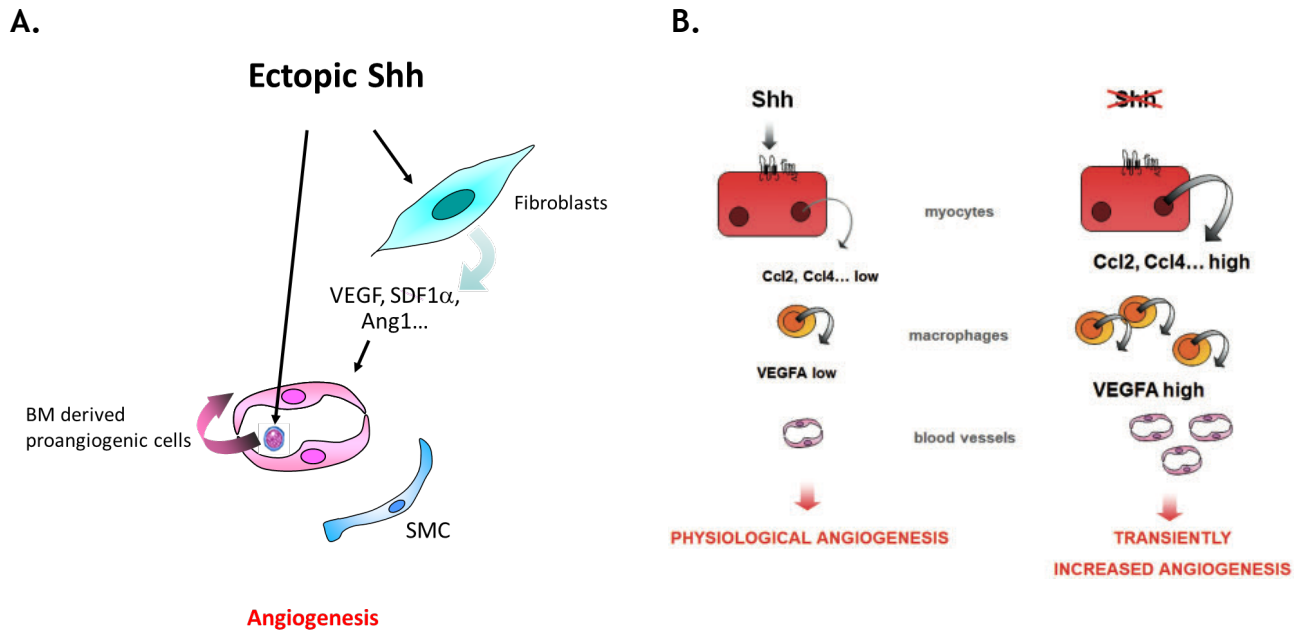


Figure 28. Schéma représentant les principaux événements cellulaires impliqués dans les effets de Shh ectopique et endogène dans un contexte ischémique

- A. Effet pro-angiogéniques de la thérapie Shh (Shh ectopique) dans un contexte ischémique - issu de (Chapouly et al. 2019)
 B. Effet de Shh endogène sur l'inflammation et l'angiogénèse par une signalisation aux myocytes.

Par ailleurs, la signalisation Hh aux CE ne participe pas à l'angiogénèse post-ischémie puisque l'angiogénèse se produit normalement chez les souris Smo^{ECKO} (M. A. Renault, Chapouly, et al. 2013) (Gupta et al. 2018a). Au contraire, les ligands Hh favoriseraient l'angiogénèse indirectement en augmentant l'expression de facteurs pro-angiogéniques (VEGFA, Angpt1, Angpt2) dans les fibroblastes (R. Pola et al. 2001) (Palladino et al. 2011).

De plus, il a également été démontré que les ligands Hh favorisent le recrutement de cellules pro-angiogéniques dérivées de la moelle osseuse dans les tissus ischémiques (Palladino et al. 2011), et la signalisation Hh peut favoriser l'angiogénèse en régulant la myogénèse.

En effet, $\text{Gli3}^{\text{ECKO}}$ ne modifie pas l'angiogénèse post-ischémie tandis que l'angiogénèse est altérée chez la souris dont l'expression de Gli3 est perturbée dans les myoblastes

(M. A. Renault, Vandierdonck, et al. 2013). De plus, Gli3 régule l'expression d'Angpt1 et TYMP dans les myoblastes.

En plus de fournir des preuves du rôle de Shh dans l'homéostasie tissulaire et la régénération tissulaire chez les adultes, notre étude élucide davantage le processus de régulation de l'angiogenèse post-ischémie. Plus précisément, nos données démontrent que si le recrutement accru des macrophages dans le muscle ischémique accélère l'angiogenèse, cette angiogenèse accrue est transitoire et ne conduit pas à une augmentation à long terme de la perfusion tissulaire. En accord avec ces résultats, une étude récente a démontré que l'administration de macrophages CD14+ chez la souris augmente le nombre de vaisseaux sanguins perfusés à la fois dans un test Matrigel plug *in vivo* et dans le modèle d'ischémie de patte chez la souris. Cependant, les vaisseaux sanguins formés restent larges, fuient et sont incapables de recruter des péricytes. En conséquence, les macrophages CD14+ induisent une angiogenèse pathologique plutôt que physiologique et persistante, qui n'entraîne aucune amélioration de la perfusion des membres 2 semaines après l'induction de l'ischémie de patte (Y.-E. Choi et al. 2015).

Le remodelage du réseau capillaire nouvellement formé dans le muscle du membre inférieur a récemment été suggéré comme étant essentiel pour une perfusion efficace du membre. En effet, alors que la densité capillaire au sein du muscle ischémique du membre inférieur (tibial antérieur et long extenseur des orteils) est au moins aussi élevée que celle d'un muscle sain 10 à 14 jours après une chirurgie de ligature-exérèse, la perfusion des membres reste faible: le rapport entre le flux sanguin dans le muscle ischémique et le muscle sain ne dépasse pas 0,5 (M.-A. Renault, Chapouly, et al. 2013). L'une des explications proposées pour cela est que le réseau capillaire nouvellement généré est mal musclicarisé.

Cependant, alors que l'altération de la signalisation Hh dans les macrophages favorise la musclicarisation capillaire, la carence en Shh diminue la musclicarisation capillaire. Par conséquent, il est peu probable que Shh soit le ligand Hh qui contrôle le comportement des macrophages et le rôle de la signalisation Hh dans les

macrophages dans le cadre de l'angiogenèse post-ischémie doit être étudié plus avant.

Pour l'instant il semble établi que, lorsqu'il est administré ectopiquement, Shh favorise l'expression de VEGFA dans les fibroblastes et par conséquent l'angiogenèse. Ce que nous avons trouvé dans la présente étude est que la signalisation altérée de Shh dans les myocytes favorise le recrutement de macrophages exprimant le VEGFA, conduisant à une expression globale accrue de VEGFA dans le muscle ischémique. Il convient de noter que ce n'est pas la première étude à rapporter des effets contradictoires de la signalisation Hh sur la biologie des vaisseaux sanguins. Ainsi, dans le cerveau, la signalisation Hh endogène a été signalée comme favorisant l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011), tandis qu'une étude récente a montré que la protéine Dhh issue d'une tumeur cérébrale contribue à augmenter la fuite capillaire (Azzi et al. 2015b).

Les résultats sont décrits en détails et discutés dans le manuscrit intitulé « Endogenous Sonic Hedgehog limits inflammation and angiogenesis in the ischaemic skeletal muscle of mice » et publié dans Cardiovascular Research

B. Rôle et régulation de Dhh dans la CE

1. Rationnel de l'étude

La dysfonction endothéliale est connue pour être associée aux facteurs de risque cardiovasculaires, notamment l'hypertension, ainsi qu'aux contraintes de cisaillement, aux cytokines pro-inflammatoires ou aux taux élevés de glucose. Cependant, les événements moléculaires déclenchant la dysfonction endothéliale restent mal caractérisés.

Le facteur de transcription Klf2 est essentiel pour établir et maintenir l'intégrité endothéliale chez l'adulte. En effet, Klf2, connu pour être régulé négativement par un flux sanguin perturbé, une glycémie élevée ou des cytokines inflammatoires, s'est avéré nécessaire à la fonction de barrière endothéliale (Z. Lin et al. 2010), à l'expression endothéliale de NO synthase et à la quiescence endothéliale (Dekker et al. 2006; Bhattacharya et al. 2005), en inhibant l'activation des CE et l'angiogenèse.

Or, un article de 2010 identifiait Dhh et Klf2 comme des gènes mécano-sensibles modulés par les contraintes de cisaillement dans l'endothélium de l'artère carotide de la souris (Ni et al. 2010).

Au cours des dernières décennies, de nombreux résultats suggèrent que la signalisation Hh est essentielle pour l'intégrité des microvaisseaux, en particulier au niveau de la BHE (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011; Xia et al. 2013a; Chechneva et al. 2014b; V. B. Singh et al. 2016b). De plus, notre unité a récemment démontré que l'inhibition de Smo spécifiquement dans les CE entraîne une rupture de la barrière hémato-nerveuse chez la souris adulte (Chapouly et al. 2016b) tandis que la régulation négative de Dhh est associée aux facteurs de risque cardiovasculaires, tels que l'âge, le diabète sucré et l'obésité, tant chez les rongeurs (Chapouly et al. 2016b; Calcutt et al. 2003; M. A. Renault, Robbesyn, et al. 2013) que chez l'homme (Braune et al. 2017).

Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse que **la protéine Dhh dérivée de l'endothélium est essentielle au maintien de l'intégrité vasculaire chez l'adulte, par le biais d'une signalisation autocrine en aval de Klf2.**

2. Résultats

Dans les embryons, l'expression de Dhh a déjà été établie dans les cellules de Schwann, les cellules de Sertoli et les CE (Bitgood et McMahon 1995b). Néanmoins, le rôle de la protéine Dhh dérivée des CE n'a jamais été étudié. Par conséquent, nous avons commencé notre projet en criblant l'expression de Dhh dans les CE adultes de divers organes et avons constaté que **l'ARNm de Dhh est enrichi dans les fractions CD31+ du cerveau, du cœur et des poumons de souris adultes.**

De plus, nous avons montré par immunocoloration que **la protéine Dhh est exprimée par les CE dans le muscle squelettique adulte humain.** En outre, l'expression de l'ARNm de Shh était à peine détectable dans les CE en culture, attestant que **Dhh est le principal ligand Hh exprimé par les CE.**

Ensuite, nous avons étudié les mécanismes qui contrôlent l'expression de Dhh dans les CE et constaté que **Dhh est spécifiquement régulée à la baisse par les cytokines inflammatoires**, y compris le TNF- α et l'IL-1 β , **et par le stress oxydatif (H₂O₂)**. Au contraire, **l'expression de l'ARNm Dhh est significativement augmentée dans les CE cultivées en flux orbital**.

Ainsi, nous démontrons que chez l'adulte, **la protéine Dhh est exprimée par les CE elles-mêmes** et que son expression est **régulée positivement par les contraintes de cisaillement** mais est **régulée négativement par les cytokines inflammatoires**.

Nous montrons que **le KO de Dhh dans les CE favorise l'activation des CE et la perméabilité endothéliale à la suite d'une altération des jonctions adhérentes**. En effet, nous avons effectué des tests de culture cellulaire dans lesquels l'expression de Dhh a été altérée à l'aide de petits ARN interférents. Lorsque l'expression de Dhh est régulée à la baisse dans les CE, les jonctions dépendantes de la Cdh5 sont modifiées et présentent un phénotype en zig-zag. En conséquence, l'interaction de la Cdh5 avec la β -caténine est significativement réduite et la perméabilité de la monocouche de CE au dextran FITC 70 kDa est significativement augmentée. Le rôle de Dhh dans le maintien des jonctions adhérentes a ensuite été vérifié *in vivo* chez des souris dans lesquelles l'expression de Dhh a été spécifiquement inactivée dans les CE (souris Pdgfb-cre^{ERT2}; Dhh^{Flox/Flox} ou Dhh^{ECKO}). La coloration Cdh5 des aortes en face affiche des jonctions significativement plus épaisses chez les souris Dhh^{ECKO} par rapport à leurs contrôles. Les conséquences des altérations de jonction observées en l'absence de Dhh endothélial ont ensuite été mesurées après administration intraveineuse de dextran FITC 70 kDa et une fuite vasculaire spontanée était observée à la fois dans le cerveau et dans le cœur de souris Dhh^{ECKO}.

De plus, nous avons montré que **la protéine Dhh endothéliale est nécessaire pour empêcher l'activation des CE**. Ainsi, en culture cellulaire, l'inactivation de Dhh favorise à la fois l'expression de molécules d'adhésion telles que VCAM-1 et ICAM-1 et l'expression de cytokines inflammatoires, y compris IL-6 et Ccl2. L'expression accrue de VCAM-1 dans les vaisseaux Dhh^{ECKO} est confirmée *in vivo* dans des coupes pulmonaires. Enfin, nous avons mesuré les conséquences de l'activation de la CE

induite par l'inactivation de Dhh sur l'infiltration des neutrophiles dans les poumons après injection de LPS (lipopolysaccharide) chez la souris. Comme prévu, la densité des neutrophiles est significativement plus élevée chez les souris Dhh^{ECKO} traitées par LPS par rapport aux souris contrôles traitées par LPS, ce qui confirme le rôle essentiel de Dhh pour empêcher l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire par les CE. Cet ensemble de données démontre pour la première fois que la protéine Dhh endothéliale est essentielle dans le maintien de l'intégrité de la jonction intercellulaire endothéliale et de la quiescence immunitaire.

Résumé des principaux résultats

- La protéine Dhh est le principal ligand Hh exprimé par les CE dans le muscle squelettique adulte humain.
- Chez l'adulte, son expression est régulée positivement par les contraintes de cisaillement mais est régulée négativement par les cytokines inflammatoires et le stress oxydatif.
- La protéine Dhh endothéliale est essentielle pour empêcher l'activation des CE, ainsi que pour le maintien de l'intégrité de la jonction intercellulaire endothéliale et de la quiescence immunitaire.

3. Discussion

De manière surprenante, malgré plusieurs études sur le développement embryonnaire rapportant l'expression de Dhh au niveau de l'endothélium, la fonction de Dhh dans les CE adultes n'avait jamais été explorée auparavant (Bitgood et McMahon 1995b). Dans cette étude, nous avons émis pour la première fois l'hypothèse que la perte d'expression endothéliale de Dhh dans les pathologies ischémiques cardiovasculaires pourrait être un événement moléculaire majeur déclenchant un dysfonctionnement endothélial en aval de Klf2.

Un tel paradigme était étayé par la littérature, montrant que Dhh est régulé à la baisse par plusieurs facteurs de risque cardiovasculaire, dont l'âge (M.-A. Renault, Robbesyn, et al. 2013) et le diabète de type 2 (Chapouly et al. 2016b). En effet, alors que la régulation Hh de l'angiogenèse est plutôt médiée par une régulation positive de VEGFA induite par Hh dans des cellules apparentées aux fibroblastes, la régulation

Hh de l'intégrité des vaisseaux sanguins semble être cellulaire autonome. Ainsi, **les souris Smo^{ECKO} et Dhh^{ECKO} présentent une perméabilité anormale des vaisseaux.** Or, plusieurs études rapportent déjà l'expression des ligands Hh par les CE elles-mêmes: Shh est exprimée par les CE de la pulpe dentaire (Farahani et al. 2012) et les CE sinusoidales du foie (Xie et al. 2013) et Ihh par les CE de la choroïde dans l'œil de souris (Dakubo et al. 2008). Enfin, les ligands Hh sont exprimés dans les CE tumorales (Becher et al. 2008; Valverde Lde et al. 2016; Yan et al. 2014).

Néanmoins, les voies de signalisation médiant la régulation Hh des jonctions intercellulaires ou l'expression de VCAM-1 restent inconnues. Par exemple, l'implication de la signalisation canonique Hh (c'est-à-dire la transcription dépendante de Gli) reste controversée. Tandis que plusieurs études ont rapporté une surexpression de Gli1 dans les CE lors du traitement par Shh (J. I. Alvarez et al. 2011; Brilha et al. 2017; Hochman et al. 2006a), quelques études suggèrent que la signalisation canonique Hh n'est pas fonctionnelle dans les CE et que, au contraire, les ligands Hh passent par une signalisation non canonique notamment via l'activation de RhoA/ROCK (P. Chinchilla et al. 2010; Q.-W. He et al. 2013a; A. H. Polizio et al. 2011; M. A. Renault et al. 2010) ou les voies PI3K/Akt (Kanda et al. 2003; M. A. Renault et al. 2010). Enfin, la surexpression de Gli3, un régulateur négatif de la signalisation canonique Hh, dans les CE en culture favorise l'expression de Cxcl1, Cxcl2, Cxcl8 et TYMP. Cependant, il agirait indépendamment de la voie canonique Hh (M. A. Renault et al. 2009).

Nous démontrons pour la première fois le rôle critique de la signalisation Dhh-Klf2 au niveau de l'endothélium dans les pathologies ischémiques cardiovasculaires chez l'adulte. En effet, dans un modèle de souris Dhh KO spécifiquement dans les CE, nous prouvons que Dhh, en aval de Klf2, est essentiel pour maintenir l'intégrité endothéliale en resserrant les jonctions adhérentes et en empêchant l'activation endothéliale. Par conséquent, nous identifions Dhh comme une nouvelle cible pour le développement de thérapies alternatives qui joueraient sur la fonction endothéliale mais pas sur l'angiogenèse.

Les résultats sont décrits en détails et discutés dans le manuscrit intitulé « Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults » et publié dans Circulation Research

C. Rôle de Dhh dans l'artériogénèse

1. Rationnel de l'étude

L'artériogénèse est de loin le mécanisme le plus efficace pour augmenter le flux sanguin après occlusion artérielle (Scholz et al. 2002; Oh et al. 2011; Vajanto et al. 2009). Cependant, alors que les mécanismes moléculaires et cellulaires régulant l'angiogénèse ont fait l'objet d'études approfondies, les mécanismes contrôlant l'artériogénèse sont mal connus. Il est malgré tout important de noter que l'artériogénèse est connue pour être déclenchée par les contraintes de cisaillement ou "shear stress" tandis que l'angiogénèse est déclenchée par l'hypoxie (Fung et Helisch 2012).

L'étude du réseau microvasculaire de patients diabétiques atteints de micro-angiopathie a permis de mettre en évidence une altération de l'architecture capillaire (Sangiorgi et al. 2010). Depuis ces observations, plusieurs études cliniques ont rapporté les résultats du **concept d'artérialisation du réseau veineux profond**, avec des techniques chirurgicales variables (Engelke C s. d.; Mutirangura et al. 2011; Alexandrescu et al. 2011). Cependant, cette technique reste très peu développée actuellement, principalement en raison de l'absence de procédure standardisée (Lu et al. 2006). Une nouvelle technique, l'artérialisation veineuse profonde par voie percutanée est actuellement en cours d'étude (Kum et al. 2017) et l'une des hypothèses explicatives du succès de cette technique serait la réactivation des mécanismes d'artériogénèse par la pressurisation du lit capillaire veineux permettant à des collatérales de se former.

Lors des études précédentes nous avons pu observer que l'expression de **Dhh** est régulée positivement par les contraintes de cisaillement dans les CE et que Dhh est une cible transcriptionnelle en aval de Klf2. En tant que telle, son expression est fortement surexprimée par les contraintes de cisaillement à la fois *in vitro* et *in vivo*

(Ni et al. 2010). En conséquence, son expression est principalement retrouvée au niveau des CE artériolaires (Vanlandewijck et al. 2018). En outre, certaines données suggèrent que la **signalisation Hh pourrait contrôler la maturation des vaisseaux sanguins**, en contrôlant le recrutement des cellules murales (Kengo F. Kusano et al. 2004; 2005; Qinyu Yao et al. 2014) et la morphogenèse ramifiée (Kolesová, Roelink, et Grim 2008).

Le but de cette étude était d'étudier le rôle et le mécanisme d'action de la signalisation Hedgehog (Hh) dans le cadre de l'artériogénèse induite par les contraintes de cisaillement dans le membre inférieur ischémique.

2. Résultats

Le rôle de Dhh endothélial dans l'artériogénèse post-ischémie a été étudié par le biais de souris $Cdh5-Cre^{ERT2}$, $Dhh^{Flox / Flox}$ (Dhh^{ECKO}). L'ischémie de patte était induite à la fois chez les souris Dhh^{ECKO} et chez leurs contrôles par ligature exérèse de l'artère fémorale superficielle et les souris étaient sacrifiées au 5^{ème} et 10^{ème} jour post-ischémie.

L'artériogénèse était évaluée par micro-scanner afin de réaliser une imagerie du réseau artériel comme précédemment décrit (Oses et al. 2009). Nous avons tout d'abord vérifié la cinétique de l'artériogénèse post-ligature exérèse au micro-scanner et avons déterminé que le temps optimal pour l'observation de l'artériogénèse se situait à J5 post-ischémie. En effet, dans ce modèle, J5 permet d'observer un nombre maximal de collatérales, et ce nombre de collatérales n'augmente plus au-delà.

Ensuite, nous avons vérifié qu'il n'y avait pas d'augmentation de l'angiogénèse chez ces souris en mesurant la densité capillaire chez les souris Dhh^{ECKO} et leurs contrôles en immunocoloration.

Puis nous avons mesuré le nombre de collatérales, leur diamètre et leur tortuosité qui ne semblaient pas différer entre les souris Dhh^{ECKO} et les souris contrôles.

Enfin, les collatérales étaient imagées après immuno-coloration en utilisant des anticorps anti-CD31, anti-actine musculaire lisse et anti-CD68 afin d'identifier les CE, les CML et les macrophages respectivement dans le but de permettre d'évaluer la couverture des collatérales par les CML et les macrophages. **Le recouvrement de ces nouveaux vaisseaux par les CML semblait alors diminué en l'absence de Dhh. Ainsi, Dhh semblerait nécessaire à la maturation des vaisseaux (Figure 29).**

Résumé des principaux résultats

- Dhh semblerait nécessaire à la musculation et la maturation des vaisseaux

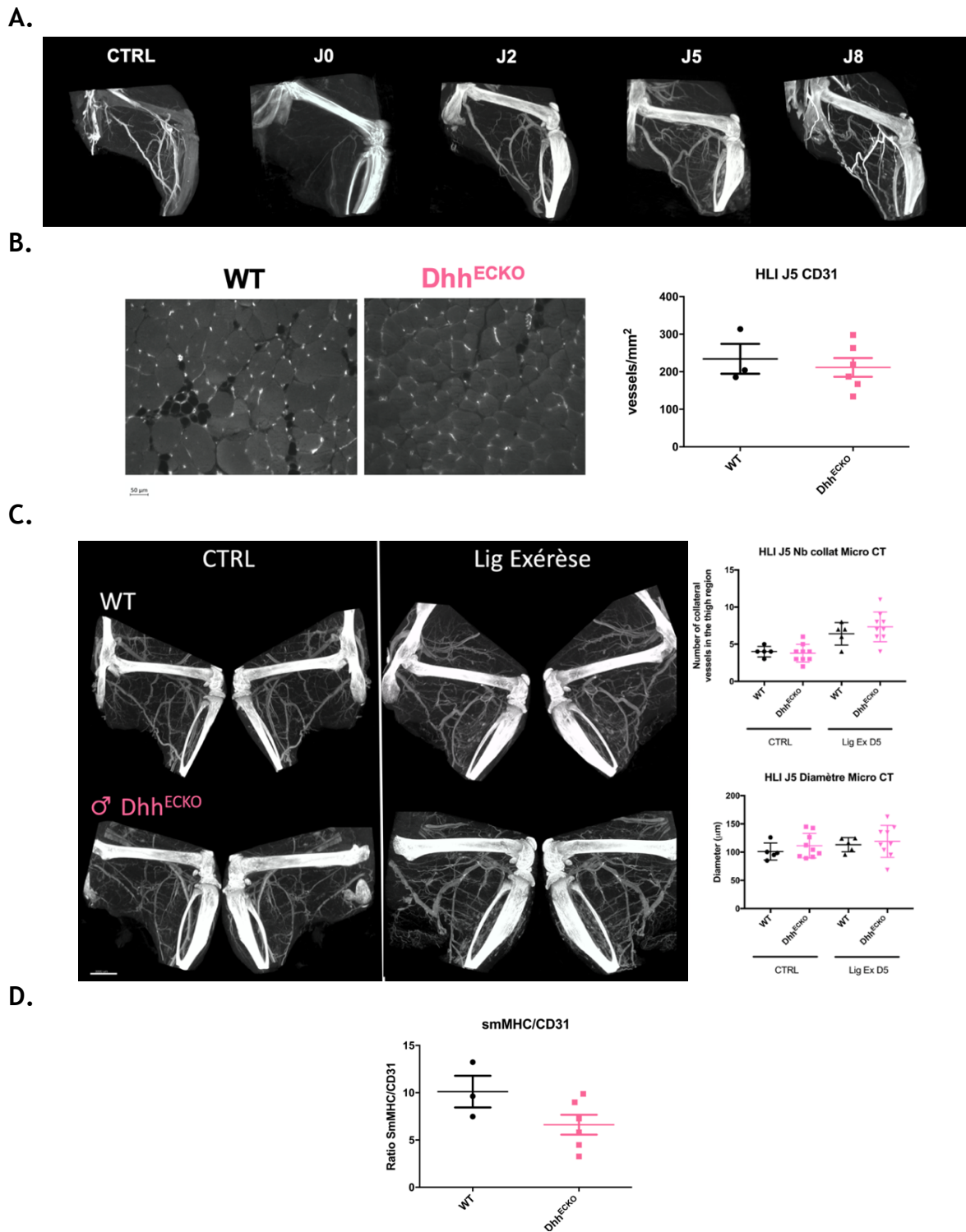


Figure 29. Investigation du Rôle de Dhh dans l'Artériogénèse Physiologique Dans un Contexte d'Ischémie de Membre Inférieur

- A. Cinétique et mise au point du microscanner
- B. L'angiogénèse ne semble pas différer entre les souris contrôle et Dhh^{ECKO}
- C. L'artériogénèse ne semble pas différer entre les souris contrôle et Dhh^{ECKO}
- D. Le recouvrement de ces nouveaux vaisseaux par les cellules musculaires lisses est diminué en absence de Dhh

3. Discussion

Ces données n'ont pas encore été publiées et le rôle précis de la voie de signalisation Hh dans la maturation des vaisseaux reste à préciser par d'autres manipulations. Cependant cette piste de recherche ne doit pas être négligée. Pour l'instant l'étude des effets de la voie Hh sur la maturation des vaisseaux est essentiellement centrée sur l'étude des effets de Shh, et aucune donnée de la littérature n'est actuellement disponible sur les effets de Dhh dans ce processus.

C'est en 2004 qu'il a été suggéré pour la première fois que **Shh favoriserait la muscularisation** (recrutement et croissance de CML pendant la myogenèse vasculaire) **et la maturation des vaisseaux sanguins**. Cette étude montrait que la thérapie génique Shh favorise la formation de vaisseaux sanguins plus larges et plus muscularisés dans les nerfs diabétiques (K. F. Kusano et al. 2004). Cette observation a été confirmée dans le cœur ischémique en 2011 (J. Roncalli et al. 2011) et il a été démontré que FGF9 augmente l'expression de Shh dans les CML et la formation de vaisseaux stables (Frontini et al. 2011). Cependant, l'inhibition de Smo par la cyclopamine inhibe la couverture des capillaires nouvellement formés par les péricytes dans la cornée de souris (Q. Yao et al. 2014), et la diminution de l'expression de Shh est associée à la régulation négative de l'expression d'Angpt1, la perte des péricytes et une perméabilité capillaire accrue dans la rétine de souris diabétiques Akika (Huang et al. 2015) (**Figure 30**).

Les embryons de poisson zèbre mutés pour *igu* (orthologue de la protéine humaine DAZ interacting zinc finger protein 1, impliquée dans le développement du système vasculaire et du cil primaire) traités par cyclopamine affichent une diminution de l'expression mésenchymateuse d'Angpt1 et des hémorragies dans de nombreux territoires, y compris les somites, la zone pharyngée et la tête. Les jonctions serrées entre les CE présentent une morphologie et une taille normales dans les embryons mutés, tandis que les cellules murales périvasculaires ne parviennent pas à entrer en contact avec les CE. Ces résultats suggèrent que l'hémorragie chez les mutants *igu*^{fo10a} n'est pas due à un défaut de structure des CE mais à un défaut au niveau des péricytes (Lamont et al. 2010). Néanmoins, bien que Kolesova *et al.* rapportent que l'administration d'anticorps bloquant 5E1 dans des embryons de poisson zèbre

entraîne des hémorragies, la distribution des CML dans la paroi vasculaire est inchangée (Kolesova, Roelink, et Grim 2008).

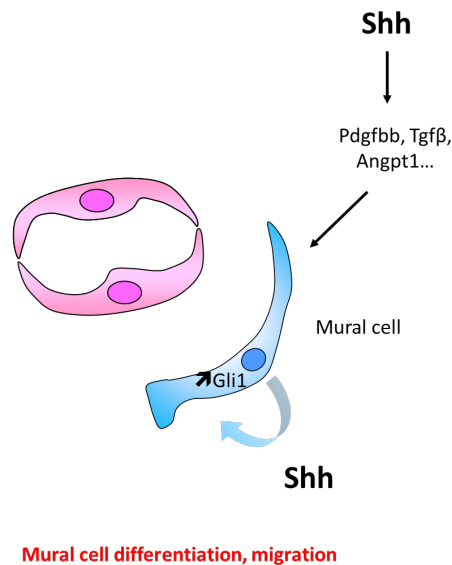


Figure 30. Schéma représentant les principaux événements cellulaires impliqués dans le recrutement et la différenciation des cellules murales induites par Hh - issu de (Chapouly et al. 2019)

La muscularisation de nouveaux vaisseaux sanguins est plus probablement la conséquence d'une réponse directe des cellules murales (CML ou péricytes) à la stimulation de la voie de signalisation Hh, car les CML et les péricytes expriment Shh, Ptch1, Smo et Gli1 (Frontini et al. 2011; Sicklick et al. 2005; G. Wang et al. 2010; Q. Yao et al. 2014). En effet, Shh favorise la prolifération des CML (H. Li et al. 2012; Morrow et al. 2007) et leur survie (Morrow et al. 2007; Sicklick et al. 2005; G. Wang et al. 2010). Il est suggéré que ces effets résultent de l'activation directe du facteur de transcription Gli (F. Li et al. 2010; Morrow et al. 2007; G. Wang et al. 2010) par modulation de la signalisation Notch (Doyle et al. 2015; Morrow et al. 2009; Walshe et al. 2011) ou activation de l'autophagie via la phosphorylation d'Akt (H. Li et al. 2012).

En outre, Shh favorise la migration des CML et des péricytes (K. Chen et al. 2016; Shen et al. 2017; Q. Yao et al. 2014) via l'activation d'ERK1/2 et PI3K γ (Q. Yao et al. 2014). Shh pourrait également maintenir la différenciation des CML (Doyle et al. 2015), ou promouvoir la différenciation des cellules progénitrices en CML, y compris les cellules souches résidentes adventicelles Sca1⁺ (Fitzpatrick et al. 2017; Mooney

et al. 2015; Passman et al. 2008) ou les cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (J. Roncalli et al. 2011). De même, dans la dent, Shh active l'expression de Gli1 dans les cellules péri-artérielles qui donnent au moins en partie naissance aux péricytes NG2+ (Zhao et al. 2014).

En outre, il a été démontré que la différenciation des cellules progénitrices Sca1+ en CML passe par Ptch1 et Gli2 (Fitzpatrick et al. 2017). Notamment, une étude rapporte que Shh, via Gli2 et Klf4, favorise la dédifférenciation des CML vasculaires d'un phénotype contractile vers un phénotype sécrétoire (Zeng et al. 2016). Ainsi, Shh favorise l'activation des CML, qui se caractérise par un état prolifératif et dédifférencié.

Enfin, Shh augmente l'expression de facteurs favorisant la stabilisation des vaisseaux tels que Angpt1, PDGF-BB et TGF β (E. Dohle et al. 2011; Lee, Moskowitz, et Sims 2007).

En plus de participer à la maturation des vaisseaux sanguins, **la signalisation Hh est surexprimée dans les artères lésées**, en particulier Shh et Scube2, lors de la cicatrisation intimale après ligature d'artère carotide (Ali et al. 2013; Dutzmann et al. 2017; Morrow et al. 2009), dans des greffons veineux autologues (F. Li et al. 2010) et dans le poumon hypoxique (G. Wang et al. 2010). La régulation positive de Shh est associée à l'activation et à la prolifération des CML. Inversement, l'expression de Shh et Ptch1 dans les CML est diminuée dans les échantillons de tissus anévrismaux (Doyle et al. 2015).

Au niveau moléculaire, l'expression de Shh dans les CML est augmentée par l'hypoxie (G. Wang et al. 2010), des facteurs de croissance tels que PDGF-BB (Q. Yao et al. 2014; Zeng et al. 2016), des protéines de liaison aux acides gras de type cardiaque (Chen et al., 2016) et C1q/ TNF-related protein-5 (Shen et al. 2017). L'expression de Shh induite par PDGF-BB dépend de la voie de signalisation ERK1/2 (Zeng et al. 2016). Au contraire, l'expression de Shh dans les CML est régulée négativement par les contraintes de cisaillement (Morrow et al. 2007; Walshe et al. 2011). Enfin, une étude rapporte une diminution de l'activité de signalisation Hh (c'est-à-dire une

régulation négative de Gli1, Gli2 et Hhip) après ligature de l'artère carotide. Ceci est associé à la dédifférenciation des CML (Herring et al. 2017).

Ainsi il reste encore de nombreuses recherches à effectuer sur la participation de Dhh et Shh dans la muscularisation et la maturation des vaisseaux.

II. Physiopathologie de l'ICC chez l'Homme

1. Rationnel de l'étude

Comme expliqué au Chapitre d'INTRODUCTION/II/D/6, malgré de premiers résultats prometteurs chez l'animal, aucun essai de phase 3 n'a démontré l'efficacité des thérapies pro-angiogéniques (Conte et al. 2019) et **l'altération des voies de signalisation angiogéniques pourrait contribuer de manière significative à l'ICC par des mécanismes analogues au processus par lequel une signalisation altérée de l'insuline contribue au développement de l'insulino-résistance chez les sujets atteints de diabète de type 2**, ce qui suggère que les thérapies apportant des facteurs de croissance seraient moins efficaces que des thérapies visant à surmonter les défauts des voies de signalisation des facteurs de croissance angiogéniques.

Surtout, les études antérieures n'ont pas réussi à établir clairement si la densité capillaire dans le muscle ischémique est augmentée, diminuée ou non modifiée; cependant, 2 études ont rapporté une modification de la structure capillaire avec un épaissement significatif de la membrane basale (Baum et al. 2016; Ho et al. 2006).

Ce défaut de compréhension des mécanismes menant à l'ICC et aux lésions tissulaires pourrait s'expliquer par l'utilisation de modèles animaux peu représentatifs de la pathologie humaine, avec des modèles d'ischémie trop aiguë, sur des sujets indemnes de comorbidités. En effet, des écarts importants existent entre les modèles précliniques et l'ICC humaine, la norme la plus largement acceptée pour étudier le milieu complexe de cette pathologie restant la procédure de ligature (associée ou non à une exérèse) de l'A. fémorale. Néanmoins, **l'ICC semble liée à une interaction complexe d'angiogenèse altérée, de facteurs de risque systémiques (comme le diabète), d'inflammation, de dysfonctionnement**

endothélial et de dysfonctionnement des muscles squelettiques (Pérez-Cremades, Cheng, et Feinberg 2020).

Ainsi, une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'ICC et dans la reperfusion des muscles ischémiques semble essentielle afin de permettre d'identifier de nouvelles cibles dans la prévention, le diagnostic et la gestion thérapeutique de cet état pathologique invalidant et notamment des patients en ICC dits "sans option".

2. Résultats

Les tissus analysés appartenaient à une banque de tissus humains prélevés dans le cadre d'un programme hospitalier de recherche clinique (PHRC) « AOMI au stade d'ICC : caractérisation métabolique, morphologique et immunohistochimique des tissus atteints : étude pilote ». Au total, 10 sujets contrôles, 6 sujets atteints d'une AOMI stade 3 de la classification de Rutherford et 25 sujets atteints d'une AOMI stade 5-6 de la classification de Rutherford ont pu être analysés.

Pour les muscles contrôles (n=10), les prélèvements musculaires étaient réalisés chez des patients bénéficiant d'un stripping saphène et ne présentant aucun antécédent et aucun signe clinique en faveur d'un diagnostic d'artériopathie oblitérante des membres inférieurs. Pour les sujets Rutherford 3 (n=6), les prélèvements étaient réalisés au moment de la réalisation d'un geste de revascularisation chez des patients claudiquants, et pour les sujets Rutherford 5-6 (n=25), les prélèvements étaient réalisés au niveau des zones considérées comme saines par le chirurgien et des zones ischémisées au moment d'un geste d'amputation chez des patients en ICC.

Les patients contrôles présentaient significativement moins de surface de cellules musculaires Desmine négatives comparés aux sujets Rutherford 5-6 (9.3 ± 2.5 vs $24.0 \pm 3.2\%$; $p=0.04$) et moins de fibrose (vert lumière en Trichrome de Masson) (2.4 ± 0.2 vs $6.6 \pm 1.5\%$; $p=0.01$) (**Figure 31A et B**).

Aucune différence significative de nombre d'éléments CD31 positifs n'était retrouvée entre les patients contrôles, les patients Rutherford 3 et les patients Rutherford 5-6 (1225 ± 186 vs 918 ± 149 vs 987 ± 65 vaisseaux/ mm^2 ; non significatif [NS]) (Figure 31C). Il n'y avait donc pas d'augmentation des phénomènes d'angiogenèse chez ces sujets, par rapport aux sujets contrôles.

Les patients contrôles et les patients Rutherford 3 présentaient significativement moins de monocytes/macrophages comparé aux patients Rutherford 5-6 (11 ± 7 et 13 ± 7 vs 50 ± 9 éléments $\text{CD68}^+/\text{mm}^2$; $p=0.005$ et $p=0.04$ respectivement) (Figure 31D). Par ailleurs, les patients contrôles présentaient significativement moins d'œdème interstitiel comparé aux patients Rutherford 5-6 (15.1 ± 1.2 vs $31.3 \pm 2.4\%$ de surface Albumine+; $p=0.0004$) (Figure 31E).

Résumé des principaux résultats

- Au total, le phénotype d'ICC chez l'homme était représenté par un défaut de réparation musculaire, caractérisé par une diminution des zones de cellules musculaires Desmine+ et une augmentation de la quantité de fibrose, sans diminution significative de densité capillaire en marquage CD31.
- Ce phénotype était accompagné de signes pouvant faire évoquer la présence d'une dysfonction endothéliale avec l'augmentation de l'état inflammatoire local marqué par l'augmentation de la densité en monocytes et macrophages, mais aussi l'augmentation de l'œdème interstitiel pouvant signer une éventuelle augmentation de la perméabilité vasculaire.

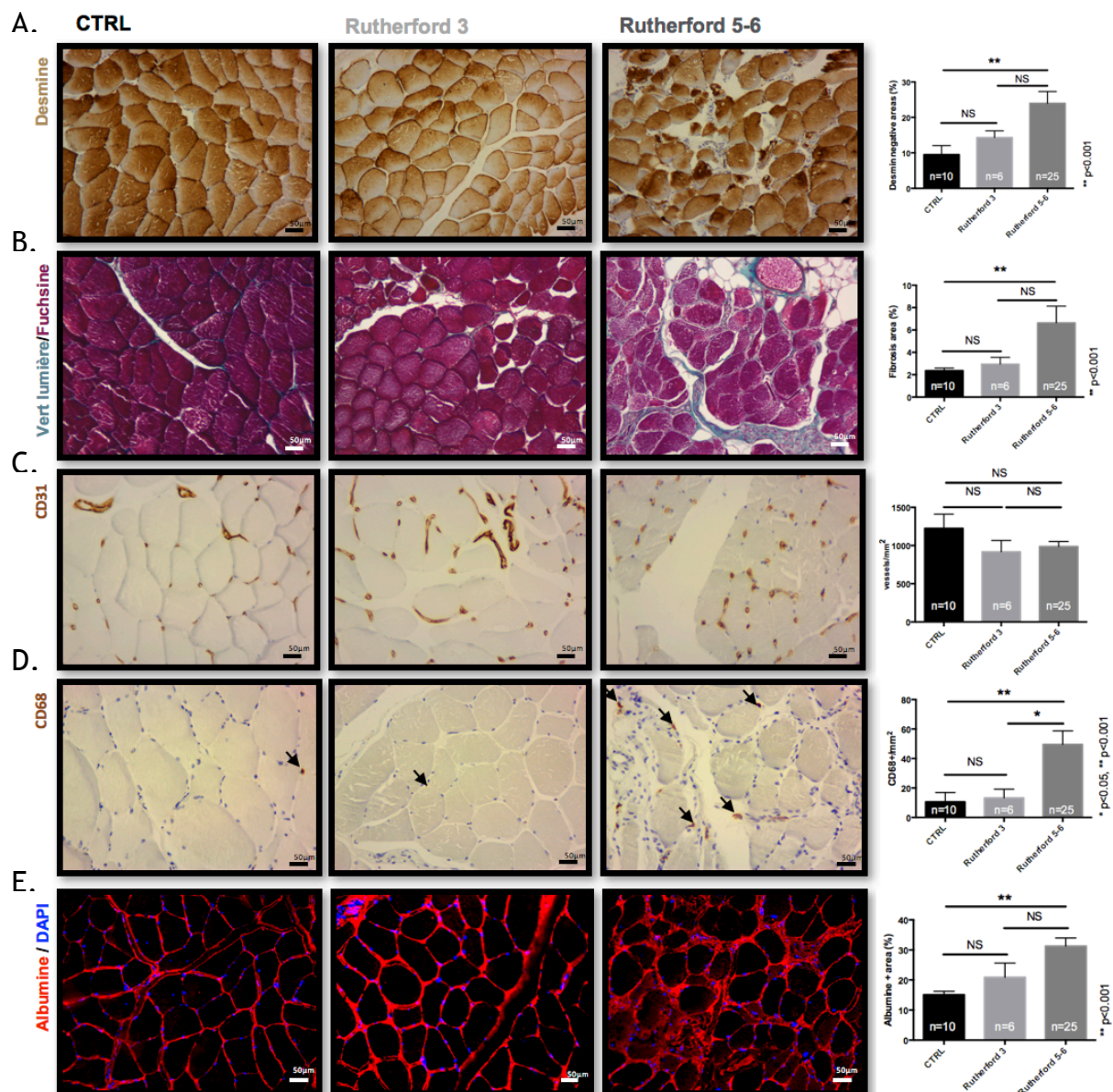


Figure 31. Evaluation du phénotype de défaut de réparation tissulaire et de perfusion chez l'homme

- A. Immuno-marquage Desmine (x260) et analyse quantitative des surfaces Desmine négatives sur le même type de coupes
- B. Marquage en coloration trichrome de Masson (x260) et analyse quantitative des surfaces de fibrose marquées en vert lumière sur coupes au grossissement x20
- C. Immuno-marquage CD31 (x260) et analyse quantitative du nombre d'éléments CD31 positifs sur le même type de coupes
- D. Immuno-marquage CD68 (x260) et analyse quantitative du nombre d'éléments CD68 positifs sur le même type de coupes
- E. Immuno-marquage en fluorescence de l'Albumine (x260) et analyse quantitative des surfaces Albumine positives sur coupes au grossissement x20

3. Discussion

Dans cette étude, nous établissons que le muscle ischémique des patients atteints d'ICC présente un **phénotype myopathique, sans aucune modification du nombre de capillaires mais avec des signes évidents de perturbation des microvaisseaux.**

En effet, les études antérieures n'ont pas réussi à établir clairement si la densité capillaire dans le muscle ischémique est augmentée, diminuée ou non modifiée; Cependant, 2 études ont rapporté une structure capillaire altérée avec un épaissement significatif de la membrane basale (Baum et al. 2016; Ho et al. 2006). Fait intéressant, notre étude révèle que la densité capillaire dans le muscle ischémique des patients atteints d'ICC équivaut à celle des muscles squelettiques sains de sujets contrôles. Par ailleurs, aucun changement significatif de la densité capillaire n'était observé sur les 3 niveaux de biopsies réalisés pour chaque patient en ICC, de la zone la plus ischémique aux berges de la zone d'amputation.

De plus, nous retrouvons une microangiopathie associée à l'ischémie, caractérisée par une perméabilité capillaire accrue couplée à une inflammation musculaire, reflétant l'activation des CE. Sur la base de l'hypothèse qu'une augmentation de la densité des vaisseaux sanguins améliorerait la perfusion tissulaire et conduirait au sauvetage des membres, plusieurs thérapies pro-angiogéniques ont été testées, d'abord sur des modèles animaux d'ischémie de pattes, puis, dans le cadre d'essais cliniques, chez des patients atteints d'AOMI.

Comme mentionné dans l'introduction, les premiers résultats obtenus chez l'animal étaient très prometteurs (Couffinhal et al. 1999; Takeshita et al. 1994), et les essais cliniques de phase I ont démontré avec succès une augmentation de la formation de vaisseaux collatéraux après transfert de gène artériel de plasmides codant pour le VEGF-A chez les patients atteints d'ICC (Isner et al. 1996). Cependant, entre-temps, des essais cliniques randomisés de plus grande envergure testant des thérapies angiogéniques dans la claudication intermittente ou l'ICC ont donné des résultats négatifs sur les critères de jugements principaux, à savoir les taux d'amputation, la diminution de la douleur et le temps de marche maximal (Cooke et Losordo 2015).

En raison de nos résultats, montrant que la densité capillaire n'est pas diminuée dans le muscle ischémique des patients atteints d'ICC, et des résultats mitigés obtenus dans les études précédentes avec des thérapies pro-angiogéniques, nous avons supposé que la stimulation de la densité capillaire n'est peut-être pas la meilleure approche pour améliorer suffisamment la perfusion du muscle ischémique et pour atteindre un équilibre permettant la récupération musculaire et donc le sauvetage de membre.

Les résultats sont décrits en détails et discutés dans le manuscrit intitulé « Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults » et publié dans Circulation Research

III. Mise au point d'un modèle expérimental de diabète et d'ICC chez la souris se rapprochant du phénotype humain

1. Rationnel de l'étude

Pour vérifier notre hypothèse, nous avons décidé d'explorer plus avant le rôle du dysfonctionnement de la CE dans la physiopathologie de l'ICC, dont les symptômes sont principalement liés à l'ischémie musculaire, induite par des lésions artérielles macrovasculaires entraînant une hypoperfusion.

Pour se faire, un nouveau modèle d'ischémie par ligature séquentielle a été choisi afin de reproduire de façon plus fidèle l'ICC retrouvée chez l'homme. En effet, le choix du modèle d'ischémie revêt une importance capitale dans l'interprétation des résultats obtenus et le modèle de ligature exérèse habituellement réalisé dans le laboratoire semblait moins adapté (Lotfi et al. 2013).

Ainsi, la ligature séquentielle permet de préserver l'intégrité des veines et nerfs adjacents aux artères, d'obtenir une ischémie chronique perdurant jusqu'à 28 jours après induction de l'ischémie avec un stress oxydatif s'apparentant à celui retrouvé chez l'homme (Lejay et al. 2015) et d'obtenir un phénotype de collatérales hélicoïdales, ainsi qu'une étude plus spécifique de l'angiogenèse en limitant le

phénomène d'artériogénèse à partir du réseau collatéral préexistant en provenance de l'artère iliaque interne (Hellingman et al. 2010).

2. Résultats

Le nouveau modèle d'ischémie par ligature séquentielle choisi pour ce projet a été comparé au modèle de ligature exérèse habituellement réalisé dans le laboratoire (Lotfi et al. 2013). Une cinétique du modèle de ligature séquentielle a été réalisée avec sacrifice de souris C57BL/6 à J0, J2, J4, J6, J10, J14 et J28 post ligature afin de déterminer le temps optimal de sacrifice, les données sont disponibles **Figure 32**.

Les souris étaient sacrifiées à J28 afin d'observer le phénotype et de le comparer à celui qui avait été obtenu sur les tissus humains (**Figure 33A**). Il n'existait pas de différence significative en terme de score de nécrose entre les deux groupes (**Figure 33B**).

La coloration Hémalun-Eosine (**Figure 33D**) et le marquage Desmine (**Figure 33E**) permettaient d'observer un phénotype se rapprochant du phénotype humain, déjà décrit dans la littérature comme un « phénotype myopathique », avec une hétérogénéité de taille des fibres musculaires, une forme arrondie des cellules musculaires comportant un noyau central, la présence d'œdème et une immaturité globale de la réparation musculaire (Pipinos et al. 2007; Lejay et al. 2015). Cette immaturité de régénération musculaire était confirmée en qPCR avec une augmentation significative du marqueur tardif de différenciation musculaire Myh1 (myosin heavy chain) à J10 dans le groupe ligature exérèse (niveau d'expression relative d'ARNm de Myh1 de 192321 ± 20606 dans le groupe ligature exérèse vs 81414 ± 19820 dans le groupe ligature séquentielle; $p=0.05$) et J28 (niveau d'expression relative d'ARNm de Myh1 de 442167 ± 44007 vs 225766 ± 56035 ; $p=0.03$) et une diminution significative de MyoG (myogénine), marqueur de différenciation musculaire précoce à J10 (niveau d'expression relative d'ARNm de MyoG de 1945 ± 464 vs 4028 ± 479 ; $p=0.05$) et J28 (niveau d'expression relative d'ARNm de MyoG de 180 ± 47 vs 488 ± 118 ; $p=0.05$) (**Figure 33F et G**) (Stuart et al. 2016).

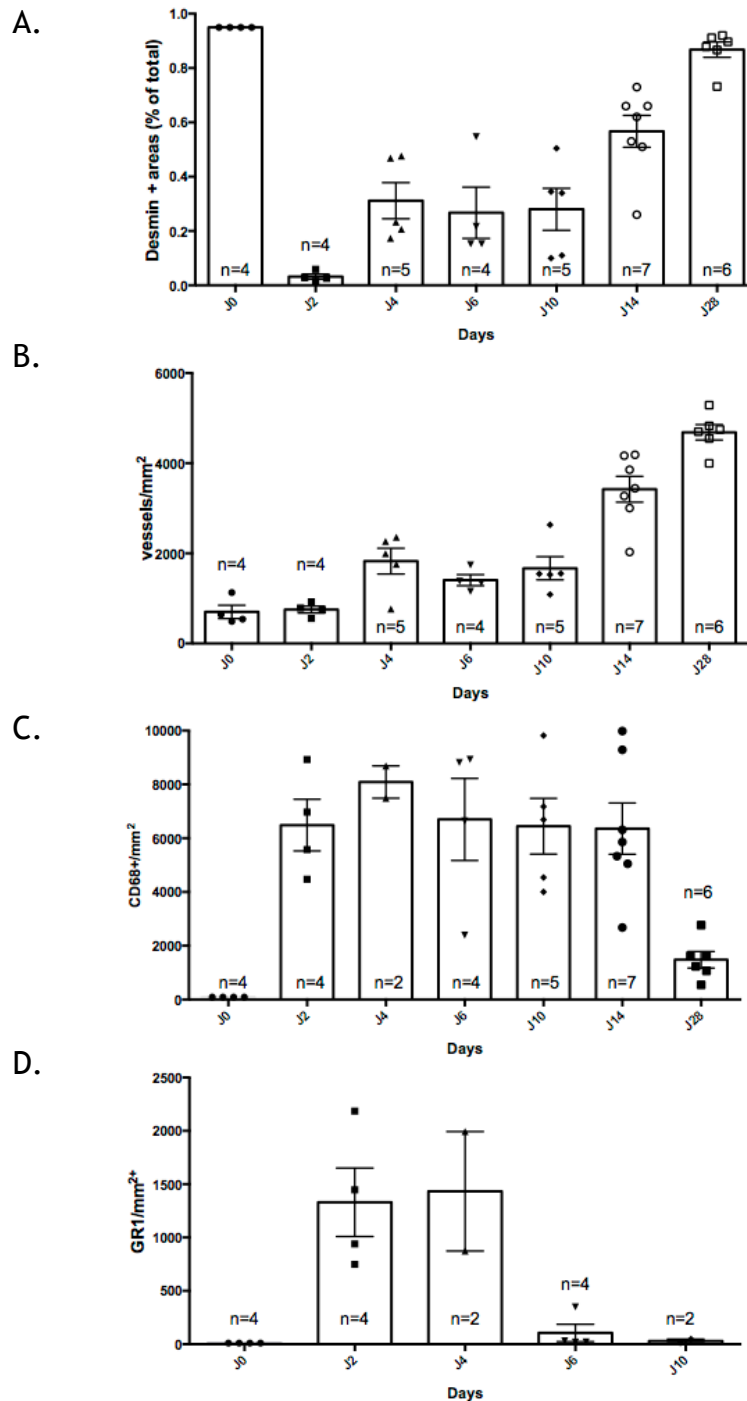


Figure 32. Cinétiques du nouveau modèle de ligature séquentielle

Réalisation d'une cinétique du modèle de ligature séquentielle avec sacrifice de souris C57BL/6 à J0, J2, J4, J6, J10, J14 et J28 post ligature

A. Analyse quantitative de l'immuno-marquage Desmine en surface Desmine+/mm², reflet de l'état de réparation musculaire

B. Analyse quantitative de l'immuno-marquage CD31 en nombre de vaisseaux CD31/mm², reflet de la néo-angiogenèse

C. Analyse quantitative de l'immuno-marquage CD68 en nombre d'éléments CD68+/mm², reflet de l'état inflammatoire local

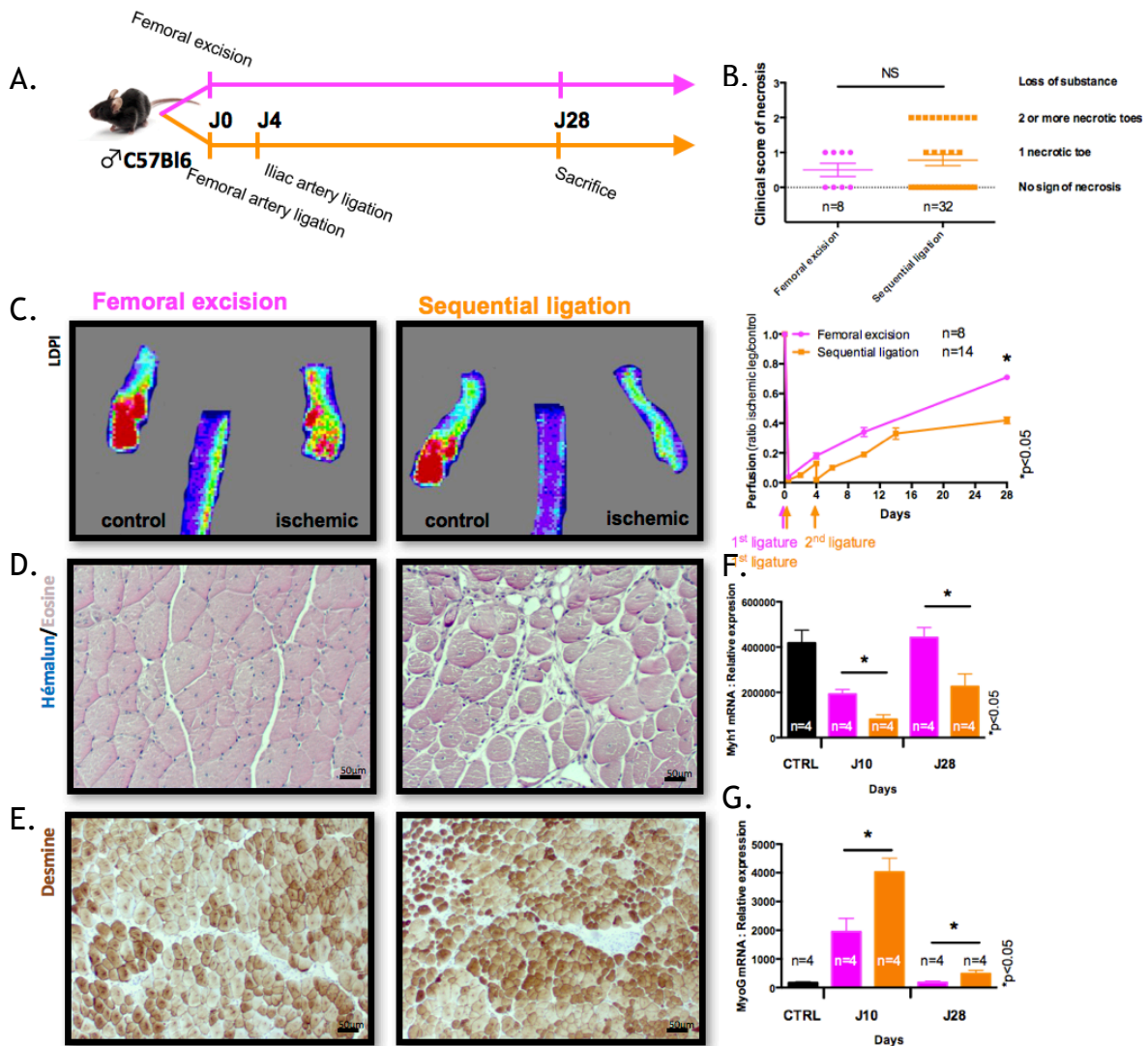
D. Analyse quantitative de l'immuno-marquage GR1 en nombre d'éléments GR1+/mm², reflet de l'état inflammatoire local précoce (marquage des polynucléaires neutrophiles, premiers globules blancs à arriver sur le site de l'ischémie)

Par ailleurs, la surface de fibrose (vert lumière) était significativement inférieure dans le MTA sain et le MTA post ligature-exérèse fémorale comparé au MTA post ligature séquentielle (3.0 ± 0.2 et 2.9 ± 0.5 vs $6.9 \pm 2.4\%$; $p=0.02$ et $p=0.009$ respectivement) (**Figure 33H**).

Aucune différence significative de nombre d'éléments CD31 positifs n'était retrouvée entre le MTA sain, le MTA post ligature-exérèse fémorale et le MTA post ligature séquentielle à J28 (3782 ± 459 , 4302 ± 353 et 3975 ± 141 vaisseaux/ mm^2 ; NS) (**Figure 33I**). Cependant, un défaut de perfusion significatif était mis en évidence à J28 entre le modèle de ligature-exérèse fémorale et le modèle de ligature séquentielle (ratio patte ischémisée/contrôle de 0.71 ± 0.03 vs 0.42 ± 0.06 ; $p=0.01$) (**Figure 33C**). Par ailleurs, les vaisseaux néo-formés semblaient moins matures dans le modèle ligature séquentielle, avec une hétérogénéité de forme, un plus gros calibre et une paroi épaissie.

Il y avait significativement moins d'infiltration de monocytes/macrophages dans le MTA post ligature-exérèse fémorale comparé au modèle ligature séquentielle (164 ± 37 vs 346 ± 72 éléments CD68+/ mm^2 ; $p=0.02$) (**Figure 33J**). De plus, il y avait significativement moins d'œdème interstitiel dans le MTA post ligature-exérèse fémorale comparé au modèle ligature séquentielle (4.7 ± 0.3 vs $10.8 \pm 0.6\%$ de surface Albumine+; $p=0.002$) (**Figure 33K**).

Nous avons ensuite transposé ce modèle sur un modèle de souris diabétiques de type 2, les souris $\text{Lepr}^{\text{Db/Db}}$. Cependant, dans un travail préliminaire de l'unité, ces souris avaient déjà démontré une sorte de protection vis-à-vis du modèle de ligature exérèse, et ces données ont été confirmées lors de l'utilisation du modèle de ligature séquentielle, avec la mise en évidence d'une augmentation préalable du nombre de vaisseaux CD31+ et l'absence de déficit perfusionnel après ligature, sans aucune des caractéristiques du phénotype myopathique recherché (**Figure 34**).



A. Schéma expérimental présentant un bras ligature exérèse et un bras ligature séquentielle
 B. Score de nécrose clinique après ligature exérèse (n=8) et ligature séquentielle (n=32)
 C. Images en « laser doppler perfusion imaging » des plantes de pattes postérieures et mesure quantitative de la récupération du flux sanguin après ligature exérèse (n=8) et ligature séquentielle (n=14)
 Les prélèvements de muscle tibial antérieur étaient réalisés à J28
 D. Marquage en coloration Hémalum-éosine (x260)
 E. Immuno-marquage Desmine (x260)
 F. Analyse quantitative en qPCR de l'expression relative de l'ARNm « myosin heavy chain » (Myh1) (n=4 par groupe) sur muscle sain et sur muscle ischémié par ligature exérèse ou ligature séquentielle après 10j et après 28j
 G. Analyse quantitative en qPCR de l'expression relative de l'ARNm « myogénin » (MyoG) (n=4 par groupe) sur muscle sain et sur muscle ischémié par ligature exérèse ou ligature séquentielle après 10j et après 28j

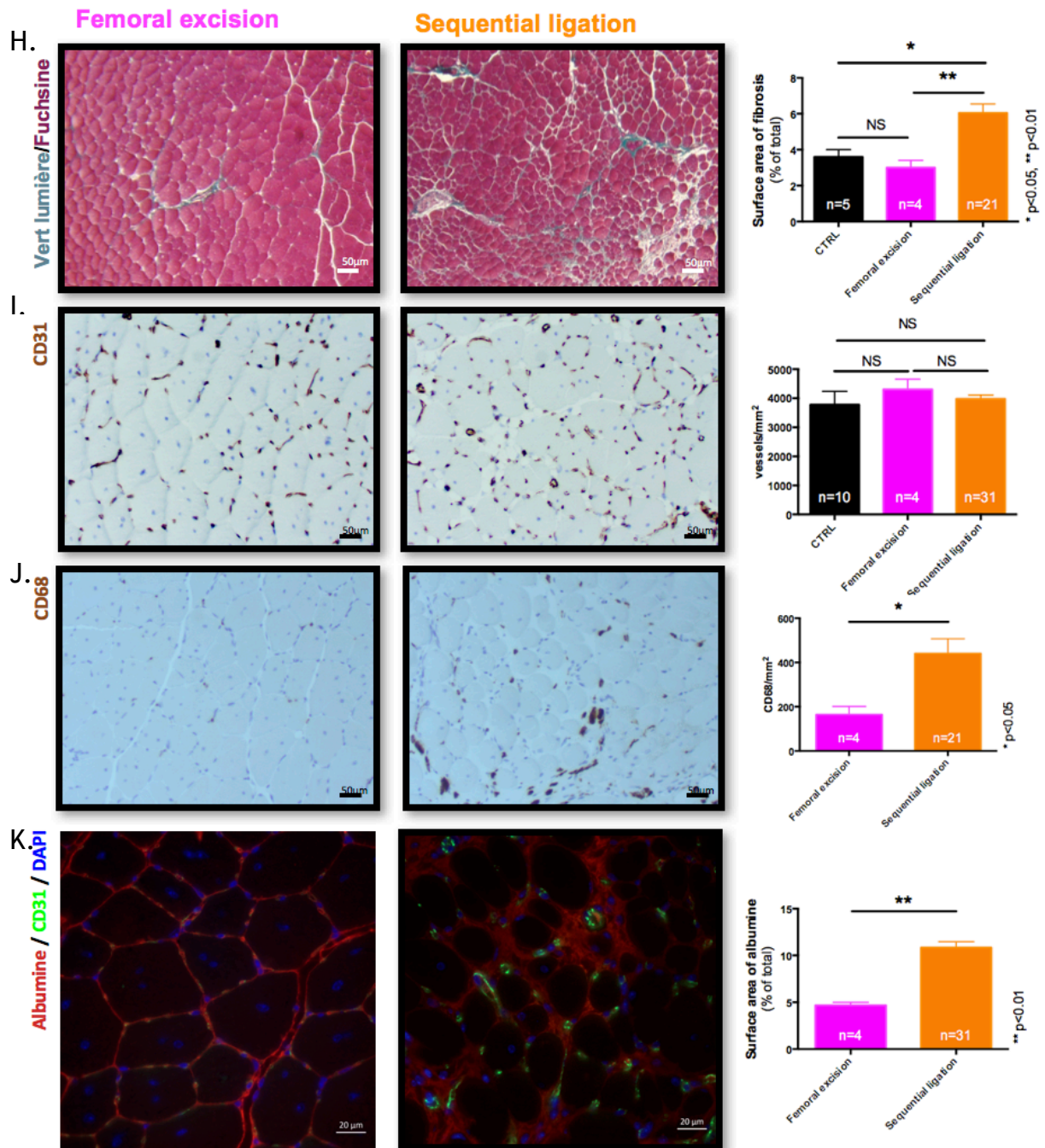


Figure 33. Mise en place d'un modèle expérimental d'ICC

H. Marquage en coloration trichrome de Masson (x260) et analyse quantitative des surfaces de fibrose marquées en vert lumière sur coupes au grossissement x20
 I. Immuno-marquage CD31 (x260) et analyse quantitative du nombre d'éléments CD31 positifs sur le même type de coupes
 J. Immuno-marquage CD68 (x260) et analyse quantitative du nombre d'éléments CD68 positifs sur le même type de coupes
 K. Immuno-marquage en fluorescence de l'Albumine (x400) et analyse quantitative des surfaces Albumine positives sur coupes au grossissement x20

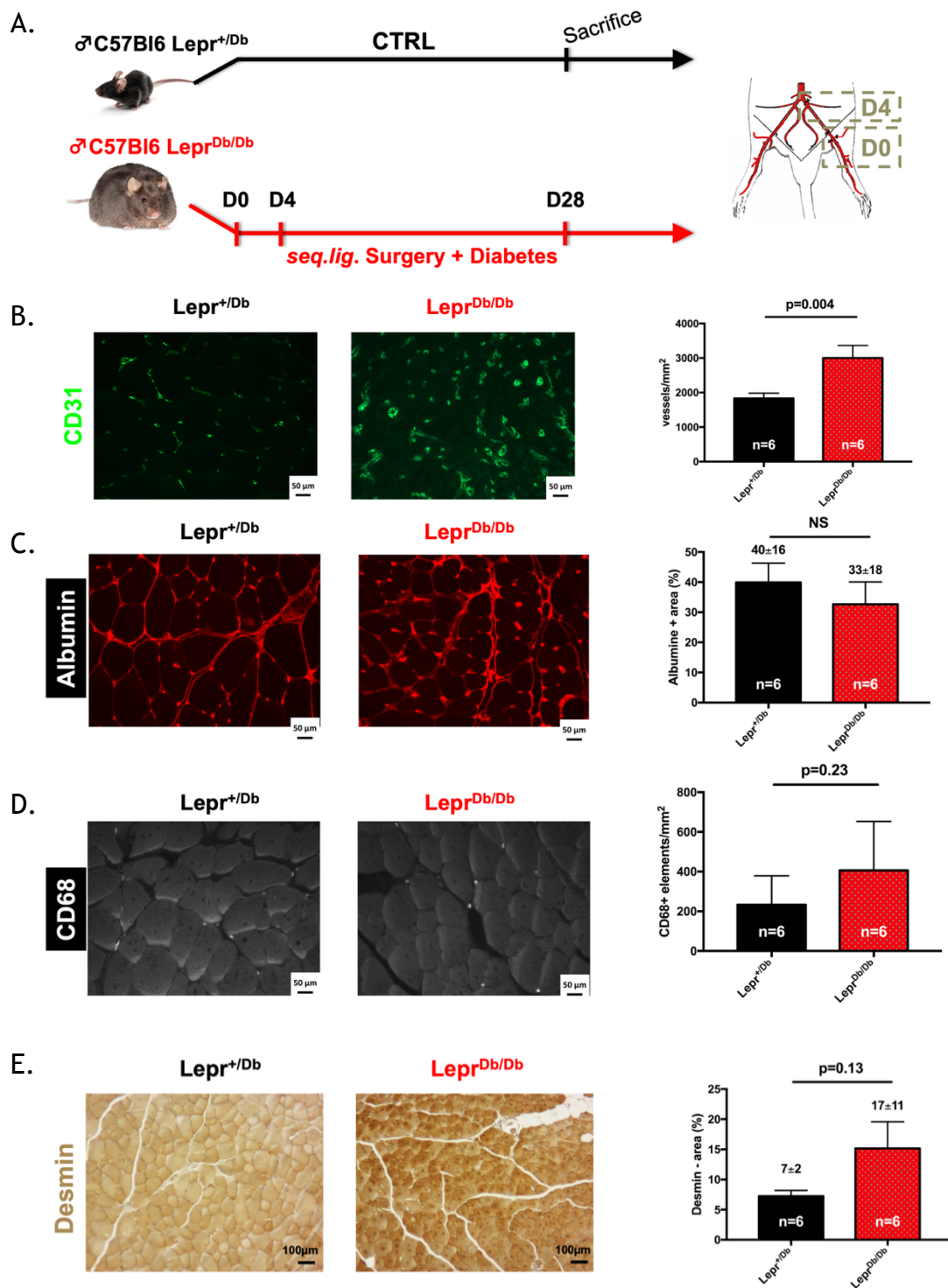


Figure 34. Les souris diabétiques $Lepr^{Db/Db}$ semblent partiellement protégées contre l'ischémie de patte

- A. Schéma expérimental. Les prélèvements de muscle tibial antérieur étaient réalisés à J28
 B. Immuno-marquage CD31 (x260) et analyse quantitative du nombre d'éléments CD31 positifs sur le même type de coupes
 C. Immuno-marquage en fluorescence de l'Albumine (x400) et analyse quantitative des surfaces Albumine positives sur coupes au grossissement x20
 D. Immuno-marquage CD68 (x260) et analyse quantitative du nombre d'éléments CD68 positifs sur le même type de coupes
 E. Immuno-marquage Desmine (x260)

Nous nous sommes alors orientés vers un autre modèle murin de diabète, obtenu par injection IP de STZ, sur lequel le modèle de ligature exérèse fonctionnait déjà dans le laboratoire.

Nous avons tout d'abord caractérisé la présence de complications du diabète chez ces souris 12 semaines après induction de ce dernier et notamment la présence d'une atteinte neuropathique. Les souris étaient sacrifiées à J14 ou à J28 afin d'observer le phénotype (**Figure 10A**). Les tests comportementaux permettaient de retrouver une allodynie significative au monofilament de Von Frey (**Tableau 4, Figure 35B**) ainsi qu'une anesthésie thermo-algique au « Plantar test » (3.7 ± 0.2 dans le groupe contrôle vs 5.5 ± 0.3 s de latence de réponse plantaire dans le groupe STZ; $p < 0.0001$) (**Figure 35C**), mais aussi à l'EMG montrant une atteinte à la fois motrice (vitesse de conduction nerveuse motrice [MNCV] de 43.6 ± 1.7 vs 35.5 ± 1.7 ms; $p = 0.0005$) et sensitive (vitesse de conduction nerveuse sensitive [SNCV] de 18.1 ± 1.0 vs 20.9 ± 0.8 ms; $p = 0.05$) (**Figure 35D**).

	CTRL	Diabetic	p
0,16	1	1	0.9
0,4	2	3	0.002
0,6	2	4	0.001
1	3	5	0.005
1,4	4	5	0.0003
2	6	7	0.2

Tableau 5. Résultats du test au monofilament de Von Frey

Il n'existait pas de différence significative en termes de score de nécrose entre les deux groupes (**Figure 36C**). La coloration Hémalum-Eosine (**Figure 36B**) et le marquage Desmine (**Figure 36D**) permettaient d'observer un « phénotype myopathique » moins marqué dans le groupe contrôle post ligature séquentielle comparé au groupe diabétique, avec un volume musculaire (MTA) significativement plus élevé dans le groupe contrôle (2677834 ± 201725 vs 2078196 ± 157794 unités arbitraires ; $p = 0.005$) (**Figure 36F**) et une surface de fibrose (vert lumière) significativement inférieure (5.9 ± 0.4 vs $15.7 \pm 1.7\%$; $p < 0.0001$) (**Figure 36E**). Par ailleurs, la prolifération cellulaire était significativement plus faible dans le groupe

contrôle post ligature séquentielle comparé au groupe diabétique (5.7 ± 1.3 vs 70.8 ± 22.8 cellules BrDU+/mm²; $p=0.02$) (**Figure 36G**).

Aucune différence significative de nombre d'éléments CD31 positifs n'était retrouvée entre le MTA non ischémié contrôle vs diabétique (3077 ± 741 vs 3606 ± 377 vaisseaux/mm²; NS) et entre le MTA post ligature séquentielle contrôle vs diabétique à J28 (3737 ± 170 vs 3439 ± 159 vaisseaux/mm²; NS) (**Figure 36H**). Cependant, un défaut de perfusion significatif était mis en évidence à J28 entre le groupe contrôle post ligature séquentielle et le groupe diabétique (ratio patte ischémiée/contrôle de 0.61 ± 0.07 vs 0.38 ± 0.06 ; $p < 0.0001$) (**Figure 36A**). Ceci était confirmé par le marquage Lectine BS1 qui montrait un nombre de vaisseaux perfusés significativement plus élevé dans le groupe contrôle post ligature séquentielle comparé au groupe diabétique (1470 ± 91 vs 1182 ± 60 vaisseaux/mm²; $p=0.02$) (**Figure 36I**).

Il y avait significativement moins d'infiltration de monocytes/macrophages dans le MTA contrôle post ligature séquentielle comparé au groupe diabétique (322 ± 70 vs 541 ± 109 éléments CD68+/mm²; $p=0.001$) (**Figure 36J**). De plus, il y avait significativement moins d'œdème interstitiel dans le MTA contrôle post ligature séquentielle comparé au groupe diabétique (10.8 ± 0.6 vs $13.5 \pm 1.2\%$ de surface Albumine+; $p=0.03$) (**Figure 36K**). L'étude de la participation du système lymphatique dans cet œdème interstitiel a révélé la présence d'un nombre de vaisseaux lymphatiques significativement inférieur dans le groupe contrôle post ligature séquentielle comparé au groupe diabétique (57 ± 4 vs 70 ± 6 éléments Lyve-1+/mm²; $p=0.04$) (**Figure 36L**). Ceci était confirmé en qPCR avec une augmentation significative d'un marqueur de lymphangiogenèse dans le groupe diabétique (niveau d'expression relative d'ARNm de Prox1 de 28.1 ± 5.0 vs 52.2 ± 9.0 ; $p=0.03$) (**Figure 36M**) (Wigle et Oliver 1999).

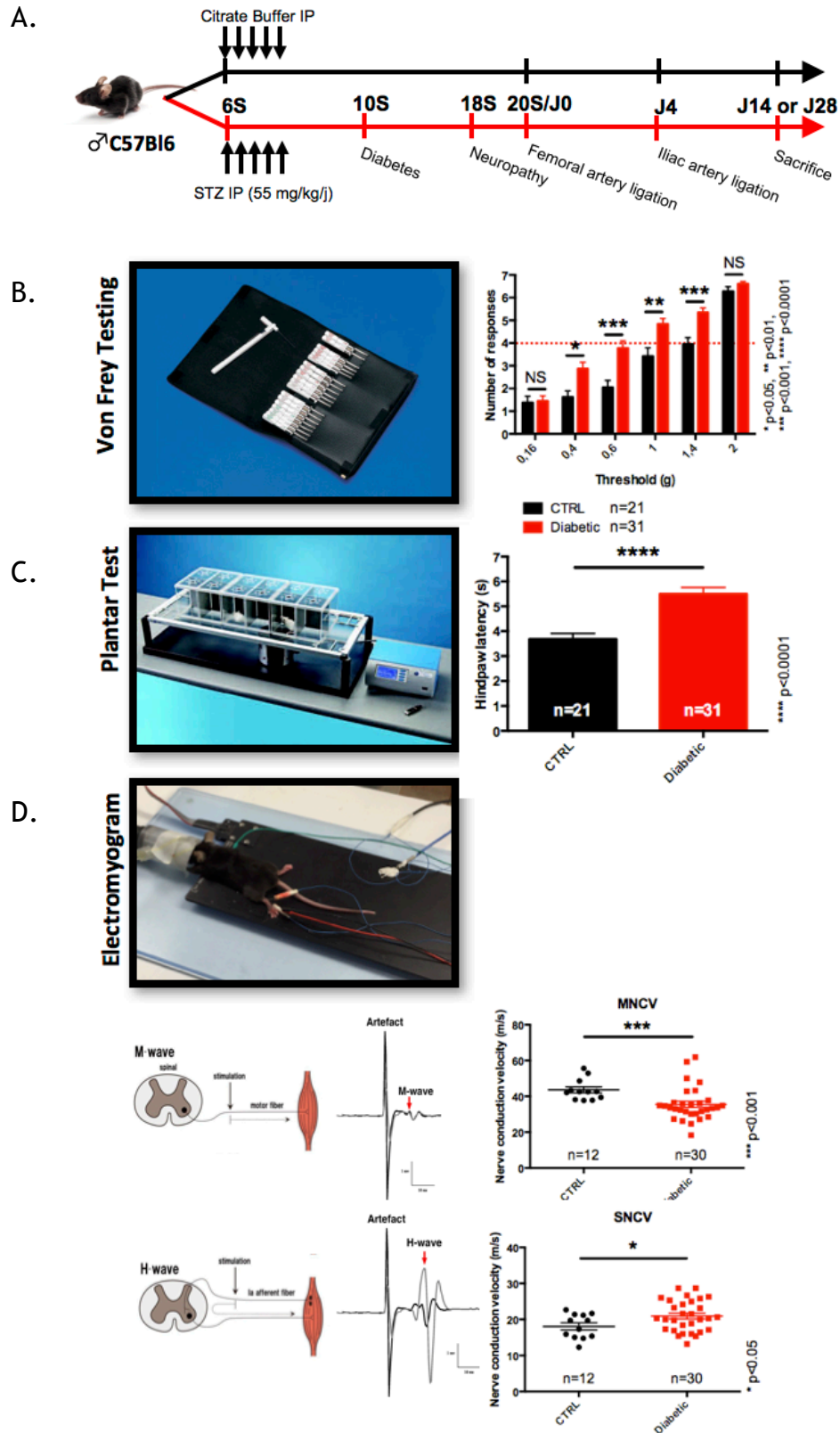


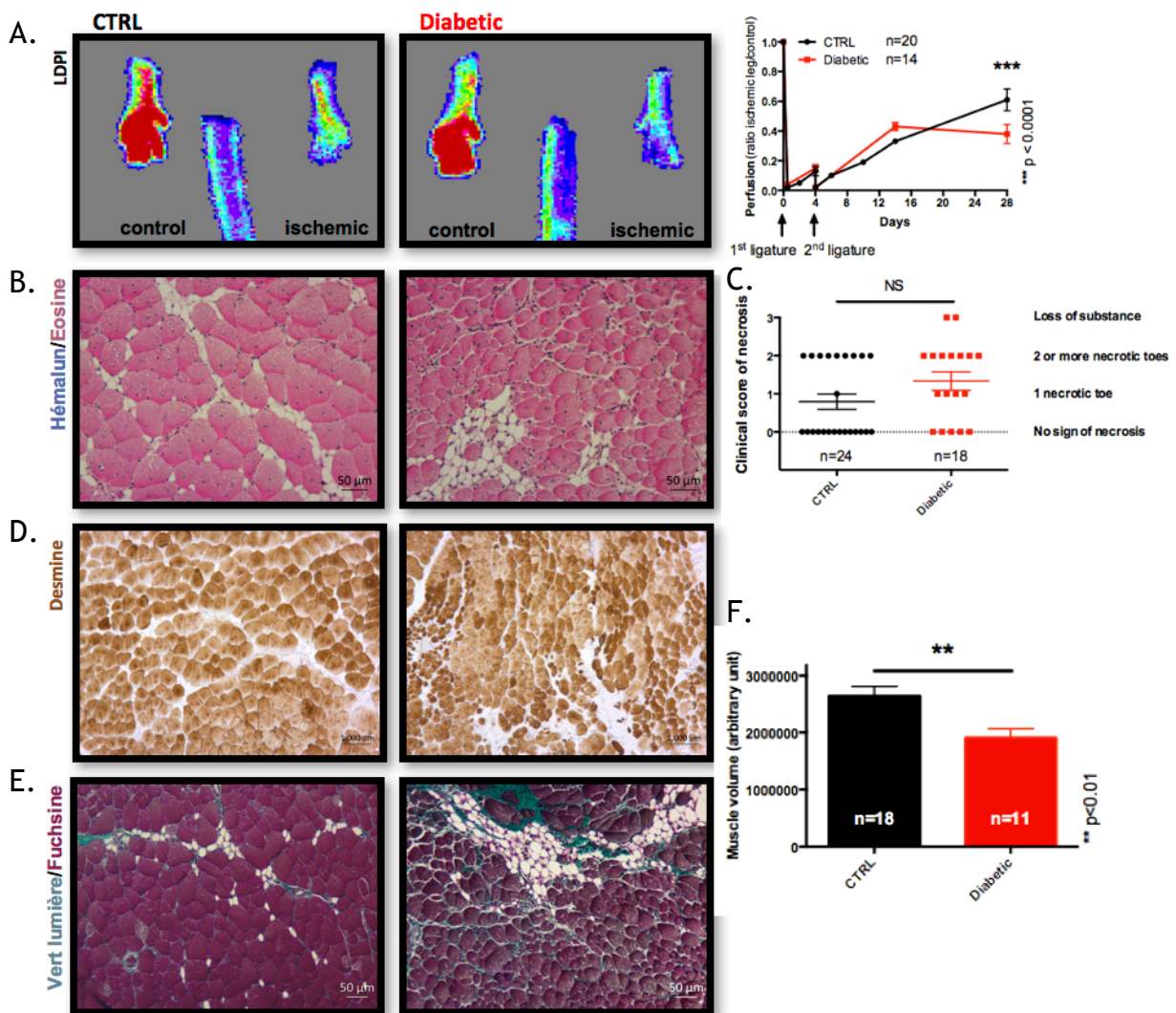
Figure 35. Tests comportementaux dans un modèle expérimental murin de diabète et d'ICC se rapprochant du phénotype humain

A. Schéma expérimental présentant un bras contrôlé et un bras diabétique avec réalisation d'une ligature séquentielle dans les deux groupes

B. Test comportemental d'évaluation de la neuropathie au monofilament de Von Frey et analyse quantitative du nombre de réponses (seuil d'allodynie à 4/7 réponses positives en rouge) chez les souris contrôles (n=21) et diabétiques (n=31) âgées de 18 semaines

C. Test comportemental d'évaluation de la neuropathie par « plantar test » et analyse quantitative du temps de latence de réponse plantaire chez les souris contrôles (n=21) et diabétiques (n=31) âgées de 18 semaines

D. Electromyogramme illustrant l'installation des souris sur la plateforme de test. Les vitesses de conduction nerveuse motrices (MNCV) et sensibles (SNCV) étaient analysées pour les souris contrôles (n=12) et les souris diabétiques (n=30). L'onde M correspond au potentiel de dépolarisation motrice récupéré par l'appareil, il apparaît derrière un artéfact correspondant au potentiel de stimulation envoyé par l'appareil pour déclencher la réponse motrice. L'onde H correspond au potentiel de dépolarisation sensitive récupéré par l'appareil, il apparaît derrière un artéfact correspondant au potentiel de stimulation envoyé par l'appareil pour déclencher la réponse sensitive.



A. Images en « laser doppler perfusion imaging » des plantes de pattes postérieures et mesure quantitative de la récupération du flux sanguin dans le groupe contrôle (n=20) et diabétique (n=14) après ligature séquentielle

C. Score de nécrose clinique dans le groupe contrôle (n=24) et diabétique (n=18)

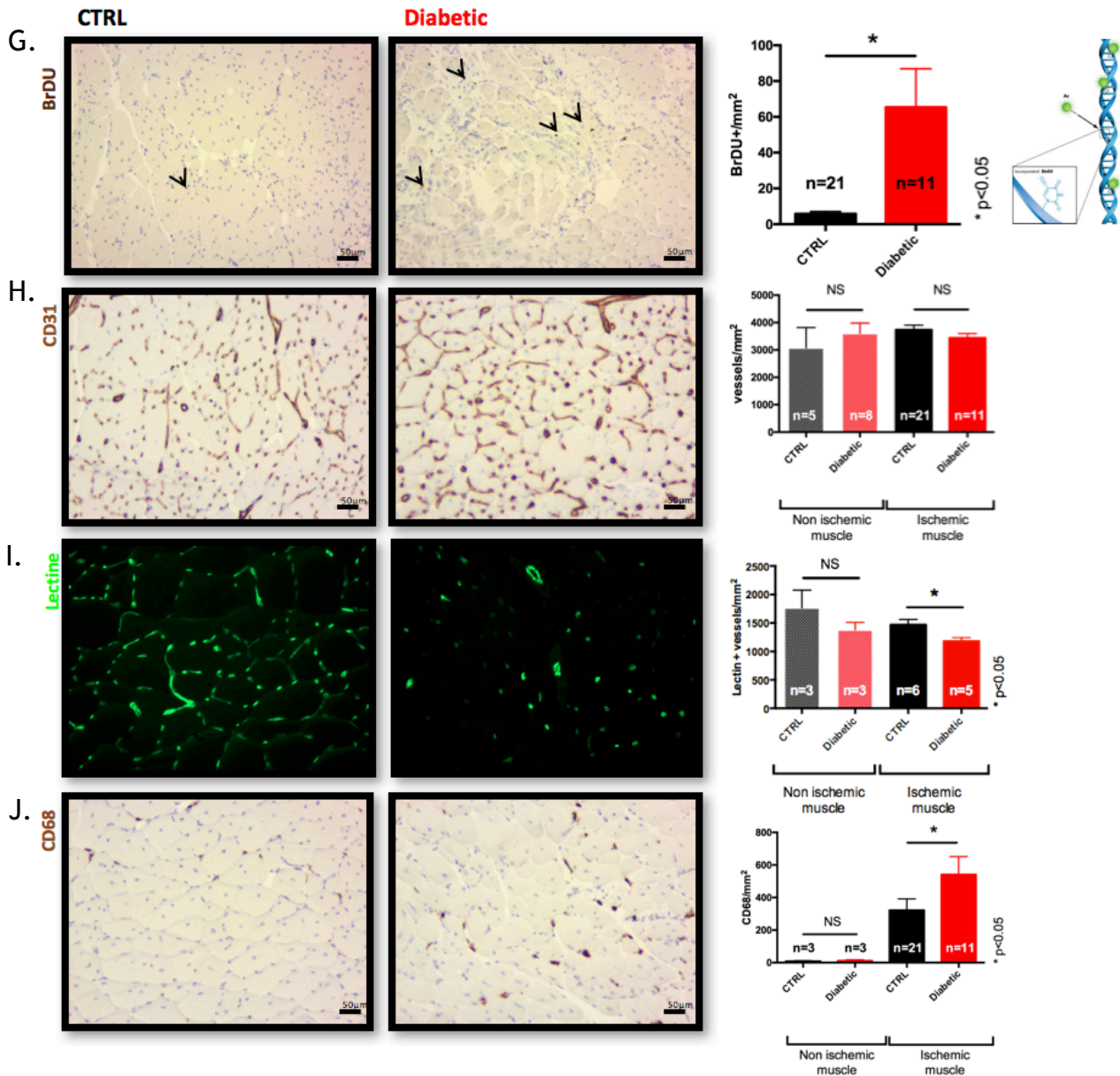
Les prélèvements de muscle tibial antérieur (MTA) étaient réalisés à J28

B. Marquage en coloration Hémalum-éosine (x260)

D. Immuno-marquage Desmine (x260)

E. Marquage en coloration trichrome de Masson (x260) et analyse quantitative des surfaces de fibrose marquées en vert lumière sur coupes au grossissement x20

F. Volume du MTA ischémique chez les souris contrôles (n=18) et diabétique (n=11)

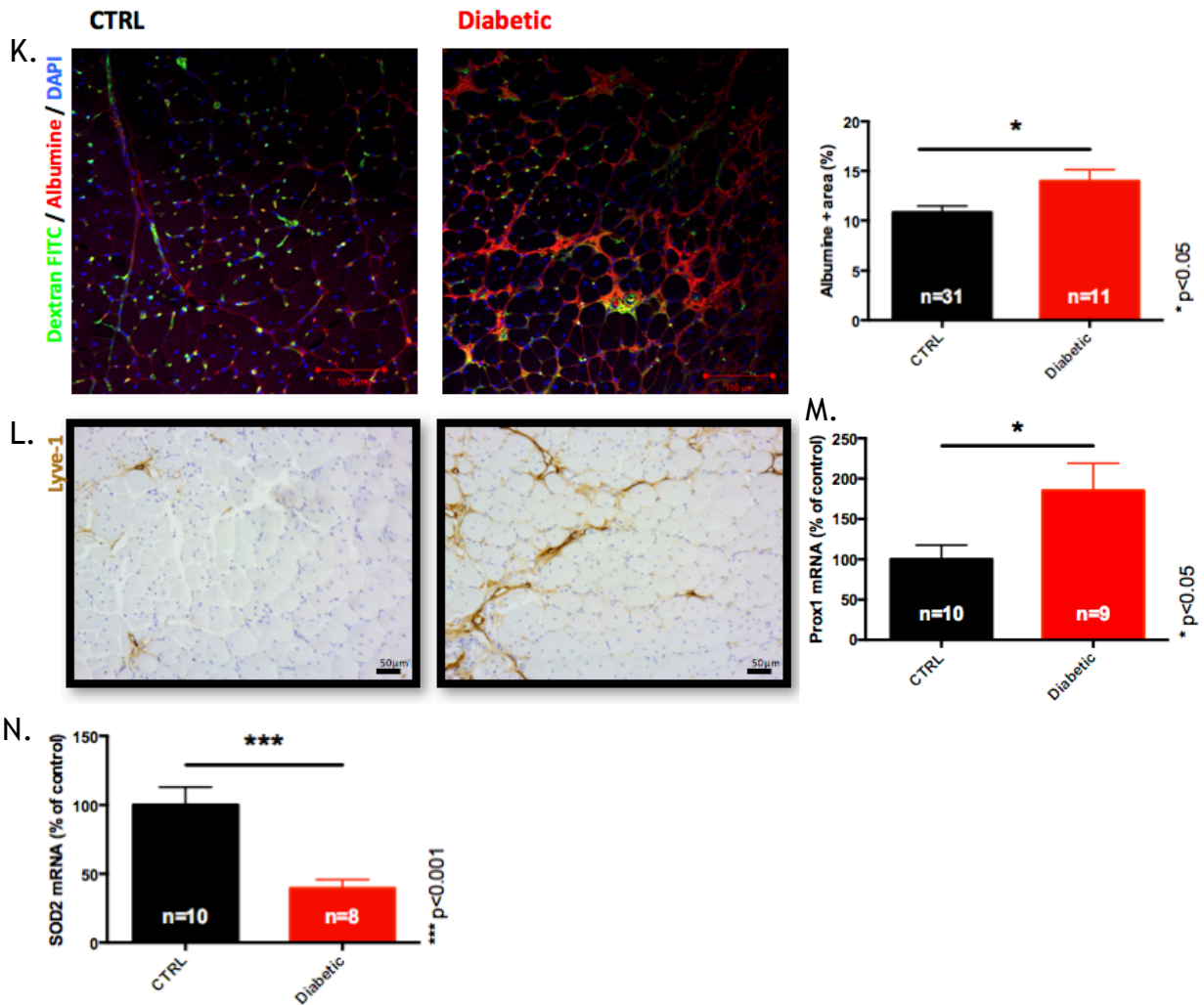


G. Immuno-marquage BrDU (x260) et analyse quantitative du nombre d'éléments BrDU positifs sur le même type de coupes (les flèches noires montrent certaines cellules BrDU positives)

H. Immuno-marquage CD31 (x260) et analyse quantitative du nombre d'éléments CD31 positifs sur le même type de coupes.

I. Marquage en fluorescence de la Lectine (x260) pour étude de la perfusion de ces vaisseaux avec analyse quantitative du nombre d'éléments Lectine positifs sur le même type de coupes

J. Immuno-marquage CD68 (x260) et analyse quantitative du nombre d'éléments CD68 positifs sur le même type de coupes sur muscle sain (non ischémié) et sur muscle après ligature séquentielle



K. Immuno-marquage en fluorescence de l'Albumine (x160) et analyse quantitative des surfaces Albumine positives sur coupes au grossissement x20
 L. Immuno-marquage Lyve-1 (x260)
 M. Analyse quantitative en qPCR de l'expression relative de l'ARNm de Prox1 dans le groupe contrôle (n=10) et le groupe diabétique (n=9)
 N. Analyse quantitative en qPCR de l'expression relative de l'ARNm de la superoxyde dismutase (SOD)2 dans le groupe contrôle (n=10) et le groupe diabétique (n=8)

Figure 36. Mise en place d'un modèle expérimental murin de diabète et d'ICC se rapprochant du phénotype humain

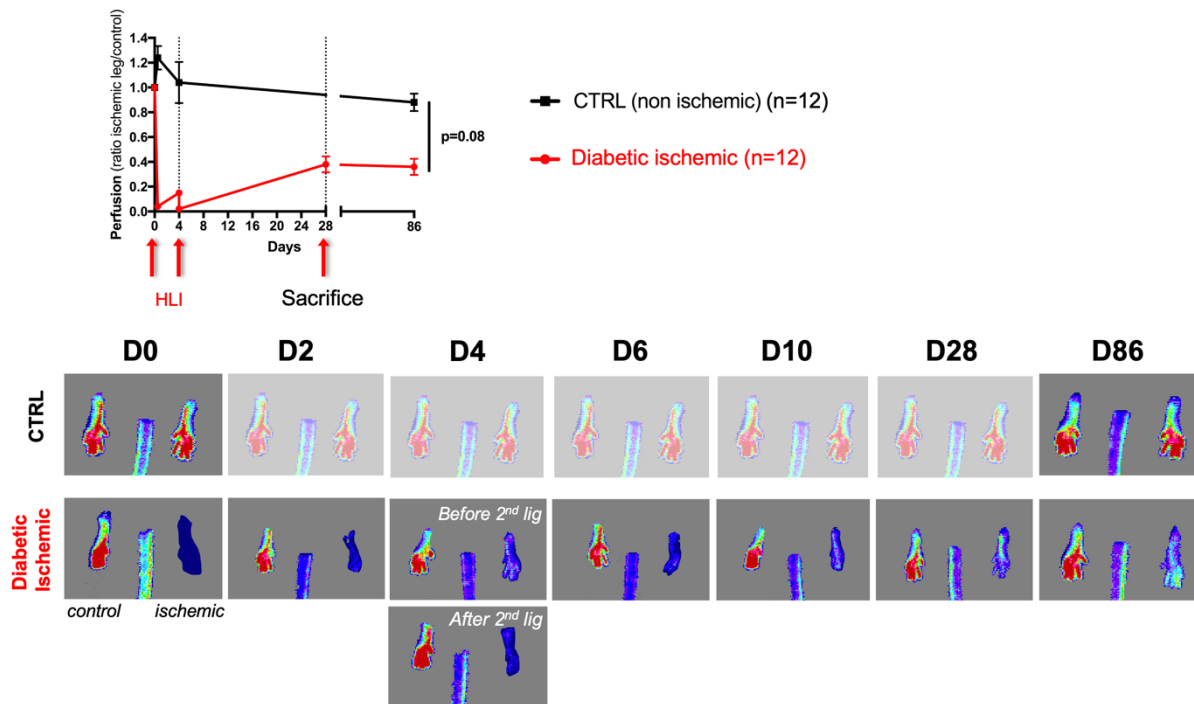


Figure 37. Confirmation de la pérennité de l'ICC dans le modèle expérimental murin de diabète et ligature séquentielle

Par ailleurs, l'augmentation du stress oxydatif dans le groupe diabétique post-ligature séquentielle était traduite par une augmentation du nombre d'éléments NF- κ B positifs au niveau des CE des aortes « en Face ». Ceci était confirmé en qPCR avec une diminution des capacités anti-oxydantes en lien avec une diminution significative du niveau d'expression d'une des principales enzymes impliquées dans la détoxification des ROS au niveau du MTA diabétique post ligature séquentielle (niveau d'expression relative d'ARNm de SOD2 (superoxide dismutase) de 69971.9 ± 9037.5 vs 25281.7 ± 3352.5 ; $p=0.0005$) (Figure 36N).

Enfin nous avons confirmé la stabilité du modèle en poursuivant son étude jusqu'à J86 (Figure 37), démontrant ainsi la persistance d'un déficit perfusionnel à long terme.

Résumé des principaux résultats

Choix du modèle murin de ligature séquentielle (vs ligature exérèse) et de diabète par injection de STZ (vs Lepr^{Db/Db}) permettant de se rapprocher du phénotype humain :

- Pas de différence de densité capillaire
- Mais nombre de vaisseaux perfusés significativement plus faible (vs groupe contrôle)
- Défaut de perfusion significatif avec stabilité du modèle jusqu'à J86
- « phénotype myopathique » avec fibrose, infiltration de monocytes/macrophages, œdème interstitiel
- Augmentation de la prolifération cellulaire
- Augmentation du nombre de vaisseaux lymphatiques et d'un marqueur de lymphangiogenèse

3. Discussion

Dans les modèle animaux, l'ischémie est généralement induite par une ligature chirurgicale ou l'exérèse d'un ou de plusieurs axes artériels principaux vascularisant la patte postérieure. Ceci induit une ischémie aiguë, dont la sévérité dépend à la fois de l'espèce mais aussi de l'emplacement et du type de ligature. Il est important de noter que l'étendue de l'ischémie musculaire diffère également sensiblement entre les souches de souris (Scholz et al. 2002)(Helisch et al. 2006). C'est pourquoi le modèle de ligature séquentielle sur les souris de souche C57BL/6 semblait plus pertinent pour obtenir le phénotype recherché que le modèle de ligature exérèse habituellement réalisé dans le laboratoire (Lotfi et al. 2013)(Hellingman et al. 2010), ce que nous avons pu confirmer lors de la comparaison préliminaire des deux modèles avec la mise en évidence du phénotype myopathique recherché.

Notre intérêt s'est ensuite plus particulièrement porté sur l'étude de ce modèle dans le cadre de la pathologie diabétique. En effet, il a été démontré dans un modèle de simulation informatique hémodynamique avec calcul de surface perfusée chez le rat « Zucker Diabetic Fatty » (ZDF) (modèle de diabète de type 2) que le réseau capillaire y est plus sensible aux changements de résistance des artérioles d'amont (Benedict et al. 2011). En conditions physiologiques, les ramifications micro-vasculaires fournissent de nombreuses voies parallèles entre les entrées artériolaires et les sorties veineuses et permettent ainsi de diminuer les résistances du réseau capillaire. Cependant, une diminution significative de 37% des ramifications micro-

vasculaires était observée histologiquement, entraînant une diminution significative de 44% du flux capillaire dans le muscle, suggérant ainsi que les capacités d'adaptation du réseau capillaire des sujets diabétiques en cas de constriction des artérioles d'amont ou d'obstruction capillaire sont diminuées. Par conséquent, même un changement minime de densité capillaire mesuré en coupe transversale, pourrait être responsable d'effets significatifs sur le flux sanguin et les résistances. Les réseaux capillaires les plus sensibles semblaient être dépourvus de vaisseaux collatéraux dans des localisations clés isolant ainsi de grandes parties du réseau capillaire en cas d'obstruction en amont. Une autre équipe a pu démontrer que les rats Goto-Kakizaki (autre modèle de diabète de type 2) présentent une réduction de la perfusion capillaire dans le muscle squelettique même au repos (66% vs 93% dans les contrôles)(Padilla et al. 2006). Ainsi, en cas de lésion athéromateuse entraînant une réduction du calibre de l'artère iliaque ou de l'artère fémorale, l'ischémie sera probablement plus sévère que chez des sujets sains. Par ailleurs, la vitesse des globules rouges était aussi diminuée, réduisant considérablement les capacités d'apport en O₂ au muscle squelettique et générant un environnement local ne favorisant pas une réponse cellulaire appropriée en cas d'ischémie. Ainsi, une équipe a observé que des souris diabétiques soumises à 1h d'exercice physique (course) présentent une réponse angiogénique diminuée (ARNm de VEGFA et VEGFR2)(Kivelä et al. 2008).

Notre modèle murin d'ICC et de diabète a permis de mettre en évidence la présence d'un « phénotype myopathique » marqué avec une altération de la qualité de réparation musculaire sans ralentissement de l'angiogenèse (**Tableau 6**). Ceci était associé à un état inflammatoire chronique et une augmentation de l'œdème interstitiel malgré une lymphangiogenèse augmentée. De plus, nous révélons une **microangiopathie claire associée à l'ischémie**, caractérisée par une perméabilité capillaire accrue couplée à une inflammation musculaire, reflétant l'activation des CE. Surtout, cette microangiopathie se retrouve systématiquement dans notre modèle murin et est associée à des niveaux significativement accrus de VCAM-1 et d'ICAM-1 au niveau de l'endothélium, ainsi qu'à une diminution des propriétés antioxydantes. **De plus, ce modèle de ligature séquentielle permet également**

d'obtenir une fenêtre thérapeutique satisfaisante pour l'étude de nouveaux traitements.

Homme	Modèle murin de ligature séquentielle	Modèle murin de ligature exérèse
Défaut de réparation musculaire	Défaut de réparation musculaire	Réparation musculaire complète à J28
Absence de \ de densité capillaire (densité capillaire équivalente à celle d'un M. sain)	Absence de \ de densité capillaire (densité capillaire équivalente à celle d'un M. sain)	Absence de \ de densité capillaire (densité capillaire équivalente à celle d'un M. sain)
Etat inflammatoire	Etat inflammatoire	Absence d'inflammation à J28
Œdème interstitiel	Œdème interstitiel	Absence d'œdème interstitiel à J28

Tableau 6. Résumé des principales caractéristiques des modèles d'ischémie

Cependant, il n'existait pas de différence significative en terme de score de nécrose entre les groupes. Ceci peut s'expliquer, d'une part par la moindre sensibilité à l'ischémie des souris de souche C57BL/6, laissant supposer qu'une différence aurait peut-être pu être observée sur une souche plus sensible à l'ischémie comme la souche BALB/c (Scholz et al. 2002)(Helisch et al. 2006). Par ailleurs, le système de graduation clinique de l'ischémie utilisé est un système validé dans des modèles d'ischémie plus aiguë et n'est pas sensible à l'apparition de lésions sur le cou-de-pied par exemple, alors que plusieurs souris du groupe ligature séquentielle présentaient ce type de lésion.

Les résultats sont décrits en détails et discutés dans le manuscrit intitulé « Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults » et publié dans Circulation Research

IV. Test du potentiel thérapeutique d'un agoniste de la voie Hh améliorant l'intégrité de l'endothélium : le SAG

1. Rationnel de l'étude

Afin de vérifier la participation d'une dysfonction endothéliale dans le phénotype observé chez l'homme et dans le modèle murin, il a été décidé de réaliser un test thérapeutique ciblant la dysfonction endothéliale dans ce même modèle.

Il a déjà été démontré que le SAG prévient la perturbation de la barrière hémato-encéphalique induite par un accident vasculaire cérébral (Chechneva et al. 2014a) ou une infection par le VIH (virus de l'immuno-déficience humaine)(V. B. Singh et al. 2016a), et notre équipe a démontré auparavant qu'il restaure l'expression de Cldn5 et prévient les fuites capillaires endoneuriales associées à la neuropathie chez les souris diabétiques (Chapouly et al. 2016b), c'est ainsi que nous nous sommes orientés vers l'utilisation du SAG dans ce modèle.

2. Résultats

Nous avons débuté par la caractérisation de la thérapie choisie dans un modèle murin d'angiogenèse de cornée afin de déterminer le caractère pro-angiogénique ou non de cette thérapie. Les souris étaient sacrifiées à J10 pour le prélèvement de cornées (**Figure 38A**). Le schéma expérimental consistait en la mise en place de « micropellets » de taille homogène contenant la thérapie SAG à tester (10ng/ μ L) (**Figure 38B**). Un contrôle négatif était représenté par l'implantation de « micropellets » contenant uniquement le polymère et le milieu de dilution de la thérapie et un contrôle positif était représenté par l'implantation de « micropellets » contenant du VEGF (100ng/mL); La surface de vaisseaux cornéens était significativement plus élevée dans le contrôle positif avec VEGF comparé au contrôle négatif et au SAG (201477 \pm 46721 vs 98511 \pm 10541 et 95093 \pm 7600 unités arbitraires; p= 0.003 et p = 0.001 respectivement) (**Figure 38C et D**).

Afin de déterminer si le SAG ciblait la dysfonction endothéliale, une étude des jonctions inter-cellulaires a été réalisée sur des HUVEC à confluence dans des plaques 12 puits. Trois types de puits étaient réalisés en triplicata. "Des puits contrôles contenant uniquement le milieu de culture standard pour CE, des puits Glucose contenant le milieu de culture plus du Glucose à la concentration de 4.5g/L, et des puits Glucose + SAG contenant le milieu de culture et le Glucose à 4.5g/L ainsi que la thérapie SAG (10ng/ μ L). Les cellules étaient fixées au Méthanol puis observées au microscope à 24h. Une altération majeure de l'intégrité des jonctions inter-cellulaires était visible en présence de Glucose en marquage VE-Cadh (jonctions adhérentes) et ZO-1 (jonctions serrées) et l'intégrité des jonctions était en partie

récupérée en présence de SAG (Figure 39A). L'altération de la fonctionnalité des jonctions inter-cellulaires a pu être objectivée en Western Blot, montrant une diminution significative de l'interaction VE-Cadh/ β -caténine en immunoprécipitation (IP) en présence de Glucose, malgré une quantité globale de VE-Cadh et de β -caténine conservée, avec une récupération de cette interaction en présence de SAG (Figure 39B).

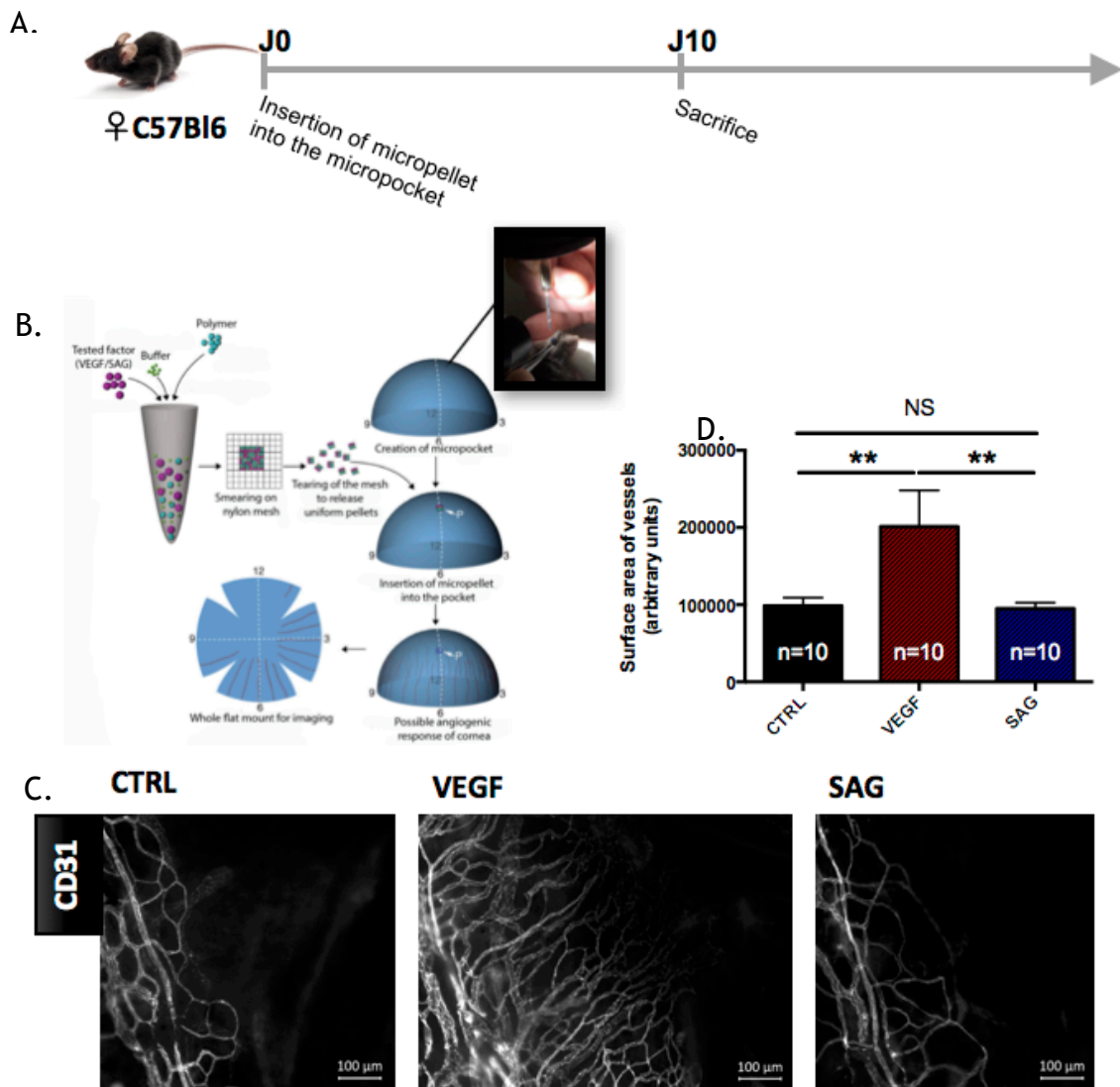
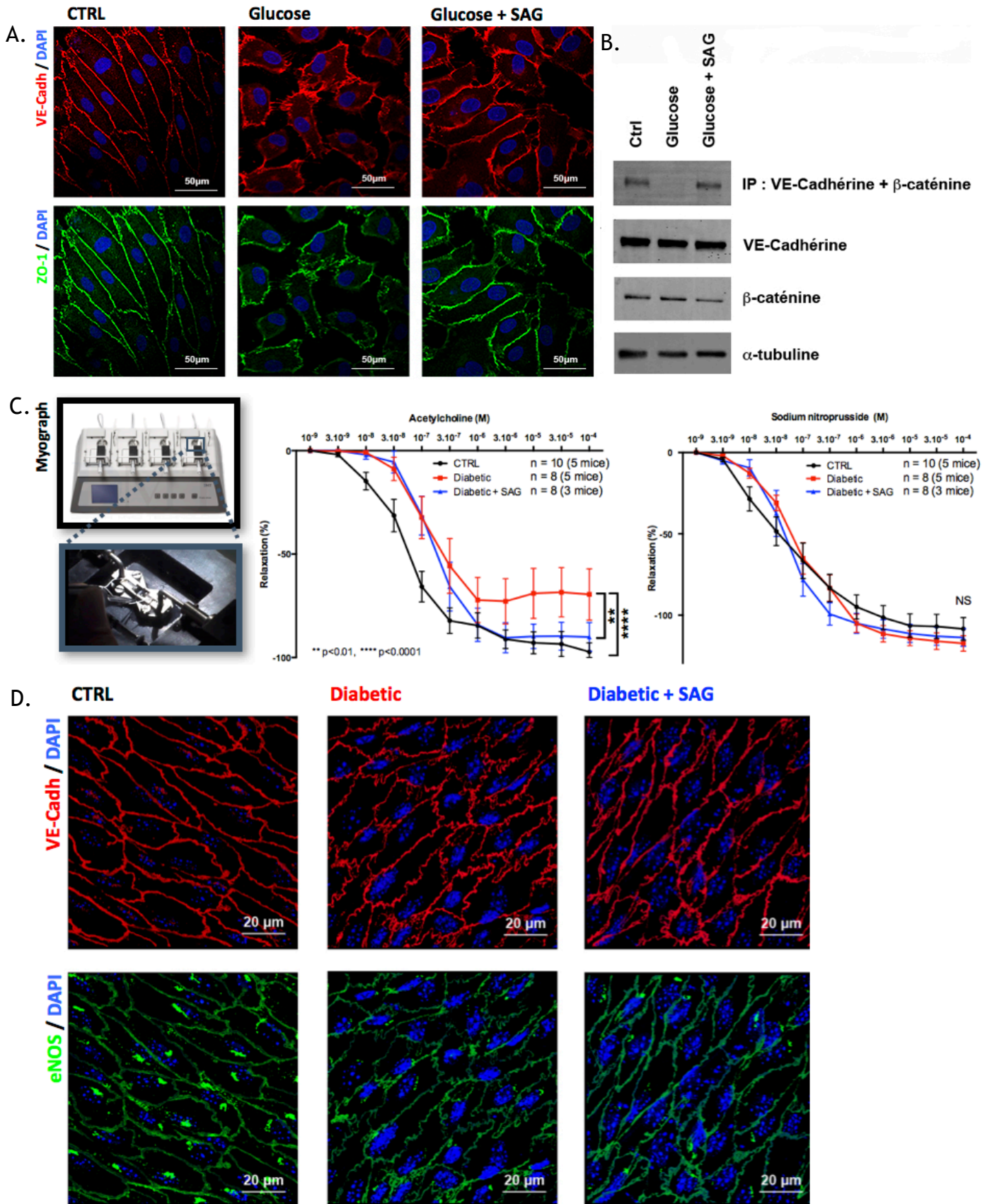


Figure 38. La thérapie SAG est non pro-angiogénique

- A. Schéma expérimental présentant un bras contrôle négatif, un bras contrôle positif (VEGF) et un bras test (SAG)
- B. Réalisation de « micropellets » cornéens homogènes sur un treillis en nylon avec un polymère (sucralfate et hydron), le milieu de dilution et la thérapie à tester, création de la micro-chambre au niveau de l'œil de la souris pour y placer le « micropellet », délai d'attente de 10j pour permettre une éventuelle réaction angiogénique puis prélèvement cornéen et montage de la cornée entière et à plat entre lame et lamelle
- C. Immuno-marquage en fluorescence du CD31
- D. Analyse quantitative de la surface de micro-vaisseaux cornéens (n=10 par groupe)

L'étude de la dysfonction endothéliale par tests de vasomotricité permettait de mettre en évidence une relaxation de l'endothélium ACh dépendante significativement altérée chez les souris diabétiques comparées au groupe contrôle ($p=0.002$) et le traitement par SAG permettait de normaliser cette altération en terme d'effet maximal de relaxation ($p=0.04$) mais avec une concentration efficace médiane (CE_{50}) d'ACh augmentée. Un test au sodium nitroprusside (SNP), qui est un donneur de NO, était ensuite réalisé afin de déterminer si la dysfonction était liée au déficit de sécrétion de NO par les CE ou à un défaut de réponse des CML au NO, et a permis de démontrer l'absence de différence significative de relaxation de l'endothélium au SNP entre les trois groupes (**Figure 39C**).

Par ailleurs, la dysfonction endothéliale chez les souris diabétiques se traduisait par une altération des jonctions adhérentes en immuno-marquage VE-Cadh au niveau des CE des aortes « en Face », avec l'apparition de boucles, suggérant une moins bonne performance de ces jonctions inter-cellulaires. Un potentiel effet restaurateur du SAG sur les jonctions entre les CE a été décelé, avec un phénotype intermédiaire entre les souris contrôles et les souris diabétiques (**Figure 39D et E**). De plus, la dysfonction endothéliale se traduisait par une diminution de la eNOS membranaire dans les souris diabétiques comparées aux souris contrôles, ce qui était confirmé par l'immuno-marquage de la phospho (P)-eNOS (forme activée)(Ritchie et al. 2010) qui était elle aussi diminuée chez les souris diabétiques comparées aux souris contrôles. Un potentiel effet restaurateur du SAG était là aussi décelé, avec un phénotype intermédiaire entre les souris contrôles et les souris diabétiques (**Figure 39D et E**).



E.

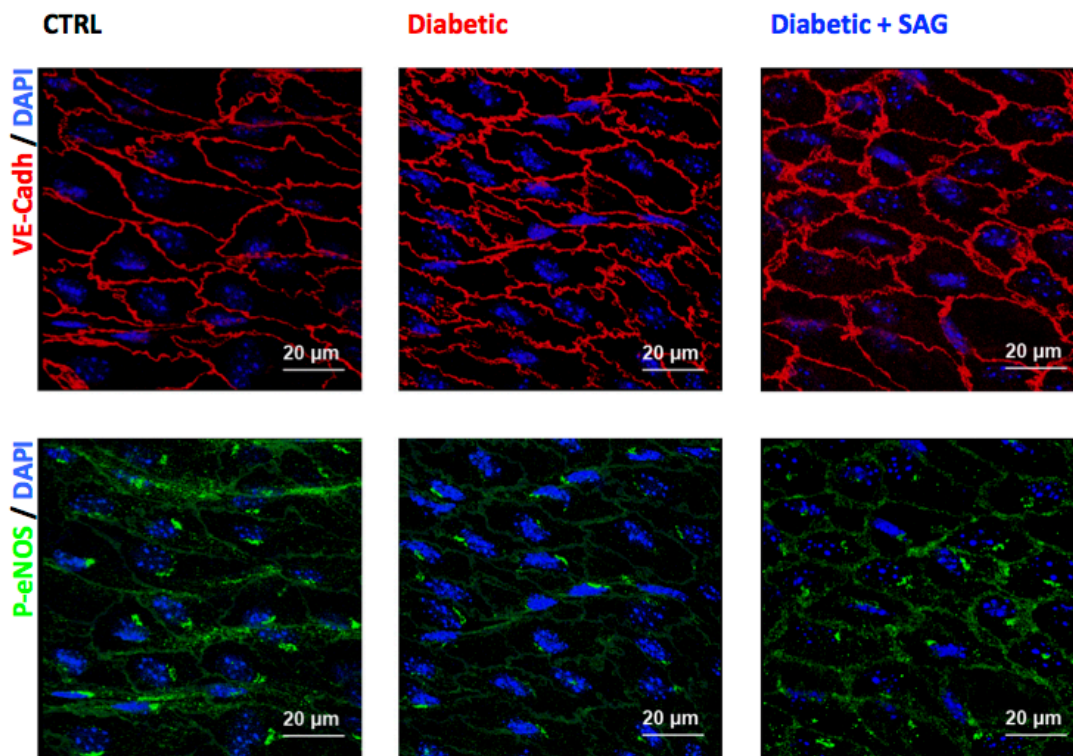


Figure 39. La thérapie SAG cible la dysfonction endothéliale

Expériences in vitro sur des cellules humaines endothéliales de veine ombilicale (HUVEC) (Lonza) à confluence (passage 3 à 5). Les HUVEC étaient cultivées dans des plaques 12 puits. Les cellules contrôles étaient incubées dans du milieu de croissance pour cellules endothéliales standard, les cellules Glucose étaient incubées avec un milieu enrichi en Glucose (4.5g/L) et les cellules Glucose + SAG étaient incubées avec du SAG (10ng/µL). Les cellules étaient observées à 24h post-stimulation.

A. Immuno-marquage « vascular endothelial » (VE)-Cadhérine et « zonula occludens » (ZO)-1

B. L'expression des protéines participant à la fonctionnalité des jonctions adhérentes était analysée par immunoprécipitation à partir des extraits cellulaires, suivie d'une analyse en Western Blot

C. Etude de la vasomotricité artérielle sur les artères fémorales de pattes contrôles des groupes contrôle (10 anneaux artériels sur 5 souris), diabétique (8 anneaux artériels sur 5 souris) et diabétique + SAG (8 anneaux artériels sur 3 souris). Après contraction maximale théorique par instillation de phényléphrine, analyse première de la relaxation artérielle à l'acétylcholine (ACh). Après nouvelle contraction par phényléphrine, analyse secondaire de la relaxation artérielle au sodium nitroprusside (SNP).

Les prélèvements d'aorte descendante « en Face » étaient réalisés à J28

D. Immuno-marquage en fluorescence de la « vascular endothelial » (VE)-cadhérine (Cadh) et de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) (x400) dans le groupe contrôle (n=21), le groupe diabétique (n=11) et le groupe diabétique + SAG (n=3) montrant sa présence à la fois dans l'appareil de Golgi, site de synthèse, et à la membrane cellulaire endothéliale (site d'activation)

E. Immuno-marquage en fluorescence de la VE-Cadh et de la phospho (P)-eNOS (x400) dans le groupe contrôle (n=21), le groupe diabétique (n=11) et le groupe diabétique + SAG (n=3)

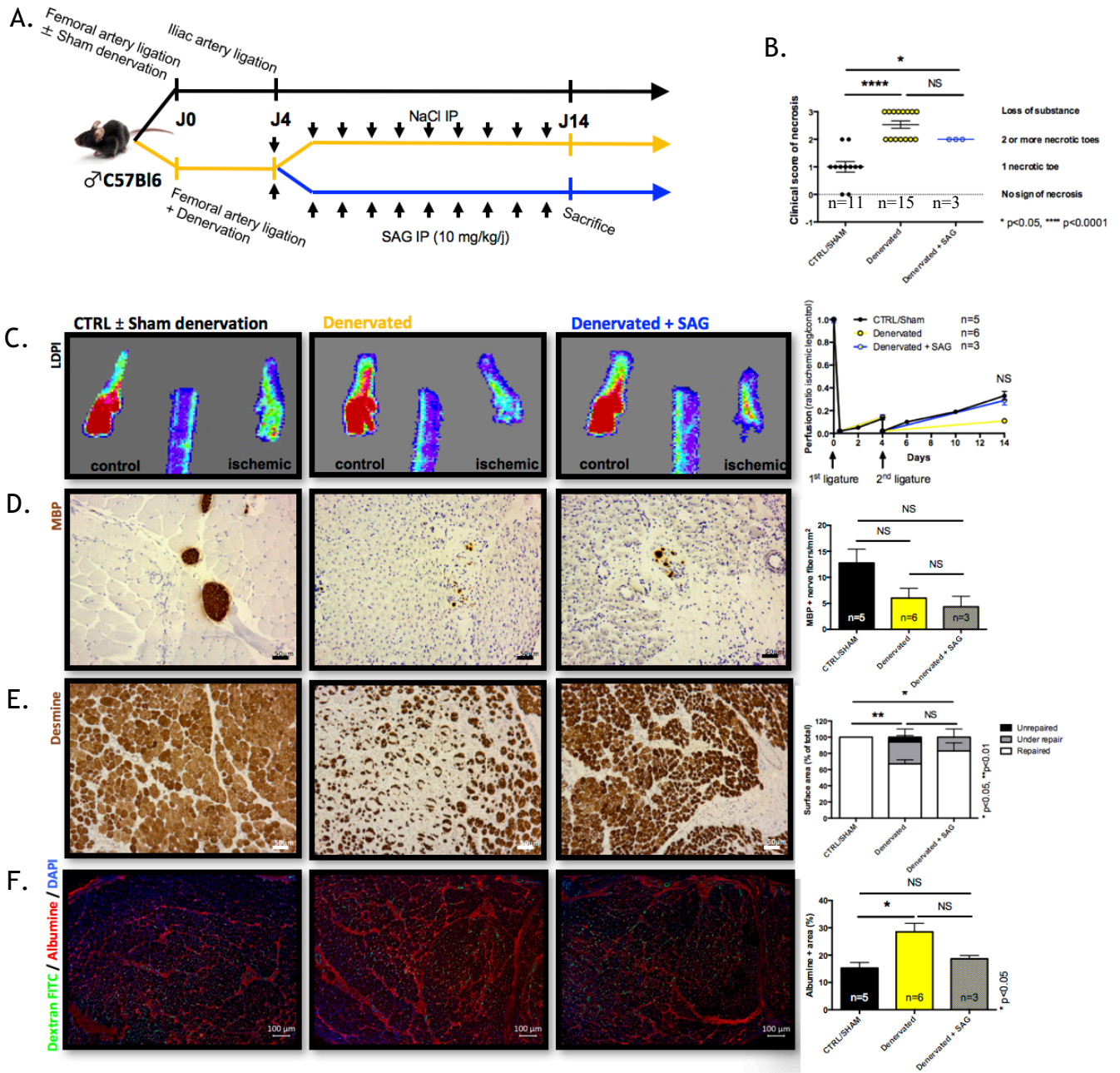


Figure 40. L'action de la thérapie SAG n'est pas dépendante du système nerveux périphérique

- A. Schéma expérimental présentant un bras contrôle et un bras dénervation sciatique, subissant tous deux une ligature séquentielle, à J4 le bras dénervation sciatique était à nouveau séparé en un bras dénervation sans thérapie et un bras avec thérapie SAG
- B. Score de nécrose clinique dans le groupe contrôle/Sham dénervé (n=11), le groupe dénervé (n=15) et le groupe dénervé + SAG (n=3)
- C. Images en « laser doppler perfusion imaging » des plantes de pattes postérieures et mesure quantitative de la récupération du flux sanguin après ligature séquentielle dans le groupe contrôle (n=5), le groupe dénervé (n=6) et le groupe dénervé + SAG (n=3)
 Les prélèvements de muscle tibial antérieur étaient réalisés à J28
- D. Immuno-marquage « myelin basic protein » (MBP) (x260) et analyse quantitative du nombre de fibres nerveuses MBP positives sur les mêmes types de coupe
- E. Immuno-marquage Desmine (x260) et analyse quantitative des aires de régénération musculaires sur des coupes au grossissement x20
- F. Immuno-marquage en fluorescence de l'Albumine (x160) et analyse quantitative des surfaces Albumine positives sur coupes au grossissement x20

Enfin, afin de déterminer si la thérapie SAG agissait directement sur les vaisseaux ou si elle passait par une action sur le système nerveux périphérique relarguant en réponse des facteurs pouvant eux agir sur les vaisseaux, un modèle de dénervation sciatique a été utilisé (Figure 40A). Il a permis de mettre en évidence des scores de nécrose significativement inférieurs en l'absence de dénervation (1.0 ± 0.2 vs 2.5 ± 0.1 ; $p < 0.0001$) sans amélioration significative en présence de SAG (2.0 ± 0.0) (Figure 40B). Il n'y avait pas de modification significative de la perfusion entre les trois groupes (Figure 40C). La démyélinisation d'aval était observée en immuno-marquage « myelin basic protein » (MBP) et ne semblait pas améliorée en présence de SAG (Figure 40D). La réparation musculaire était significativement plus avancée dans le groupe contrôle en comparaison au groupe dénervé ($p < 0.01$) et le SAG permettait d'améliorer partiellement ce déficit de régénération musculaire ($p = 0.03$ vs contrôle) (Figure 40E). Par ailleurs, l'œdème interstitiel était significativement moins important dans le groupe contrôle comparé au groupe dénervé (15.3 ± 2.2 vs $28.4 \pm 3.1\%$ de surface Albumine+; $p = 0.02$) et le SAG permettait de diminuer partiellement cet œdème ($18.9 \pm 1.1\%$ de surface Albumine+; NS vs contrôle) (Figure 40F).

Résumé des principaux résultats

- La thérapie SAG est non pro-angiogénique
- La thérapie SAG cible la dysfonction endothéliale
- L'action de la thérapie SAG n'est pas dépendante du système nerveux périphérique

3. Discussion

In vitro et dans ce modèle préclinique nous avons démontré que l'amélioration de la fonction des CE par un agoniste de la voie Hh est une stratégie efficace pour améliorer la perfusion et la réparation musculaire post-ischémique. En effet, nous soulignons que la thérapie SAG réussit à restreindre l'activation de la CE et les fuites vasculaires et restaure l'expression de SOD2. Cela conduit à une amélioration de la perfusion capillaire et à une meilleure organisation des myocytes, caractérisée par une plus faible expression de la desmine et de MyoG et une plus grande section transversale de myofibres. Cela corrobore les données de la littérature montrant que le niveau d'expression de la desmine, associé à une forme ronde de myofibres, est

inversement corrélé à la force musculaire du mollet chez les patients atteints d'AOMI (Koutakis, Miserlis, et al. 2015; Koutakis, Myers, et al. 2015).

Ainsi, le traitement par Dhh ou un agoniste de la voie Hh (le SAG) limite l'augmentation de perméabilité capillaire secondaire à l'augmentation de TNF- α et de l'expression de VCAM-1 induites par le glucose (Hong Yang et al. 2011; Caradu, Couffinhal, et al. 2018). **Dhh favorise l'interaction de la Cdh5 avec son partenaire la β -caténine et diminue l'expression de ICAM-1 et VCAM-1**; néanmoins, les effets de Dhh sont plus probablement indépendants des facteurs de transcription Gli puisque ni l'expression de Gli1 ni celle de Gli2 n'est modulée dans les CE de souris Dhh KO.

Étant donné que les agonistes du Dhh peuvent améliorer la fonction des CE dans des conditions de glucose ou d'inflammation élevées, nous avons émis l'hypothèse que **l'ICC est le résultat d'un dysfonctionnement des microvaisseaux, plutôt que d'une diminution de la densité capillaire** - une hypothèse qui a été confirmée par notre évaluation de biopsies musculaires de patients en ICC.

Ainsi, nous démontrons que l'ICC chez l'homme, condition pathologique souvent liée au diabète et à l'inflammation, est associée à un dysfonctionnement majeur des CE.

En recréant un modèle complexe d'ischémie critique des membres chez les souris diabétiques, nous avons constaté que **l'agoniste de la signalisation Dhh améliorerait significativement la fonction des CE sans favoriser l'angiogenèse, ce qui améliorerait par la suite la perfusion musculaire.**

La restauration de la fonction des CE conduit donc à une récupération significative dans un contexte d'ischémie critique de membre. Dhh semble être une cible thérapeutique prometteuse, en aval de Klf2, pour prévenir le dysfonctionnement endothélial impliqué dans les pathologies vasculaires ischémiques (**Figure 41**).

Les résultats sont décrits en détails et discutés dans le manuscrit intitulé « Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults » et publié dans Circulation Research

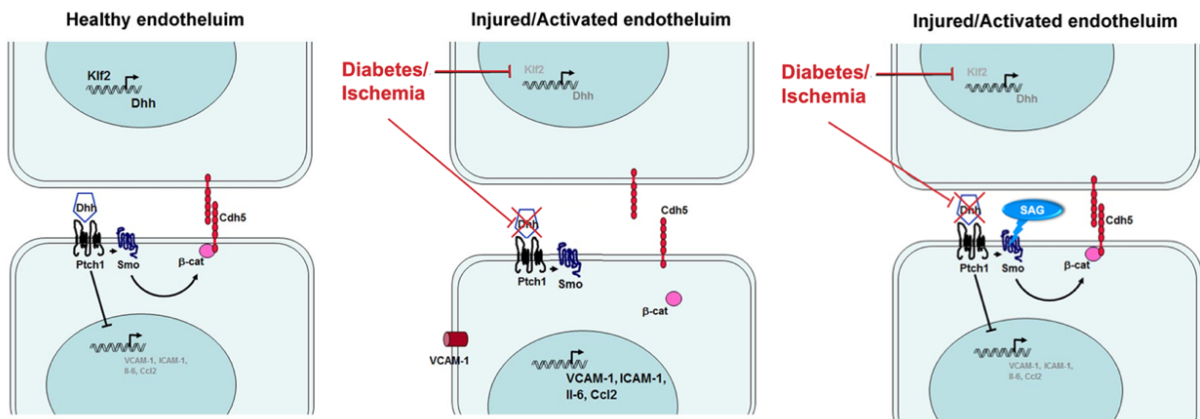


Figure 41. Schéma des principaux événements cellulaires impliqués dans le maintien de l'intégrité de l'endothélium par la signalisation Hh

V. Manuscripts

1. Sonic Hedgehog endogène limite l'inflammation et l'angiogénèse dans le muscle squelettique ischémique de souris



Cardiovascular Research (2018) 114, 759–770
European Society of Cardiology doi:10.1093/cvr/cvy017

Endogenous Sonic Hedgehog limits inflammation and angiogenesis in the ischaemic skeletal muscle of mice

Caroline Caradu, Alexandre Guy, Chloé James, Annabel Reynaud, Alain-Pierre Gadeau, and Marie-Ange Renault*

Biology of Cardiovascular Diseases, Univ. Bordeaux, Inserm, CHU de Bordeaux, F-33604 Pessac, France

Received 24 July 2017; revised 13 November 2017; editorial decision 17 January 2018; accepted 19 January 2018; online publish-ahead-of-print 22 January 2018

Time for primary review: 51 days

Aims

Hedgehog (Hh) signalling has been shown to be re-activated in ischaemic tissues and participate in ischaemia-induced angiogenesis. Sonic Hedgehog (Shh) is upregulated by more than 80-fold in the ischaemic skeletal muscle, however its specific role in ischaemia-induced angiogenesis has not yet been fully investigated. The purpose of the present study was to investigate the role of endogenous Shh in ischaemia-induced angiogenesis.

Methods and results

To this aim, we used inducible Shh knock-out (KO) mice and unexpectedly found that capillary density was significantly increased in re-generating muscle of Shh deficient mice 5 days after hind limb ischaemia was induced, demonstrating that endogenous Shh does not promote angiogenesis but more likely limits it. Myosin and MyoD expression were equivalent in Shh deficient mice and control mice, indicating that endogenous Shh is not required for ischaemia-induced myogenesis. Additionally, we observed a significant increase in macrophage infiltration in the ischaemic muscle of Shh deficient mice. Our data indicate that this was due to an increase in chemokine expression by myoblasts in the setting of impaired Hh signalling, using tissue specific Smoothed conditional KO mice. The increased macrophage infiltration in mice deficient for Hh signalling in myocytes was associated with increased VEGFA expression and a transiently increased angiogenesis, demonstrating that Shh limits inflammation and angiogenesis indirectly by signalling to myocytes.

Conclusion

Although ectopic administration of Shh has previously been shown to promote ischaemia-induced angiogenesis, the present study reveals that endogenous Shh does not promote ischaemia-induced angiogenesis. On the contrary, the absence of Shh leads to aberrant ischaemic tissue inflammation and a transiently increased angiogenesis.

Keywords

Ischaemia • Angiogenesis • Sonic Hedgehog • Macrophages • Endothelial cells

1. Introduction

Ischaemia, subsequent to artery obstruction in peripheral tissues, heart and brain, is responsible for half of the deaths in Europe and North America. Although recent progress in medical treatments has led to increased survival and quality of life for patients, results remain inconsistent especially in aged and diabetic patients. The concept that new blood vessels can be grown to enhance tissue perfusion is now achieving widespread acceptance.¹ To date several pro-angiogenic factors, including vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factors (FGFs), have been tested in human clinical trials as a complement or an alternative to surgical re-vascularization; however, their effects remain

limited.² Therefore, a better understanding of the underlying mechanisms involved in ischaemic muscle re-vascularization may help to optimize future clinical interventions.

Embryonic signalling pathways, including the Hedgehog (Hh) pathway, provide promising new targets for angiogenic therapies.^{3,4} Indeed, previous investigations have reported that inhibition of Hh protein activity, by neutralizing 5E1 anti-body administration, impairs ischaemia-induced angiogenesis both in the setting of hind limb ischaemia (HLI), and myocardial infarction, in mice.^{5,6} Conversely, when Sonic Hedgehog (Shh), one of the Hh ligands, was administered either as a re-combinant protein or via gene therapy, it promoted neovascularization of ischaemic tissues by promoting both angiogenesis⁷ and endothelial progenitor cell

* Corresponding author. Tel: +33 5 57 89 19 79; fax: +33 5 56 36 89 79, E-mail: marie-ange.renault@inserm.fr

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author(s) 2018. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

recruitment.⁸ Studies conducted to elucidate cellular mechanisms responsible for these findings have shown that Shh induces over-expression of several proangiogenic growth factors, including VEGFA and Angiopoietin-1, by fibroblasts and cardiomyocytes.^{7,8}

However, despite evidence for the *in vivo* effects of Hh signalling in adults, the molecular mechanisms by which endogenous Hh signalling contributes to ischaemia-induced angiogenesis have yet to be fully elucidated. For instance, since the 5E1 anti-body blocks activity of all three Hh ligands [Shh, Desert Hh (Dhh) and Indian Hh (Ihh)]⁹ the specific role of each Hh protein in the regulation of blood vessel homeostasis has not yet been established. We recently demonstrated that Dhh is necessary to drive angiogenesis in ischaemic skeletal muscle. Interestingly, investigation of its mechanism of action revealed that it does not modulate endothelial cell (EC) function directly; on the contrary, it promotes angiogenesis by maintaining peripheral nerve-derived angiogenic factors in the ischaemic muscle.¹⁰

The purpose of the present study was to investigate the specific role of endogenous Shh in ischaemia-induced angiogenesis. Among the three Hh ligands, Shh expression has previously been demonstrated to be the most up-regulated in the setting of ischaemia^{7,8,10}; with previous reports indicating that Shh is upregulated up to 80-fold in ischaemic skeletal muscle, 2 days after HLI is induced.¹⁰

2. Methods

2.1 Mice

Shh Floxed (Shh^{Flox}) mice,¹¹ Smo Floxed (Smo^{Flox}) mice,¹² Rosa26^{mTmG} mice,¹³ HSA-Cre^{ERT2} mice,¹⁴ and LysM-Cre mice¹⁵ were obtained from Jackson Laboratories. Rosa26-Cre^{ERT2} mice¹⁶ were obtained from the 'Institut Clinique de la Souris' (Strasbourg, France). Pdgfb-Cre^{ERT2} mice¹⁷ were kindly provided by M. Fruttiger.

Animal experiments were performed to conform to the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes, and approved by the local Animal Care and Use Committee of Bordeaux University (CEEA50).

Rosa26-Cre^{ERT2}, HSA-Cre^{ERT2}, and LysM-Cre mice were genotyped using the following primers 5'-TAAAGATATCTCACGTAAGTACGG TG-3' and 5'-TCTCTGACCAGATCATCCTTAGC-3' that amplify 493 bp of the Cre re-combinase sequence. Pdgfb-Cre^{ERT2} mice were genotyped using the following primers 5'-CCAGCCGCCGTCGC AACT-3' and 5'-GCCGCCGGATCACTCTCG-3'. Shh Floxed mice were genotyped using the following primers 5'-ATGCTGGCTCGC CTGGCTGTGGAA-5' and 5'-GAAGAGATCAAGGCAAGCTCTGG C-3'. Smo Floxed mice were genotyped using the following primers 5'-CCACTGCGAGCCTTTCGCTAC-3' and 5'-CCCATCACCTCCGC GTCGCA-3' which amplifies a 446 bp fragment of the WT allele and 5'-CTTGGGTGAGAGGCTATTC-3' and 5'-AGGTGAGATGACAGGA GATC-3' which amplifies 280 bp of the floxed allele. Rosa26^{mTmG} mice were genotyped using the three following primers 5'-CTCTGCTGCCT CCTGGCTTCT-3', 5'-CGAGCGGATCACAAGCAATA-3', and 5'-TCAATGGCGGGGTCGTT-3'.

Cre re-combinase, of Rosa26-Cre^{ERT2} and Pdgfb-Cre^{ERT2} mice, was activated by intraperitoneal injection of 1 mg tamoxifen for five consecutive days starting 1 week before HLI surgery was performed. (i.e.: from day -7 to day -3 before surgery). Cre re-combinase of HSA-Cre^{ERT2} mice was activated by intraperitoneal injection of 1 mg tamoxifen for 10 consecutive days starting the day HLI surgery was performed (i.e.: from day 0).

2.2 HLI model and assessments

HLI was induced by ligation and re-section of the left femoral artery, as previously described.^{10,18}

Briefly, mice were anesthetized with isoflurane, aseptically prepared and a 5 mm incision was made in the left thigh region. Two ligations were made around the femoral artery, at the proximal end of the femoral artery and the distal portion of the saphenous vein. The femoral artery and all side-branches were then dissected and excised. The connective tissues were closed with interrupted 6-0 absorbable sutures. To minimize pain caused by the surgery, mice were administered intraperitoneally with 0.05 mg/kg buprenorphin 30 min before and 8 h after surgery.

Mice were sacrificed by cervical dislocation at the indicated time points.

For histological assessment and gene expression analysis, tibialis anterior muscle was harvested, and cut in half. The lower half was fixed in methanol, paraffin-embedded, and cut into 6- μ m sections, and the upper half was snap frozen in liquid nitrogen.

Foot perfusion was measured using a MoorLDI2-IR apparatus after mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg), and reported as the ratio of blood perfusion in the ischaemic vs. non-ischaemic limb.

Micro-CT vasculature imaging was performed as previously described.¹⁹ More precisely, mice euthanized by a lethal injection of pentobarbital, were perfused via the ventral aorta first with a heparinized isotonic solution and then with a 10% Formalin solution, followed by a mixture of 88% Neoprene latex (Neoprene Latex Dispersion 671 A, Dupont, France) and barium sulphate (0.08 g/mL, MicrOpaque[®] oral solution, Guerbet, France). Next, the mouse was put into acid solution for the latex to harden, then, after dissection; the organs were fixed overnight in 10% Formalin at 4°C. For mCT scanner data processing and analysis, we used the Skyscan1174 Micro-CT scanner from Bruker with spatial resolution of 6 to 30 μ m, with the Skyscan[®] and NRecon[®] programs. Voltage parameters were 48 kV with a mean current of 805 μ A. Our acquisition protocol consisted of 360 views with 5 averaged images per position, with a voxel volume of 17 μ m³. 3D images were obtained using the IMARIS[®] program.

2.3 Immunostaining and quantifications

ECs were identified with rat anti-CD31 anti-bodies (BD Pharmingen Inc). Myocytes were identified using rabbit polyclonal anti-Desmin anti-bodies (Millipore), leucocytes were identified using rat anti-CD45 anti-bodies (BD Pharmingen Inc), neutrophils were identified using rat anti-Ly6G (GR1) anti-bodies (BD Pharmingen Inc), and macrophages were identified using rat anti-CD68 anti-bodies (Biolegend). VEGFA was stained using rabbit anti-VEGFA anti-bodies (Abcam). GFP was identified using rabbit anti-GFP anti-bodies (Molecular probe). For immunofluorescence analyses, primary anti-bodies were resolved with Alexa-Fluor-conjugated secondary anti-bodies (Invitrogen) and nuclei were counterstained with DAPI (1/5000). For immunohistochemical analyses, primary anti-bodies were sequentially stained with biotin-conjugated secondary anti-bodies (Vector Laboratories) and streptavidin-HRP complex (Amersham), then the stain was developed with a DAB substrate kit (Vector Laboratories); tissues were counterstained with haematoxylin.

Capillary, neutrophil and macrophage density was evaluated in sections stained for the expression of CD31, GR1, and CD68, respectively. For each muscle section, CD31+ vessels, GR1+ neutrophils, and CD68+ macrophages were counted in 20 pictures randomly taken under 40x magnification. One section was quantified per muscle

(per mouse) because we verified muscle repair is relatively uniform along the length of the tibialis anterior muscle. Myogenesis was assessed after Desmin staining of muscle sections as the percentage of Desmin+ area. Only mice, in which there was histologic evidence of ischaemia in the tibialis anterior muscle, as assessed by haematoxylin and eosin (H&E) staining, were included in the study.

2.4 Plasmids/gene therapy

Gene therapy was performed in 12 week old mice. Immediately after HLI surgery was performed, mice were randomly assigned to receive 200 µg pIRES-EGFP or 200 µg pIRES-NShh¹⁰ together with 0.05% pluronic. The DNA/pluronic mix was injected intramuscularly in the tibialis anterior muscle as previously described.¹⁰ Mice scheduled to be sacrificed at day 5 were injected immediately after surgery while mice scheduled to be sacrificed at day 10 were injected both at day 0, immediately after surgery, and at day 4.

2.5 Flow cytometry

The ischaemic tibialis anterior muscle was subsequently dissociated in 2 mg/mL type 4 collagenase (Worthington) for 1 h at 37°C and filtered on a 40 µm strainer. Macrophages were labelled with PE-conjugated anti-CD11b (Biolegend) and FITC-conjugated anti-CD11c (Biolegend) anti-body, before they were counted using a ACCURI[®] C6 flow cytometer (BD). Neutrophils were labelled with APC conjugated anti-Ly6G and Ly6C (BD Pharmingen Inc).

2.6 Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using Tri Reagent[®] (Molecular Research Centre Inc) as instructed by the manufacturer, from 3×10^5 cells or from skeletal muscle that had been snap-frozen in liquid nitrogen and homogenized. For quantitative RT-PCR analyses, total RNA was reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase (Promega) and amplification was performed on a DNA Engine Opticon[®]2 (MJ Research Inc) using B-R SYBER[®] Green SuperMix (Quanta Biosciences). Primer sequences are reported in Supplementary material online, Table S1.

The relative expression of each mRNA was calculated by the comparative threshold cycle method and normalized to HPRT mRNA expression.

2.7 Cell culture

Both C2C12 cells (ATCC) and RAW 264.7 macrophages (ATCC) were cultured in DMEM containing 4.5 g/L glucose and supplemented with 10% foetal bovine serum. Before any treatment, cells were serum starved in 0.5% foetal bovine serum containing culture medium for 24 h.

Primary cultured myoblasts were isolated from Smo^{Flox/Flox} mice or their WT littermates as previously described.²⁰ Briefly, to isolate myoblasts, mouse limb skeletal muscle was dissociated in 2.4 U/mL dispase (Sigma) and 1.5 mg/mL collagenase 2 (Worthington) containing culture medium for 20 min at 37°C. Muscle cells were then seeded on 50 µg/mL type I collagen coated dishes (Sigma) and cultured in 20% FBS containing HAM F10 nutrient mixture. Round shape cells (i.e. myoblasts) were enriched, and fibroblasts were eliminated by passaging cells with PBS that contained no trypsin. To preserve a proliferating phenotype, myoblasts were maintained in culture medium containing 50% HAM F10 nutrient mixture and 50% DMEM, supplemented with 20% FBS and, FGF2 (2.5 ng/mL). Both Smo^{Flox/Flox} and WT myoblasts were transduced with Cre-expressing lentiviruses²⁰ at a MOI of 20.

2.8 Migration assay

Cell migration was evaluated by using a modified Boyden's chamber (Neuro Probe, Inc). Briefly, a polycarbonate filter (8-µm pore size) (GE Infrastructure) was coated with a solution containing 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich) and inserted between the upper and lower wells. Cells, 5×10^4 per well, were seeded in the upper chamber, and the lower chamber contained myoblast-conditioned medium containing 2 µg/mL Ccl2 blocking anti-bodies (R&D systems) or isotype control. Migration was evaluated as the mean number of migrated cells in three high-power fields (HPF) (20× magnification) per well.

2.9 Phagocytosis assay

Five $\times 10^4$ RAW 264.7 macrophages were seeded in each well of a 24 well plate. After cells were serum-starved in 0.5% foetal bovine serum containing culture medium for 24 h, they were treated with or without 1 µg/mL recombinant N-Shh (Shenandoah) or 30 nM GDC-0449 (Sigma) for 24 h. The media was then removed from cells and replaced by fresh media containing 40 FITC-labelled Zymosan A Bioparticles (Molecular Probes[™])/cells. After 1 h incubation at 37°C, cells were washed with ice-cold PBS and fixed with 10% Formalin. Nuclei were stained with DAPI. Phagocytosis was quantified as the ratio of FITC positive surface area over the number of DAPI positive nuclei. Phagocytosis was evaluated in 3 HPFs (20× magnification) per well.

2.10 Statistics

Results are reported as mean ± SEM. Comparisons between groups were analysed for significance with the non-parametric Mann-Whitney test or with a one way ANOVA analysis followed by a Bonferroni's multiple comparison test when there were three or more groups to compare. Differences between groups were considered significant when $P < 0.05$. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

3. Results

3.1 Endogenous Shh does not promote ischaemia-induced angiogenesis

To investigate the role of endogenous Shh in ischaemia-induced angiogenesis, we created Shh inducible knock out (iKO) adult mice. To this aim, we bred Shh conditional KO mice (Shh^{Flox}) with mice expressing the tamoxifen-inducible Cre ubiquitously (Rosa26-Cre^{ERT2} mice). We first assessed Cre re-combinase activity in the skeletal muscle of adult mice, by breeding Rosa26-Cre^{ERT2} mice with Rosa26^{mTmG} mice. Recombination of the Rosa26^{mTmG} allele was verified after GFP staining of skeletal muscle sections (Figure 1A). Additionally, effective Shh knock-down was verified by measuring Shh mRNA expression in the ischaemic and non-ischaemic skeletal muscle of Rosa26-Cre^{ERT2}; Shh^{Flox/Flox} mice. As shown in Figure 1B, Shh mRNA expression was reduced by approximately 85% while Dhh and Lhh mRNA expression was not modulated (Figure 1B–D).

Rosa26-Cre^{ERT2}; Shh^{Flox/Flox} (Shh iKO) and control Shh^{Flox/Flox} mice then underwent HLI surgery. Re-vascularization of the ischaemic leg was evaluated, 5 and 10 days after surgery, by measuring capillary density in the ischaemic tibialis anterior muscle and foot perfusion. Unexpectedly, we found that capillary density was significantly increased in Shh deficient mice compared to control mice 5 days after HLI surgery was performed (Figure 1E–F). However, 10 days after surgery, capillary density was equivalent in both groups. Similarly, foot perfusion increased in Shh

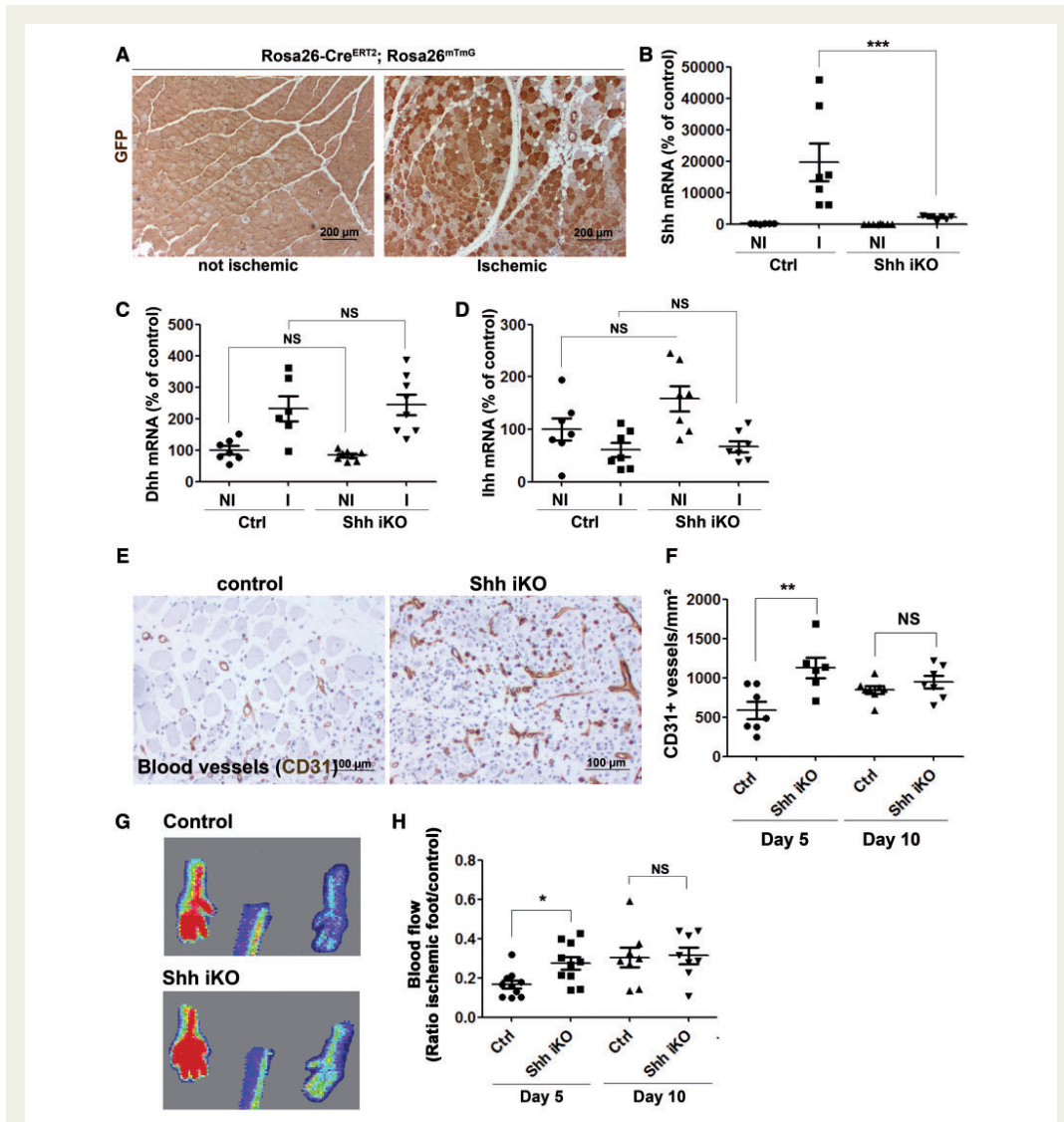


Figure 1 Shh deficiency leads to a transient increase in angiogenesis. (A) *Rosa26-Cre^{ERT2}; Rosa26^{mTmG}* mice underwent HLI surgery and were sacrificed 10 days later. Cross sections of ischaemic and non-ischaemic tibialis anterior muscle were immuno-stained with anti-GFP anti-bodies (brown staining). (B–D) *Rosa26-Cre^{ERT2}; Shh^{Flox/Flox}* mice (Shh iKO); and their control littermates (*Shh^{Flox/Flox}* mice) underwent HLI surgery and were sacrificed 2 days later. (B) Shh, (C) Dhsh, and (D) lhsh mRNAs were quantified by real time RT PCR and normalized to HPRT mRNA both in the ischaemic and non-ischaemic tibialis anterior muscles ($n = 7$ mice per group). (E–H) *Rosa26-Cre^{ERT2}; Shh^{Flox/Flox}* mice (Shh iKO); and their control littermates (*Shh^{Flox/Flox}* mice) underwent HLI surgery and were sacrificed 5 and 10 days later. (E) Ischaemic tibialis anterior muscle cross sections were immuno-stained with anti-CD31 anti-bodies to identify blood vessels. Representative images of muscle sections from animals sacrificed 5 days after surgery are shown. (F) Capillary density was quantified as the number of CD31+ vessels per mm^2 (Day 5: $n = 7$ control, $n = 6$, Shh KO. Day 10 $n = 8$ control, $n = 7$, Shh KO). (G) Foot perfusion was measured via Laster Doppler Perfusion Imaging (LDPI). Representative perfusion images obtained 5 days after surgery are shown. (H) Blood flow was quantified as the ratio of blood flow in the ischaemic foot vs. non-ischaemic foot 5 and 10 days after HLI surgery was performed (Day 5: $n = 10$ control, $n = 10$, Shh KO. Day 10 $n = 8$ control, $n = 7$, Shh KO). NI: not ischaemic; I: ischaemic; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, NS: not significant, (B, C, D) One way ANOVA, (F, H) Mann–Whitney test.

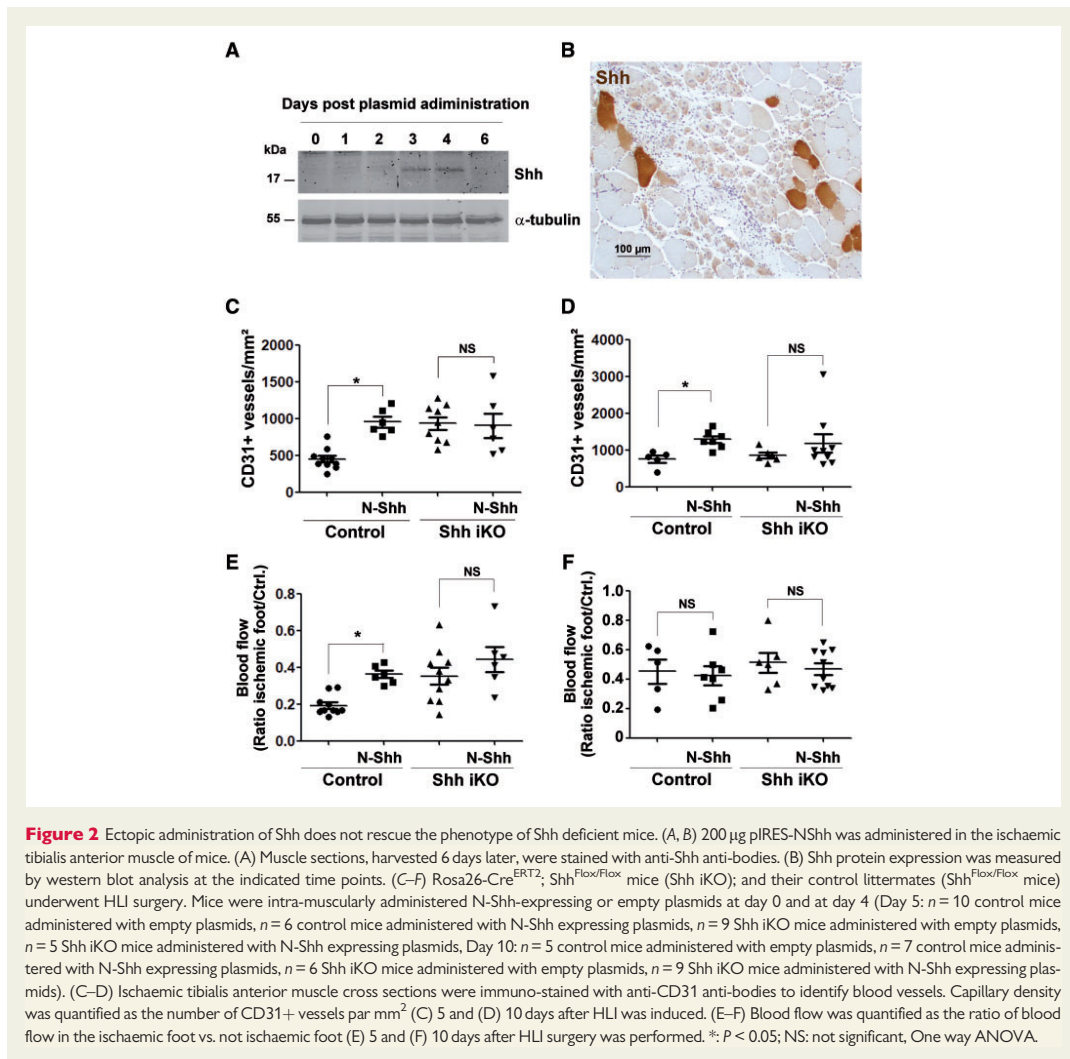


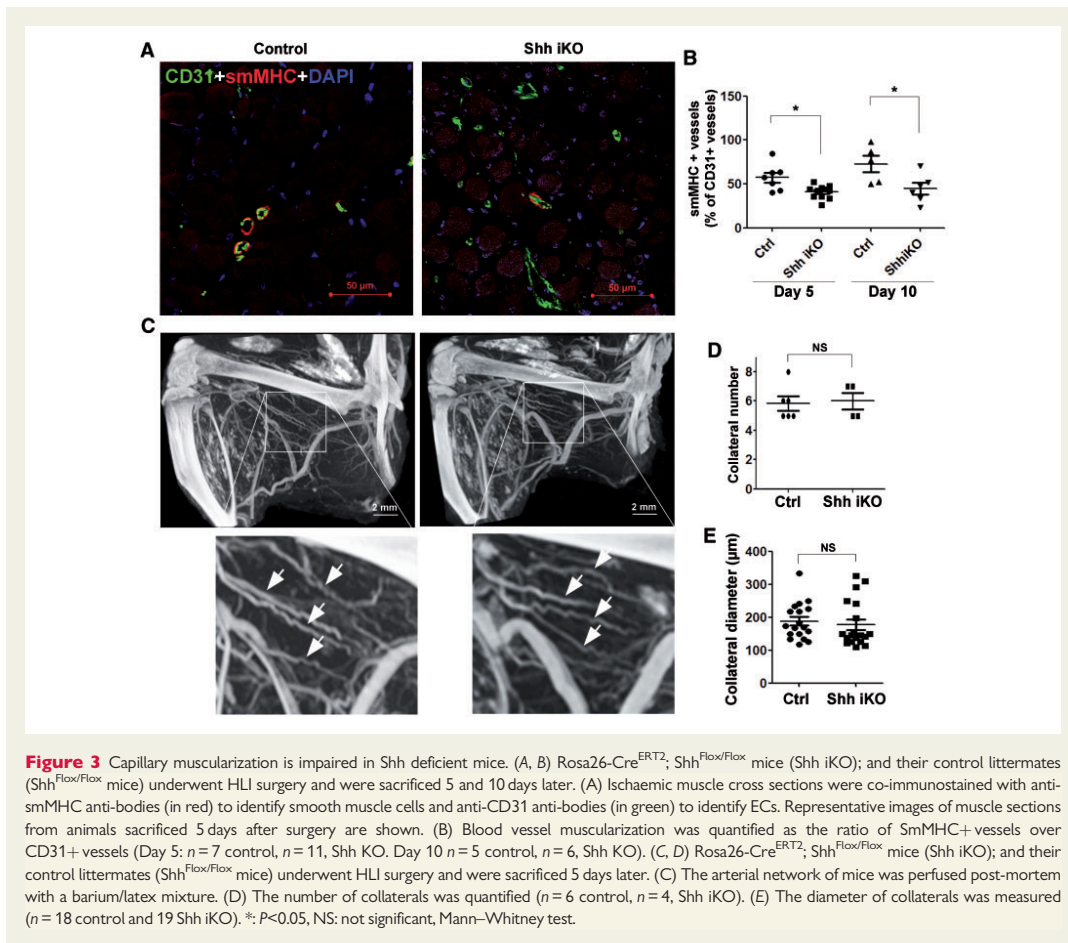
Figure 2 Ectopic administration of Shh does not rescue the phenotype of Shh deficient mice. (A, B) 200 µg pIRES-NShh was administered in the ischaemic tibialis anterior muscle of mice. (A) Muscle sections, harvested 6 days later, were stained with anti-Shh anti-bodies. (B) Shh protein expression was measured by western blot analysis at the indicated time points. (C–F) *Rosa26-Cre^{ERT2}*; *Shh^{Flox/Flox}* mice (Shh iKO); and their control littermates (*Shh^{Flox/Flox}* mice) underwent HLI surgery. Mice were intra-muscularly administered N-Shh-expressing or empty plasmids at day 0 and at day 4 (Day 5: *n* = 10 control mice administered with empty plasmids, *n* = 6 control mice administered with N-Shh expressing plasmids, *n* = 9 Shh iKO mice administered with empty plasmids, *n* = 5 Shh iKO mice administered with N-Shh expressing plasmids, Day 10: *n* = 5 control mice administered with empty plasmids, *n* = 7 control mice administered with N-Shh expressing plasmids, *n* = 6 Shh iKO mice administered with empty plasmids, *n* = 9 Shh iKO mice administered with N-Shh expressing plasmids). (C–D) Ischaemic tibialis anterior muscle cross sections were immuno-stained with anti-CD31 anti-bodies to identify blood vessels. Capillary density was quantified as the number of CD31+ vessels per mm² (C) 5 and (D) 10 days after HLI was induced. (E–F) Blood flow was quantified as the ratio of blood flow in the ischaemic foot vs. not ischaemic foot (E) 5 and (F) 10 days after HLI surgery was performed. *: *P* < 0.05; NS: not significant, One way ANOVA.

deficient mice compared to control mice 5 days after HLI surgery. Foot perfusion was equivalent in both groups at day 10 post-surgery, consistent with capillary density data (Figure 1G–H).

Altogether these results demonstrate that Shh deficiency leads to a transiently increased angiogenesis in the ischaemic skeletal muscle however; this response appears to be inefficient and does not lead to a long-lasting improved foot perfusion. Because this result was unexpected and contrary to previous reports, we administered Shh ectopically via gene therapy (Figure 2A–B), in both Shh deficient mice and their littermates, to confirm that we were able to reproduce results from the literature.^{6,7} As shown Figure 2C and D, Shh gene therapy significantly increased capillary density in control mice both at day 5 and at day 10,

which is fully consistent with previous studies^{7,8,21} and confirms that, when administered ectopically, Shh is pro-angiogenic. Blood flow was significantly increased at day 5, nevertheless, this effect was no longer observable at day 10 (Figure 2E–F). Notably, capillary density was increased by two-fold at day 5 while it was only increased by 1.5-fold at day 10. However, Shh gene therapy had no effect in Shh deficient mice in which capillary density was already high. In summary, ectopic administration of Shh did not rescue the phenotype of Shh deficient mice, suggesting that endogenous and exogenous Shh have different effects.

Therefore, our data demonstrates that in contrast to Dhh,¹⁰ endogenous Shh does not promote ischaemia-induced angiogenesis, and more likely attenuates the angiogenesis process.



3.2 Endogenous Shh is necessary for new capillary muscularization but not arteriogenesis

Shh has been shown to be involved in blood vessel muscularization,²² as such, we measured smooth muscle cell coverage of newly formed capillaries within the ischaemic muscle of Shh deficient mice and control mice. We found that the percentage of smooth muscle myosin heavy chain (smMHC) positive capillaries was significantly decreased in the absence of Shh, both 5 and 10 days after HLI was induced (Figure 3A–B), demonstrating that in the absence of Shh, angiogenesis is transiently increased but the newly formed capillaries remain immature.

This latter result is consistent with previous literature reports,^{7,21,22} and further confirms the essential role of Shh in blood vessel maturation.

In addition, we evaluated the role of Shh in arteriogenesis using micro CT imaging. To do so, Shh iKO mice and their control littermates underwent HLI surgery. Five days later, mice were sacrificed and perfused with a barium/latex mixture through the aorta. As shown in Figure 3C–E,

collateral formation (i.e. collateral number and collateral diameter) were equivalent in Shh deficient and control mice, showing that endogenous Shh does not participate in collateral formation in the setting of ischaemia.

3.3 Endogenous Shh is not necessary for ischaemia-induced myogenesis

As Hh signalling is also known to participate in adult myogenesis,²³ we evaluated myogenesis in Shh deficient mice and their control littermates. Ten days after HLI surgery, the surface area of ischaemic muscle recolonized by new muscle fibers (desmin + with central nuclei) was the same in Shh iKO mice and in control mice (see Supplementary material online, Figure S1A–B). Moreover, the expression profile of MyoD, an early marker of myogenesis (see Supplementary material online, Figure S1C), and Myh1, a late marker of myogenesis, (see Supplementary material online, Figure S1D) were not different in the absence of Shh, demonstrating that Shh is not necessary for ischaemia-induced myogenesis.

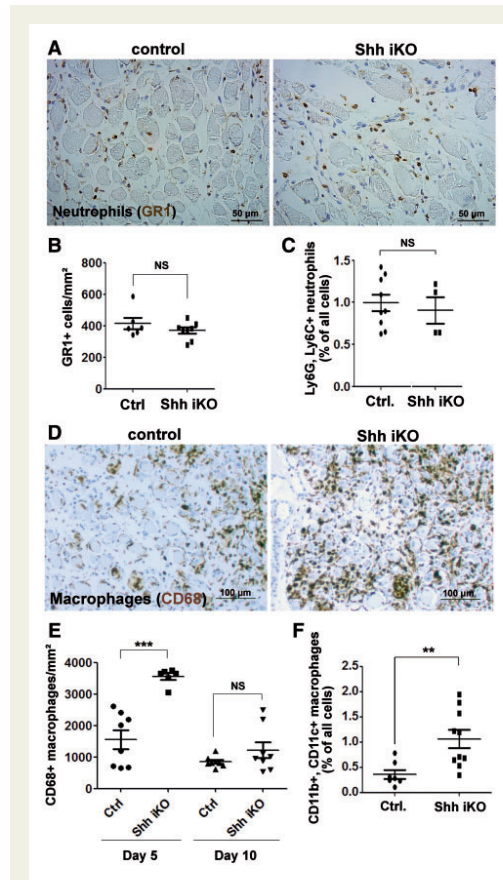


Figure 4 Shh limits macrophage recruitment in the ischaemic muscle. Rosa26-Cre^{ERT2}; Shh^{Fllox/Fllox} mice (Shh iKO); and their control littermates (Shh^{Fllox/Fllox} mice) underwent HLI surgery. (A–C) Mice were sacrificed 2 days later. (A) Ischaemic tibialis anterior muscle cross sections were immuno-stained with anti-Ly6G (GR1) anti-bodies to identify neutrophils. (B) Neutrophil density was quantified as the number of GR1+ cells par mm² (n = 6 control, n = 8 Shh iKO). (C) Neutrophils infiltrated in the ischaemic muscle were counted by FACS analysis using anti-Ly6G, Ly6C anti-bodies (n = 9 control, n = 4 Shh iKO). (D–F) Mice were sacrificed 5 and 10 days later. (D) Ischaemic tibialis anterior muscle cross sections were immuno-stained with anti-CD68 anti-bodies to identify macrophages. Representative images of muscle sections from animals sacrificed 5 days after surgery are shown. (E) Macrophage density was quantified as the number of CD68+ cells par mm² (Day 5: n = 8 control, n = 6, Shh KO. Day 10 n = 8 mice in each group). (F) Macrophages infiltrated in the ischaemic muscle were counted by FACS analysis using anti-CD11c and anti-CD11b anti-bodies (n = 7 control, n = 10, Shh iKO). **: P < 0.01, ***: P < 0.001; NS: not significant, Mann–Whitney test.

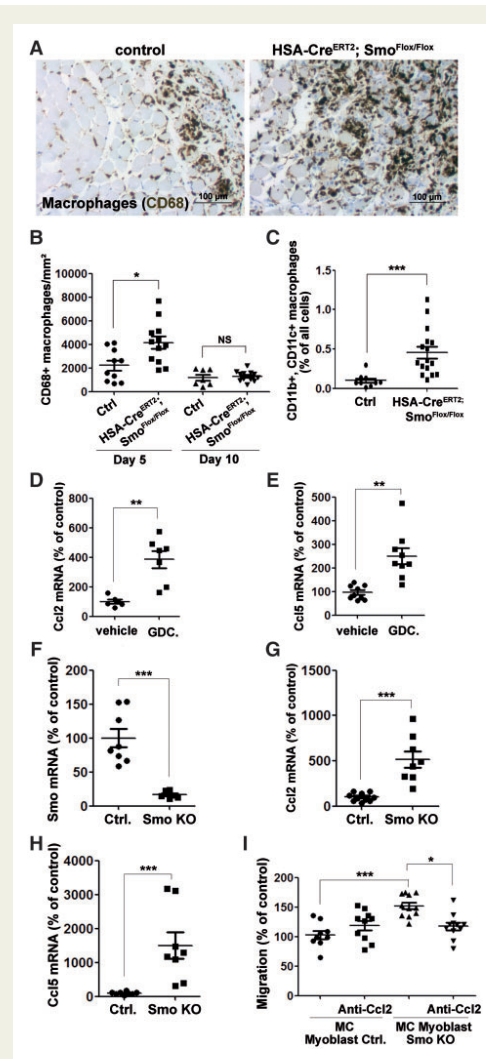


Figure 5 Hyper inflammation is consequence of impaired Shh signaling to myocytes. (A, C) HSA-Cre^{ERT2}; Smo^{Fllox/Fllox} mice; and their control littermates (Smo^{Fllox/Fllox} mice) underwent HLI surgery and were sacrificed 5 and 10 days later. (A) Ischaemic tibialis anterior muscle cross sections were immuno-stained with anti-CD68 anti-bodies to identify macrophages. Representative images of muscle sections from animals sacrificed 5 days after surgery are shown. (B) Macrophage density was quantified as the number of CD68+ cells per mm² (Day 5: n = 10 control, n = 12 HSA-Cre^{ERT2}; Smo^{Fllox/Fllox}. Day 10: n = 7 control, n = 13 HSA-Cre^{ERT2}; Smo^{Fllox/Fllox}). (C) Macrophages infiltrated in the ischaemic muscle were double stained with anti-CD11c and anti-CD11b anti-bodies and counted by FACS analysis (n = 9 control,

Downloaded from https://academic.oup.com/circulation/article-abstract/141/5/759/4819254 by Universite de Bordeaux user on 23 June 2020

3.4 Shh limits macrophage recruitment in the ischaemic muscle

As Shh is strongly over expressed 2 days after HLI surgery, and its expression is back to baseline at day 5,¹⁰ we tested the role of Shh in early events, such as inflammation, following ischaemic injury.

To evaluate the impact of Shh KO on ischaemic muscle inflammation, both Shh iKO mice and their control littermates underwent HLI surgery, and neutrophil infiltration was evaluated 2 days later. As shown in Figure 4A and B, GR1+ neutrophil infiltration was not different in the presence or absence of Shh. This result was confirmed by FACS analysis of Ly6G, Ly6C positive cells (Figure 4C). In contrast, when we assessed macrophage infiltration, which typically peaks 5 days after ischaemia is induced, we found that CD68+ macrophage density in the ischaemic muscle was significantly increased in Shh deficient mice (Figure 4D–E), demonstrating that Shh limits macrophage recruitment. Similarly, the number of CD11b, CD11c double positive cells within the ischaemic muscle was significantly increased in Shh-deficient mice (Figure 4F).

Taken together these data demonstrate that Shh exhibits an anti-inflammatory action in ischaemic tissue by limiting macrophage recruitment.

3.5 Shh does not limit macrophage recruitment by targeting macrophages directly

To better understand how Shh limits macrophage infiltration in the ischaemic muscle, we investigated the Shh-target cell type responsible for this effect. To do so, we used Smoothed conditional KO mice (Smo^{Flox}). Because Smoothed (Smo) is an essential positive regulator of Hh signalling, Smo^{Flox} mice are classically used to disrupt Hh signalling in specific cell types.¹²

Smo KO was induced in inflammatory cells (macrophages and neutrophils) by breeding Smo^{Flox} mice with LysM-Cre mice. We first verified that Cre re-combinase was expressed and active in neutrophils and macrophages infiltrating into the ischaemic skeletal muscle of adult mice, by breeding LysM-Cre mice with Rosa26^{mTmG} mice (see Supplementary material online, Figure S2).

LysM-Cre; Smo^{Flox/Flox} and their control littermates underwent HLI surgery. Macrophage density was evaluated by immunohistochemistry and flow cytometry. Both the number of CD68+ cells counted on muscle cross sections (see Supplementary material online, Figure S3A–B) and the number of CD11b, CD11c double positive cells counted by flow

cytometry (see Supplementary material online, Figure S3C) were equivalent in LysM-Cre, Smo^{Flox/Flox} mice and their control littermates, demonstrating that Shh does not limit macrophage recruitment by signalling to macrophages directly.

To further confirm this result, we performed *in vitro* assays using cultured macrophages. We first found that Shh recombinant protein had no effect on Gli1 or Gli2 mRNA expression (see Supplementary material online, Figure S4A–B). Nevertheless, macrophages were sensitive to some autocrine-induced Hh signalling through Gli2 (see Supplementary material online, Figure S4B), since inhibition of Smo with GDC-0449 significantly decreased Gli2 mRNA expression. Consistent with *in vivo* data, neither Shh treatment nor Smo inhibition modulated chemokine expression, including Ccl2 or Ccl5 (see Supplementary material online, Figure S4C–D), or macrophage migration (see Supplementary material online, Figure S4E). In addition, Hh signalling had no effect on macrophage phagocytic activity (see Supplementary material online, Figure S4F). Finally, we tested whether Shh or GDC-0449 would modulate VEGFA expression, and found they did not (see Supplementary material online, Figure S4G). Accordingly, capillary density was not increased in LysM-Cre; Smo^{Flox/Flox} mice in comparison to their control littermates (see Supplementary material online, Figure S5A–B). Nevertheless, we observed a significant decrease in capillary density at day 5 in LysM-Cre; Smo^{Flox/Flox} mice which were associated with improved muscle perfusion 10 days after HLI surgery was performed (see Supplementary material online, Figure S5C–D). This phenotype is more likely independent of Shh, since it is not re-capitulated in Shh deficient mice.

3.6 Shh does not limit macrophage recruitment by modulating EC phenotype

We next tested whether Shh limits macrophage density in ischaemic muscle by modulating the EC phenotype. EC are active players of macrophage recruitment through the expression of adhesion molecules for inflammatory cells. Smo deletion in ECs was achieved using Pdgfb-Cre^{ERT2} mice, as previously described.¹⁰ Macrophage infiltration was evaluated in the ischaemic muscle in Pdgfb-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox} and control mice 5 days after HLI surgery, and Smo depletion in ECs did not lead to significant changes in macrophage density within the ischaemic muscle (see Supplementary material online, Figure S6A–B). Consistent with this, flow cytometry data showed that the number of CD11b, CD11c double positive cells was equivalent in both genotypes (see Supplementary material online, Figure S4C). This result demonstrates that Shh does not limit macrophage recruitment by modulating the EC phenotype.

Notably, we previously reported that neither capillary density nor blood flow recovery were modified in Pdgfb-cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox} mice.¹⁰

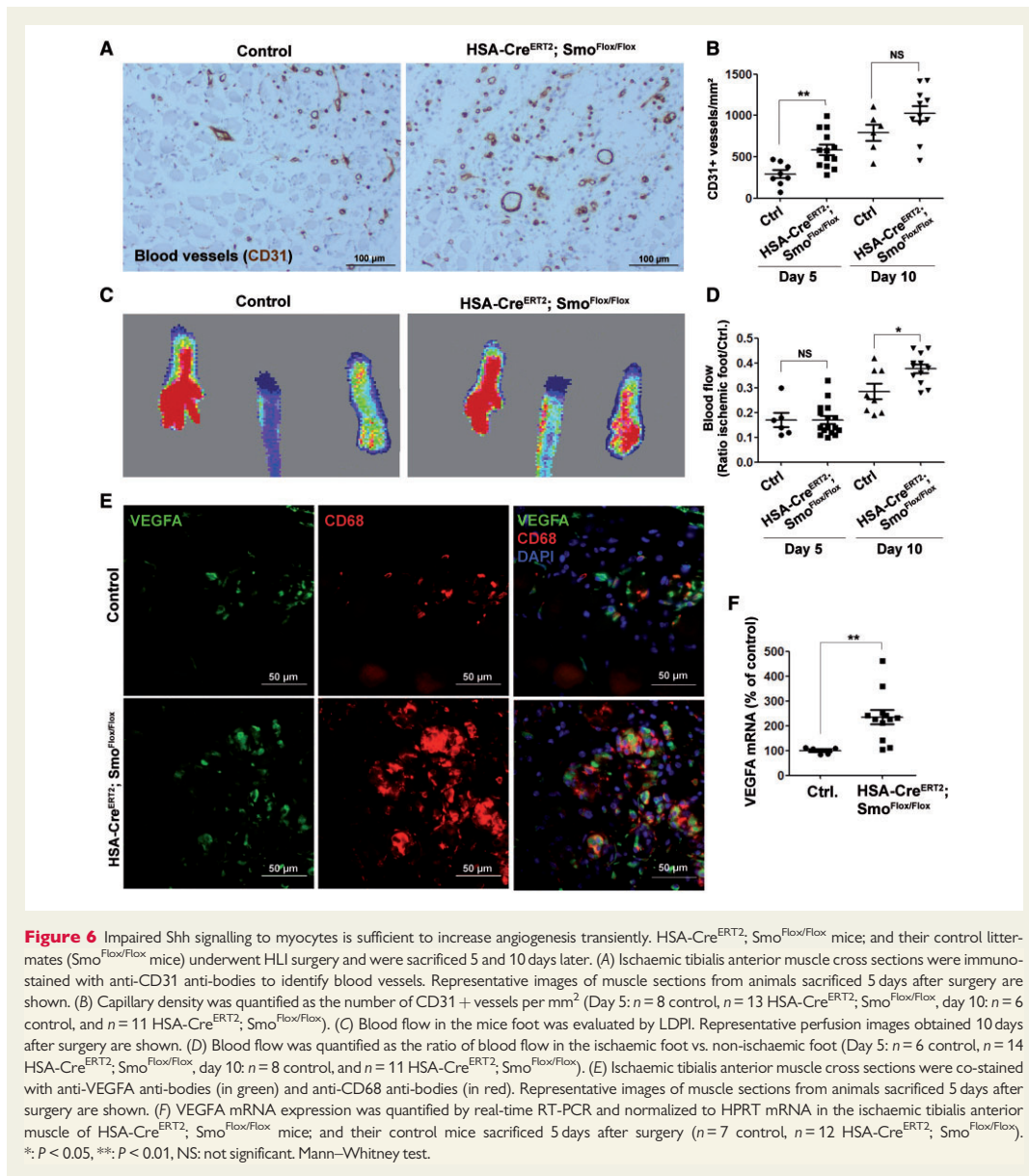
3.7 Hh signalling limits chemokine expression in myocytes

Finally, we specifically disrupted Smo expression in myocytes, by breeding Smo^{Flox} mice with HSA-Cre^{ERT2} mice. We previously verified that Cre re-combinase was active in newly generated skeletal myocytes in ischaemic skeletal muscle.²⁰ HSA-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox} mice and their control littermates underwent HLI surgery. CD68 staining of ischaemic muscle sections demonstrated that macrophage density was significantly increased in mice in which Smo expression had been specifically disrupted in myocytes (Figure 5A–B). This result was confirmed by flow cytometry analysis of CD11b, CD11c double positive cells (Figure 5C).

Together these results demonstrate that Shh does not limit macrophage recruitment in skeletal muscle by modulating inflammatory

Figure 5 Continued

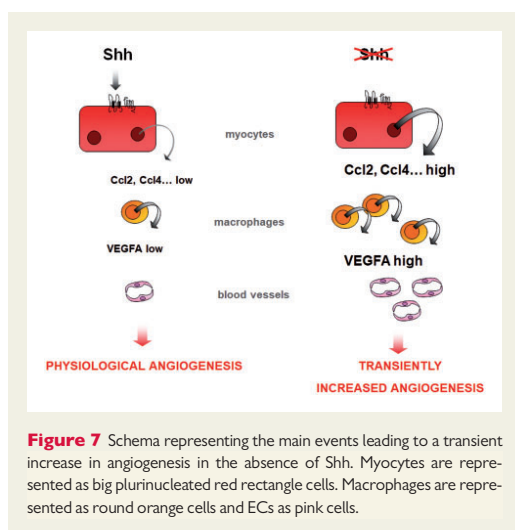
n = 16, HSA-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox}). (D, E) C2C12 cells were treated with or without 30 nmol/L GDC-0449 for 24 h. (D) Ccl2 and (E) Ccl5 mRNA expression level was quantified by real time RT-PCR and normalized to HPRT mRNA (n = 6–9 per condition) (F–H) Myoblasts were isolated from Smo^{+/+} (control) and Smo^{Flox/Flox} mice, and transduced with Cre expressing lentiviruses. (F) Smo, (G) Ccl2, and (H) Ccl5 mRNA expression level was quantified by real time RT-PCR and normalized to HPRT mRNA (n = 8 per condition). (I) RAW 264.7 cells were seeded in the upper chamber of a Boyden chamber. The lower chamber contained myoblast-conditioned medium containing anti-Ccl2 anti-bodies of isotype control (n = 9 per condition). *: P < 0.05, **: P < 0.01, ***: P < 0.001, (B–H) Mann–Whitney test, (I) One way ANOVA.



cells directly or the EC phenotype, but through its action on myocytes.

To further understand how Shh limits macrophage recruitment, we performed *in vitro* experiments using the C2C12 myoblast cell line. We

found that inhibition of Hh signalling, with the Smo inhibitor GDC-0449, significantly increased expression of several cytokines that are chemotactic for macrophages, including Ccl2 and Ccl5 (Figure 5D–E). We confirmed these results in primary cultured myoblasts isolated from



Smo^{Flox/Flox} mice or Smo^{+/+} control mice and subsequently transduced with Cre encoding lentivirus (Figure 5F–H).

To test whether Ccl2 produced by myoblasts can promote macrophage migration, we used conditioned medium from control and Smo KO myoblasts in which Ccl2 had or had not been blocked with anti-Ccl2 anti-bodies. We found that macrophage migration was significantly increased by Smo KO myoblast conditioned medium compared to control myoblast conditioned medium, and that Ccl2 blockage inhibited Smo KO myoblast-conditioned medium induced macrophage migration (Figure 5I).

These results demonstrate for the first time that endogenous Shh limits macrophage recruitment in ischaemic tissue by down-regulating chemokine expression in muscle cells.

3.8 'Hyperinflammation' induces a transient increase in angiogenesis in Hh deficient mice

Because macrophages are known to produce proangiogenic molecules including VEGFA, we evaluated angiogenesis in HSA-Cre^{ERT2}, Smo^{Flox/Flox} mice. Consistent with results obtained in Shh deficient mice, we observed a significant increase in capillary density in ischaemic skeletal muscle of HSA-Cre^{ERT2}, Smo^{Flox/Flox} mice compared to their control littermates 5 days after HLI (Figure 6A–B), which resulted in a significant increase in foot perfusion 10 days after HLI (Figure 6C–D). The increased capillary density was associated with significantly increased VEGFA levels (Figure 6E–F) within the ischaemic muscle.

4. Discussion

To our knowledge, the present study is the first to use specific tools (i.e. Shh deficient mice) to investigate the role of endogenous Shh in angiogenesis in adult mice. This study demonstrates that endogenous Shh does not promote ischaemia-induced angiogenesis, on the contrary it reveals that angiogenesis is transiently increased in the absence of Shh

(Figure 7). This result was unexpected based on previous literature which demonstrated that administration of exogenous Shh promoted ischaemia-induced angiogenesis both in ischaemic skeletal muscle and infarcted heart muscle.^{7,8}

Studies conducted to date have investigated the role of endogenous Hh signalling in ischaemic tissue repair, using non-specific tools such as the monoclonal anti-body 5E1 which blocks activity of the three different Hh ligands (Shh, Ihh, and Dhh)⁶ or the Smo inhibitor Cyclopamine.²⁴ Moreover, the results of these studies were inconsistent; since Pola et al. reported that Hh signalling blockage with 5E1 anti-bodies inhibited ischaemia-induced angiogenesis, while Bijlsma et al. reported that Hh signalling blockage with cyclopamine did not affect angiogenesis.

Notably, our results are consistent with embryonic studies. Indeed, while ectopic Shh over-expression in the roof plate of the spinal cord was shown to induce hypervascularization of neuroectoderm,²⁵ Chiang et al. did not observe any obvious vascular defects in Shh deficient embryos.²⁶ Consistent with this, Van Tuil et al. reported that the pulmonary vascular bed of Shh KO embryos was decreased, but appropriate to the decrease in airway branching.²⁷ In contrast, other Hh family members including Ihh, were shown to be necessary for the formation of the anterior aorta²⁸ and angiogenesis, especially in the yolk sac.²⁹

Additionally, this study reveals that Shh exerts an anti-inflammatory action in ischaemic tissue. The role of Shh as a regulator of inflammation was first suggested through its role in the regulation of thymocyte differentiation.^{30,31} Nevertheless, the role of Hh signalling in the regulation of inflammation is still poorly understood, while *in vitro* studies suggest that Shh promotes the expression of several chemokines including Ccl2, Ccl20, Cxcl1, Cxcl2, and Cxcl16^{32,33}; studies performed in mice with impaired Hh signalling, have demonstrated that the loss of Hh signalling may lead to chronic tissue inflammation in the brain or intestine,^{34–36} or limit inflammation in *Helicobacter Pylori* infected stomach.³⁷ Additionally, several pieces of evidence suggest that Hh signalling promotes Th2 differentiation of lymphocytes through the regulation of Il4,³⁸ or M2 differentiation of macrophages through regulation of Il10.³⁹ Our results are consistent with an anti-inflammatory role of Shh. We found for the first time that impaired Hh signalling in myoblasts promotes the expression of several Ccl chemokines. Our data confirms the role of Hh signalling as an essential regulator of tissue inflammation, and further demonstrates that Shh does not limit macrophage recruitment by signalling to macrophages directly or to ECs; but rather through the modulation of chemokine expression by myocytes (Figure 7).

In addition to providing evidence for the role of Shh in tissue homeostasis and regeneration in adults, this study further elucidates the process of regulation in ischaemia-induced angiogenesis. Specifically, our data demonstrate that while increased macrophage recruitment in ischaemic muscle accelerates angiogenesis; this increased angiogenesis is transient and does not lead to a long-term increase in tissue perfusion. Consistent with these results, a recent study demonstrated that administration of CD14+ macrophages in mice increases the number of perfused blood vessels both in an *in vivo* Matrigel plug assay and in the HLI model in mice; however, the blood vessels formed in the CD14+ macrophage-treated mice remained large, leaky and unable to recruit pericytes. As a consequence, CD14+ macrophages induced pathologic rather than physiological and persistent angiogenesis, which did not result in any improvement of limb perfusion 2 weeks after HLI was induced.⁴⁰ Although the study by Choi YE et al. used cultured human peripheral blood derived macrophages in immuno-deficient mice; our study confirms these results under 'fully physiological' conditions. Notably the vascular phenotype, we observed in the ischaemic muscle of Shh deficient

mice which is associated with an increased macrophage-derived VEGFA, resembles that of tumour vasculature with a high density of poorly muscularized blood vessels that are inefficient at promoting tissue perfusion.⁴¹ Accordingly, remodelling of the newly formed capillary network within the lower limb muscle has been recently suggested to be essential for efficient limb perfusion. Indeed, while capillary density within the ischaemic lower limb muscle (tibialis anterior and extensor digitorum longus muscle) is at least as high as that of a healthy muscle 10–14 days after HLI surgery,^{10,42} limb perfusion remains low: the ratio of blood flow within the ischaemic muscle vs. healthy muscle remains only 0.5). One of the proposed explanations for that is that the newly generated capillary network is poorly muscularized.⁴²

Although phenotyping LysM-Cre; Smo^{Flox/Flox} mice, we found that Hh signalling is active in macrophages. Macrophages are sensitive to auto-crine production of Ihh or Dhh, but not Shh. Nevertheless, Hh ligands do not modulate phagocytosis or macrophage migration. Notably, monocyte/macrophages were previously shown to produce Ihh and Dhh,⁴³ and macrophage derived-Ihh was shown to promote M2 differentiation of macrophages.⁴³ Moreover, we have shown that impaired Hh signalling in macrophages slows down angiogenesis and promotes capillary muscularization (data not shown). As discussed in the above paragraph, capillary muscularization which is a feature of newly formed capillary maturation is essential for their functionality and thus may be responsible for the significantly enhanced muscle perfusion observed in LysM-Cre; Smo^{Flox/Flox} mice. However, the role of Hh signalling in macrophages in the setting of ischaemia-induced angiogenesis needs to be further investigated. Of note, Shh is not likely the Hh ligand controlling macrophages behaviour. Indeed, while impaired Hh signalling in macrophages promote capillary muscularization, Shh deficiency decreases capillary muscularization. Notably, we have previously reported that Shh of which expression is induced by PDGF-BB in SMCs, promotes capillary muscularization.²² This previous report also explains why the percentage of smMHC positive vessel is significantly decreased in Shh iKO mice while it is not different from control mice, in HSA-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox} mice.

Finally, the present study reveals that endogenous Shh and ectopically administered N terminal-Shh act differently in the setting of ischaemic skeletal muscle repair. One explanation for this might be that the bioavailability (i.e. expression profile and solubility) of the two sources of Shh are different, however, further investigations are necessary to fully understand why exogenous N-terminal-Shh is pro-angiogenic while endogenous Shh is not. What is known so far is that when administered ectopically, Shh promotes VEGFA expression in fibroblasts and subsequently angiogenesis, what we found in the present study is that impaired Shh signalling in myocytes promotes the recruitment of VEGFA-expressing macrophages leading to an overall increased VEGFA expression within the ischaemic muscle. It should be noted that this is not the first study to report contradictory effects of Hh signalling on blood vessel biology, in the brain endogenous Hh signalling has been reported to promote blood brain barrier integrity,³⁴ while a recent study showed that brain tumour-derived Dhh contributed to enhanced vascular permeability.⁴⁴

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

The authors thank Jérôme Guignard, Annabel Reynaud, Myriam Petit-Roussel, and Jérémie Teillon for their technical help. The authors thank Christelle Boullé for administrative assistance. Cre^{ERT2} mice are licenced by GIE-CERBM (ICS-IGBMC).

Conflict of interest: none declared.

Funding

This study was funded by the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' and by the University of Bordeaux.

References

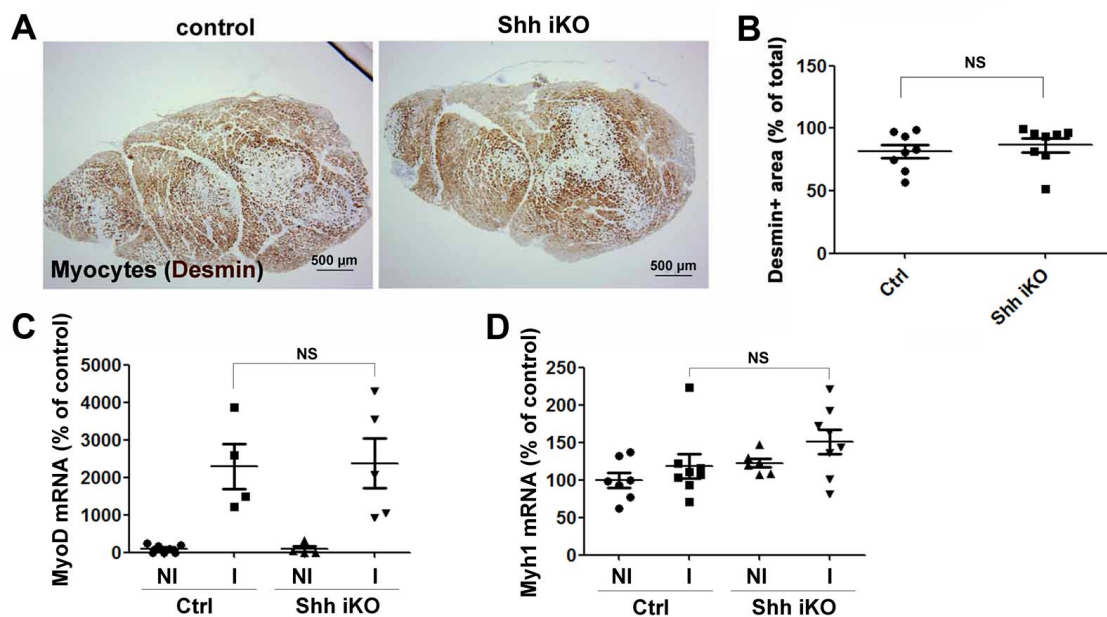
- Losordo DW, Dimmeler S. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation* 2004;**109**:2487–2491.
- Roncalli J, Tongers J, Renault MA, Losordo DW. Biological approaches to ischemic tissue repair: gene- and cell-based strategies. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2008;**6**: 653–668.
- Katoh M. WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine. *Curr Drug Targets* 2008;**9**:565–570.
- Sahlgren C, Lendahl U. Notch signaling and its integration with other signaling mechanisms. *Regen Med* 2006;**1**:195–205.
- Lavine KJ, Kovacs A, Ornitz DM. Hedgehog signaling is critical for maintenance of the adult coronary vasculature in mice. *J Clin Invest* 2008;**118**:2404–2414.
- Pola R, Ling LE, Arahamian TR, Barban E, Bosch MM, Curry C, Corbley M, Kearney M, Isner JM, Losordo DW. Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia. *Circulation* 2003;**108**:479–485.
- Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T, Isner JM. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med* 2001;**7**:706–711.
- Kusano KF, Pola R, Murayama T, Curry C, Kawamoto A, Iwakura A, Shintani S, Ii M, Asai J, Tkebuchava T, Thorne T, Takenaka H, Aikawa R, Goukassian D, von Samson P, Hamada H, Yoon YS, Silver M, Eaton E, Ma H, Heyd L, Kearney M, Munger W, Porter JA, Kishore R, Losordo DW. Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat Med* 2005;**11**: 1197–1204.
- Maun HR, Wen X, Lingel A, de Sauvage FJ, Lazarus RA, Scales SJ, Hymowitz SG. Hedgehog pathway antagonist 5E1 binds hedgehog at the pseudo-active site. *J Biol Chem* 2010;**285**:26570–26580.
- Renault M-A, Chapouly C, Yao Q, Larriem-Lahargue F, Vandierdonck S, Reynaud A, Petit M, Jaspard-Vinassa B, Belloc I, Traiffort E, Ruat M, Duplax C, Couffignal T, Desgranges C, Gadeau A-P. Desert hedgehog promotes ischemia-induced angiogenesis by ensuring peripheral nerve survival. *Circ Res* 2013;**112**:762–770.
- Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 2000;**127**:4775–4785.
- Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development* 2001;**128**:5099–5108.
- Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 2007;**45**:593–605.
- Schuler M, Ali F, Metzger E, Chambon P, Metzger D. Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse. *Genesis* 2005;**41**:165–170.
- Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R, Forster I. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 1999;**8**: 265–277.
- Hameyer D, Loonstra A, Eshkind L, Schmitt S, Antunes C, Groen A, Bindels E, Jonkers J, Krimpenfort P, Meuwissen R, Rijswijk L, Bex A, Berns A, Bockamp E. Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues. *Physiol Genomics* 2007;**31**:32–41.
- Claxton S, Kostourou V, Jadeja S, Chambon P, Hodivala-Dilke K, Fruttiger M. Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. *Genesis* 2008;**46**:74–80.
- Couffignal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzensbichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol* 1998;**152**:1667–1679.
- Oses P, Renault MA, Chauvel R, Leroux L, Allieres C, Seguy B, Lamaziere JM, Dufourcq P, Couffignal T, Duplax C. Mapping 3-dimensional neovessel organization steps using micro-computed tomography in a murine model of hindlimb ischemia: brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;**29**:2090–2092.
- Renault MA, Vandierdonck S, Chapouly C, Yu Y, Qin G, Metras A, Couffignal T, Losordo DW, Yao Q, Reynaud A, Jaspard-Vinassa B, Belloc I, Desgranges C, Gadeau

- AP. Gli3 regulation of myogenesis is necessary for ischemia-induced angiogenesis. *Circ Res* 2013;**113**:1148–1158.
21. Roncalli J, Renault MA, Tongers J, Misener S, Thorne T, Kamide C, Jujo K, Tanaka T, Li M, Klyachko E, Losordo DW. Sonic hedgehog-induced functional recovery after myocardial infarction is enhanced by AMD3100-mediated progenitor-cell mobilization. *J Am Coll Cardiol* 2011;**57**:2444–2452.
 22. Yao Q, Renault MA, Chapouly C, Vandierdonck S, Belloc I, Jaspard-Vinassa B, Daniel-Lamaziere JM, Laffargue M, Merched A, Desgranges C, Gadeau AP. Sonic hedgehog mediates a novel pathway of PDGF-BB-dependent vessel maturation. *Blood* 2014;**123**:2429–2437.
 23. Straface G, Aprahamian T, Flex A, Gaetani E, Biscetti F, Smith RC, Pecorini G, Pola E, Angelini F, Stigliano E, Castellot JJ Jr, Losordo DW, Pola R. Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration. *J Cell Mol Med* 2009;**13**:2424–2435.
 24. Bijlma MF, Leenders PJ, Janssen BJ, Peppelenbosch MP, Ten Cate H, Spek CA. Endogenous hedgehog expression contributes to myocardial ischemia-reperfusion-induced injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 2008;**233**:989–996.
 25. Rowitch DH, B SJ, Lee SM, Flax JD, Snyder EY, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells. *J Neurosci* 1999;**19**:8954–8965.
 26. Chiang C, Litingtung Y, Lee E, Young KE, Corden JL, Westphal H, Beachy PA. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 1996;**383**:407–413.
 27. van Tuyl M, Groenman F, Wang J, Kuliszewski M, Liu J, Tibboel D, Post M. Angiogenic factors stimulate tubular branching morphogenesis of sonic hedgehog-deficient lungs. *Dev Biol* 2007;**303**:514–526.
 28. Vokes SA, Yatskevych TA, Heimark RL, McMahon J, McMahon AP, Antin PB, Krieg PA. Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development* 2004;**131**:4371–4380.
 29. Byrd N, Becker S, Maye P, Narasimhaiah R, St-Jacques B, Zhang X, McMahon J, McMahon A, Grabel L. Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. *Development* 2002;**129**:361–372.
 30. Outram SV, Varas A, Picicelli CV, Crompton T. Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Immunity* 2000;**13**:187–197.
 31. Shah DK, Hager-Theodorides AL, Outram SV, Ross SE, Varas A, Crompton T. Reduced thymocyte development in sonic hedgehog knockout embryos. *J Immunol* 2004;**172**:2296–2306.
 32. Omenetti A, Syn WK, Jung Y, Francis H, Porrello A, Witek RP, Choi SS, Yang L, Mayo MJ, Gershwin ME, Alpini G, Diehl AM. Repair-related activation of hedgehog signaling promotes cholangiocyte chemokine production. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2009;**50**:518–527.
 33. Syn WK, Oo YH, Pereira TA, Karaca GF, Jung Y, Omenetti A, Witek RP, Choi SS, Guy CD, Fearing CM, Teaberry V, Pereira FE, Adams DH, Diehl AM. Accumulation of natural killer T cells in progressive nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2010;**51**:1998–2007.
 34. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, Sabbagh M, Wosik K, Bourbonniere L, Bernard M, van Horssen J, de Vries HE, Charron F, Prat A. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* 2011;**334**:1727–1731.
 35. van Dop WA, Heijmans J, Buller NV, Snoek SA, Rosekrans SL, Wassenberg EA, van den Bergh Weerman MA, Lanske B, Clarke AR, Winton DJ, Wijgerde M, Offerhaus GJ, Hommes DW, Hardwick JC, de Jonge WJ, Biemond I, van den Brink GR. Loss of Indian Hedgehog activates multiple aspects of a wound healing response in the mouse intestine. *Gastroenterology* 2010;**139**:1665–1676. 1676.e1661–1610.
 36. Zacharias WJ, Li X, Madison BB, Kretovich K, Kao JY, Merchant JL, Gumucio DL. Hedgehog is an anti-inflammatory epithelial signal for the intestinal lamina propria. *Gastroenterology* 2010;**138**:2368–2377. 2377.e2361–2364.
 37. Schumacher MA, Donnelly JM, Engevik AC, Xiao C, Yang L, Kenny S, Varro A, Hollande F, Samuelson LC, Zavros Y. Gastric Sonic Hedgehog acts as a macrophage chemoattractant during the immune response to *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology* 2012;**142**:1150–1159. e1156.
 38. Furmanski AL, Saldana J, Ono M, Sahni H, Paschalidis N, D'Acquisto F, Crompton T. Tissue-derived hedgehog proteins modulate Th differentiation and disease. *J Immunol* 2013;**190**:2641–2649.
 39. Zhou X, Liu Z, Jang F, Xiang C, Li Y, He Y, Castresana JS. Autocrine Sonic hedgehog attenuates inflammation in cerulein-induced acute pancreatitis in mice via upregulation of IL-10. *PLoS One* 2012;**7**:e44121.
 40. Choi YE, Cha YR, Lee KM, Kim HJ, Yoon CH. Proangiogenic cells enhanced persistent and physiologic neovascularization compared with macrophages. *Exp Mol Med* 2015;**47**:e186.
 41. Carmeliet P, Jain RK. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2011;**10**:417–427.
 42. Arpino J-M, Nong Z, Li F, Yin H, Ghonaim N, Milkovich S, Balint B, O'neil C, Fraser GM, Goldman D, Ellis CG, Pickering JG. Four-dimensional microvascular analysis reveals that regenerative angiogenesis in ischemic muscle produces a flawed microcirculation. *Circ Res* 2017;**120**:1453–1465.
 43. Pereira TA, Xie G, Choi SS, Syn WK, Voietta I, Lu J, Chan IS, Swiderska M, Amaral KB, Antunes CM, Secor WE, Witek RP, Lamberti JR, Pereira FL, Diehl AM. Macrophage-derived Hedgehog ligands promotes fibrogenic and angiogenic responses in human schistosomiasis mansoni. *Liver Int* 2013;**33**:149–161.
 44. Azzi S, Treps L, Leclair HM, Ngo HM, Harford-Wright E, Gavard J. Desert Hedgehog/Patch2 axis contributes to vascular permeability and angiogenesis in glioblastoma. *Front Pharmacol* 2015;**6**:281.

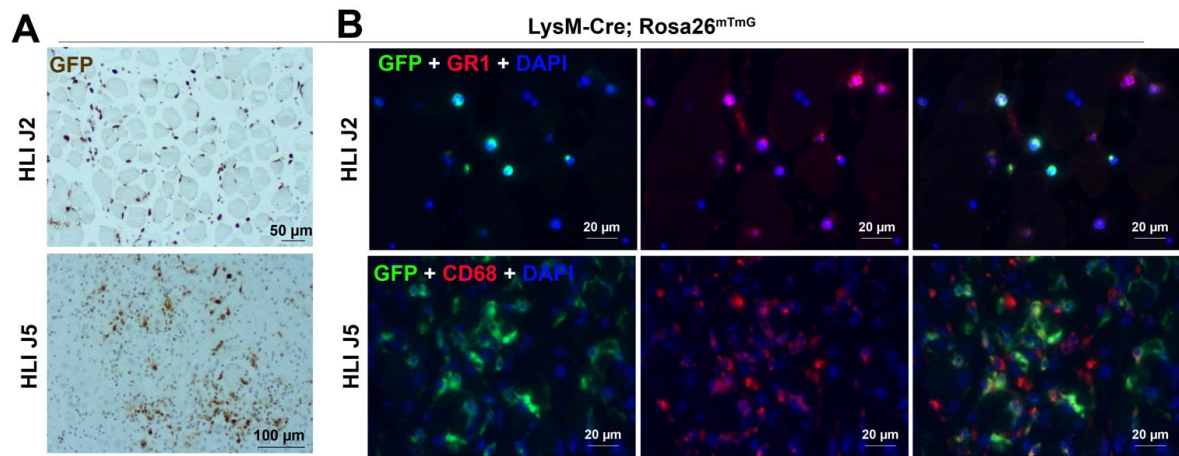
Données supplémentaires

Supplemental Table 1: PCR primer list

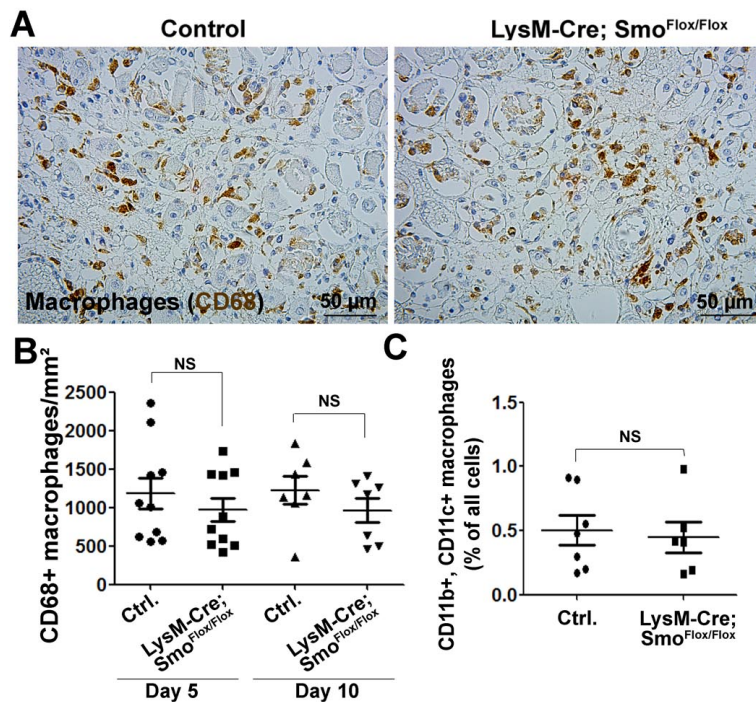
mouse Shh	F	5'-GTCGAGCAGTGGACATCACC-3'
	R	5'-GAAACAGCCGCCGGATTTGG-3'
mouse MyoD	F	5'-GGCTACGACACCGCCTACTA-3'
	R	5'-CTGGGTTCCCTGTTCTGTGT-3'
mouse Myh1	F	5'-TGAGGAAGCGGAGGAACAAT-3'
	R	5'-GTCACCTTCCTGCACTTGGAT-3'
mouse Ccl2	F	5'-ATCCCAATGAGTAGGCTGGAGAGC-3'
	R	5'-GAAGTGCTTGAGGTGGTTGTGG-3'
mouse Ccl5	F	5'-CCTTCGAGTGACAAACACGA-3'
	R	5'-CCCTCACCATCATCCTCACT-3'
mouse VEGFA	F	5'-CTCCAGGGCTTCATCGTTA-3'
	R	5'-CAGAAGGAGAGCAGAAGTCC-3'
mouse Gli1	F	5'-GAAGGAATTCGTGTGCCATT-3'
	R	5'-GCAACCTTCTTGCTCACACA-3'
mouse Gli2	F	5'-CTTGGAGGACAGCAGCTTCC-3'
	R	5'-CTGTGGACAGAGTGAGGGTC-3'
mouse HPRT	F	5'-TCAAATCCCTGAAGTACTCAT-3'
	R	5'-AGGACCTCTCGAAGTGT-3'



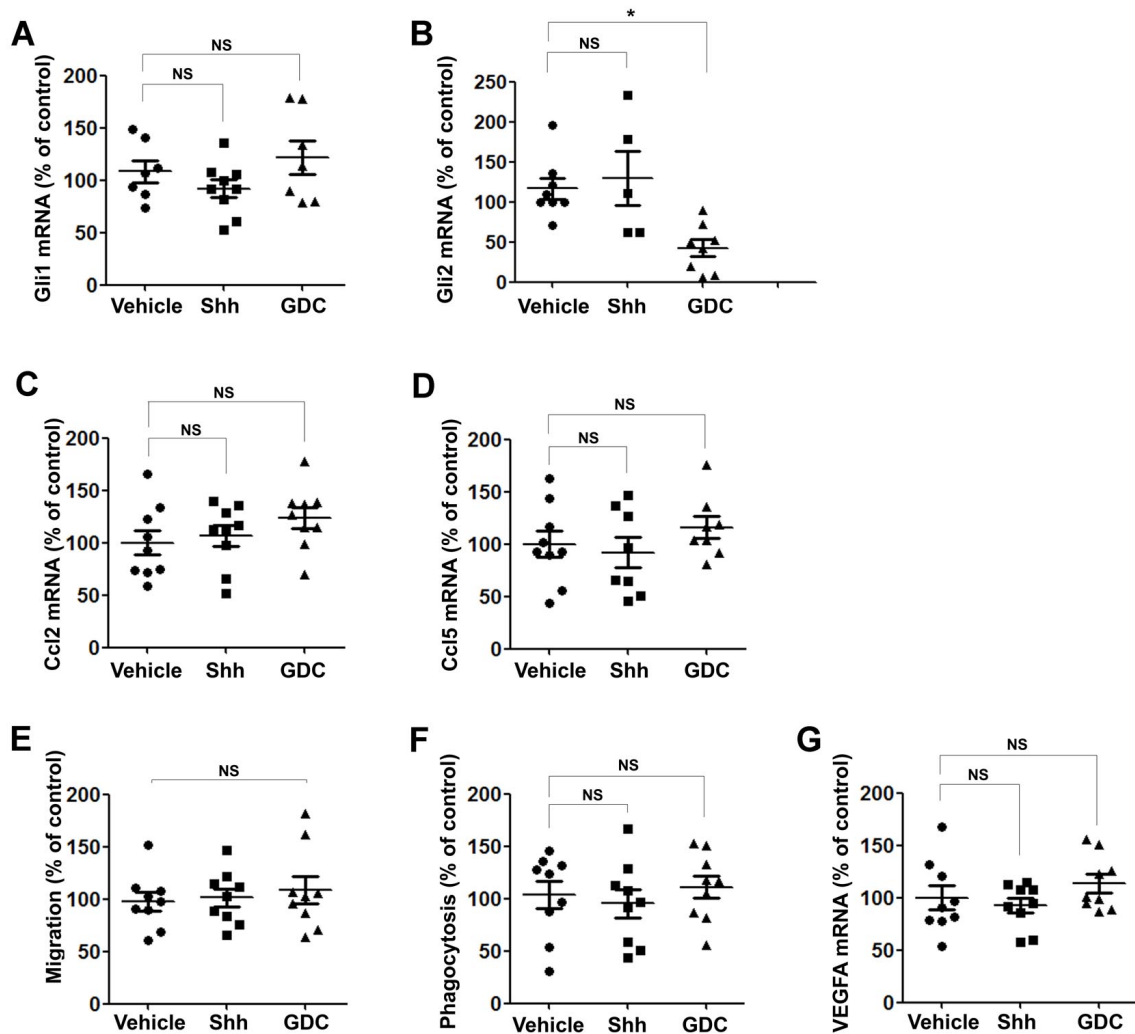
Supplemental Figure 1: *Shh* does not participate in ischemia-induced myogenesis. Rosa26-Cre^{ERT2}; Shh^{Flox/Flox} mice (Shh iKO) and their control littermates (Shh^{Flox/Flox} mice) underwent HLI surgery. Mice were sacrificed 5 and 10 days later. (A) Ischemic tibialis anterior muscle cross sections were immuno-stained with anti-Desmin antibodies to identify myocytes. (B) Myogenesis was quantified as the percentage of Desmin + surface area (n=8 mice in each group). (C-D) Rosa26-Cre^{ERT2}; Shh^{Flox/Flox} mice (Shh iKO) and their control littermates (Shh^{Flox/Flox} mice) underwent HLI surgery. (C) MyoD mRNA and (D) Myh1 mRNA expression were evaluated by real time RT-PCR, 5 days (for MyoD) and 10 days (for Myh1) after HLI surgery was performed in both the ischemic and non-ischemic tibialis anterior muscle (Day 5: n=5 in each group. Day 10 n=7 mice in each group). NI: not ischemic, I: ischemic; NS: not significant, (A) Mann-Whitney test, (C-D) One way ANOVA.



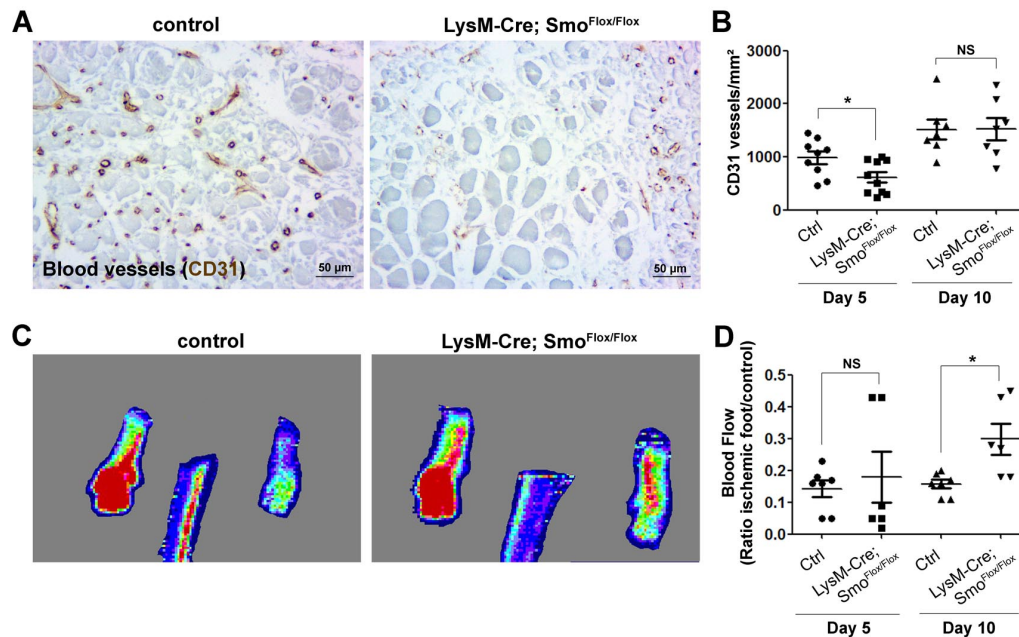
Supplemental Figure 2: LysM-Cre; Rosa26^{mTmG} mice underwent HLI surgery. Mice were sacrificed 2 or 5 days later. Ischemic tibialis anterior muscle cross sections were (A) immunostained with anti-GFP antibodies alone (brown staining) or (B) co-stained with anti-GFP (in green) and anti-GR1 or CD68 antibodies (in red).



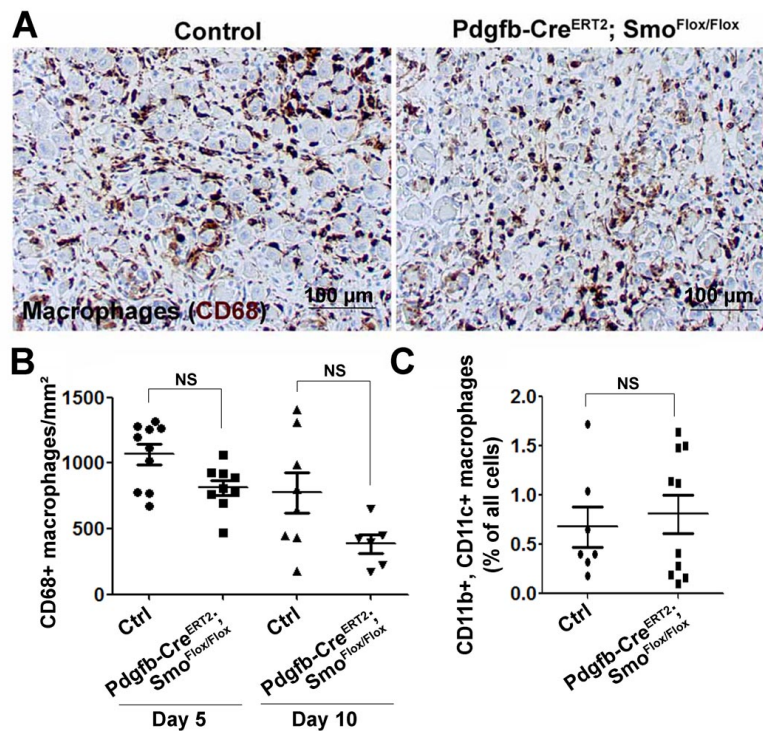
Supplemental Figure 3: Macrophages accumulation is not due to impaired Hh signalling in macrophages. LysM-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox} mice and their control littermates underwent HLI surgery. Mice were sacrificed 5 and 10 days later. (A) Ischemic tibialis anterior muscle cross sections were immuno-stained with anti-CD68 antibodies to identify macrophages. Representative images of muscle sections from mice sacrificed 5 days after surgery are shown. (B) Macrophage density was quantified as the number of CD68 + cells per mm² (Days 5: n=10 in each group. Day 10: n=7 in each group). (C) Macrophages infiltrated in the ischemic muscle were counted by FACS analysis using anti-CD11c and anti-CD11b antibodies (n=7 control, n=6, LysM-Cre; Smo^{Flox/Flox}). NS: not significant, Mann-Whitney test.



Supplemental Figure 4: (A-D) RAW 264.7 macrophages were either treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ Shh or 30 nM GDC-0449 for 24 hours. (A) Gli1, (B) Gli2, (C) Ccl2 and (D) Ccl5 mRNA expression were evaluated by RT-qPCR and normalized to HPRT mRNA expression (n=9 per condition). (E) RAW 264.7 cells were seeded in the upper chamber of a Boyden chamber. The lower chamber contained either 1 $\mu\text{g/mL}$ Shh or 30 nM GDC-0449. Migration was assessed 6 hours later (n=9 per condition). (F-G) RAW 264.7 macrophages were either treated with 1 $\mu\text{g/mL}$ Shh or 30 nM GDC-0449 for 24 hours. (F) Cells were incubated with FITC labelled Zymozan A particules for 1 hour at 37°C. Phagocytosis was quantified as the ratio of FITC positive surface area over the number of DAPI positive nuclei (n=9 per condition). (G) VEGFA mRNA expression were evaluated by RT-qPCR and normalized to HPRT mRNA expression (n=9 per condition). *: $p < 0.05$, NS: not significant, One way ANOVA.



Supplemental Figure 5: (A) LysM-Cre; Smo^{Flox/Flox} mice and their control littermates (Smo^{Flox/Flox} mice) underwent HLI surgery. Mice were sacrificed 5 and 10 days later. (A) Ischemic tibialis anterior muscle cross sections were immuno-stained with anti-CD31 antibodies to identify blood vessels. Representative images of muscle sections from animals sacrificed 5 days after surgery are shown. (B) Capillary density was quantified as the number of CD31+ vessels per mm² (Day 5: n=9 control, n=10 LysM-Cre; Smo^{Flox/Flox}. Day 10: n=7 in each group). (C) Foot perfusion was measured via LDPI. Representative perfusion images obtained 10 days after surgery are shown. (D) Blood flow was quantified as the ratio of blood flow in the ischemic foot versus not ischemic foot 5 and 10 days after HLI surgery was performed (Day 5: n=6 in each group. Day 10: n=6 control, n=7 LysM-Cre; Smo^{Flox/Flox}). *: p<0.05, NS: not significant, Mann-Whitney test.



Supplemental Figure 6: Macrophage accumulation is not due to impaired Hh signalling in ECs Pdgfb-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox} mice and their control littermates underwent HLI surgery. Mice were sacrificed 5 and 10 days later. (A) Ischemic tibialis anterior muscle cross sections were immuno-stained with anti-CD68 antibodies to identify macrophages. Representative images of muscle sections from animals sacrificed 5 days after surgery are shown. (B) Macrophage density was quantified as the number of CD68 + cells per mm² (For day 5: n=10 control, n=9 Pdgfb-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox}. For day 10: n=7 control, n=6 Pdgfb-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox}). (C) Macrophages infiltrated in the ischemic muscle were double stained with anti-CD11c (n=7 control, n=10 Pdgfb-Cre^{ERT2}; Smo^{Flox/Flox}). NS: not significant, Mann-Whitney test.

2. Restaurer la fonction endothéliale en ciblant Desert Hedgehog en aval de Klf2 améliore le phénotype d'ischémie critique de membre chez l'adulte

Molecular Medicine

Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults

Caroline Caradu, Thierry Couffinhal, Candice Chapouly, Sarah Guimbal, Pierre-Louis Hollier, Eric Ducasse, Alessandra Bura-Rivière, Mathilde Dubois, Alain-Pierre Gadeau, Marie-Ange Renault

Rationale: Klf (kruppel-like factor) 2 is critical to establish and maintain endothelial integrity.

Objective: Therefore, determining upstream and downstream mediators of Klf2 would lead to alternative therapeutic targets in cardiovascular disease management.

Methods and Results: Here we identify Dhh (desert hedgehog) as a downstream effector of Klf2, whose expression in endothelial cells (ECs) is upregulated by shear stress and decreased by inflammatory cytokines. Consequently, we show that Dhh knockdown in ECs promotes endothelial permeability and EC activation and that Dhh agonist prevents TNF- α (tumor necrosis factor alpha) or glucose-induced EC dysfunction. Moreover, we demonstrate that human critical limb ischemia, a pathological condition linked to diabetes mellitus and inflammation, is associated to major EC dysfunction. By recreating a complex model of critical limb ischemia in diabetic mice, we found that Dhh-signaling agonist significantly improved EC function without promoting angiogenesis, which subsequently improved muscle perfusion.

Conclusion: Restoring EC function leads to significant critical limb ischemia recovery. Dhh appears to be a promising target, downstream of Klf2, to prevent the endothelial dysfunction involved in ischemic vascular diseases. (*Circ Res.* 2018;123:1053-1065. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313177.)

Key Words: endothelial cells ■ hedgehogs ■ inflammation ■ peripheral arterial disease ■ therapeutics

Downloaded from <http://ahajournals.org> by on October 12, 2018

Endothelium integrity is essential to vascular homeostasis because a failure of this system represents a critical factor in cardiovascular and cerebrovascular disease pathogenesis. Indeed, the endothelium is involved in many physiological processes such as vascular permeability, vascular tone, blood coagulation, and regulation, as well as homing of immune cells to specific sites of the body. Conversely, endothelial dysfunction is associated with excessive vasoconstriction, especially because of impaired endothelial nitric oxide (NO) production. Also, endothelial dysfunction is characterized by abnormal vascular leakage because of altered endothelial intercellular junctions. Finally, dysfunctional endothelial cells (ECs) acquire proinflammatory and prothrombotic phenotypes by expressing increased levels of adhesion and prothrombotic molecules such as VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) and ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1).

**In This Issue, see p 1009
Meet the First Author, see p 1010**

Endothelial dysfunction is known to be associated with cardiovascular risk factors, including age, diabetes mellitus, obesity, and hypertension. More specifically, it is induced by disturbed blood flow, proinflammatory cytokines, or high glucose levels.

However, molecular events triggering endothelial dysfunction remain poorly characterized. As such, the transcription factor Klf (kruppel-like factor) 2 is proposed as a critical regulator of endothelial identity and function in adults. Indeed, Klf2, known to be downregulated by disturbed blood flow, high glucose, or inflammatory cytokines, has been shown to be necessary for endothelial barrier function,¹ endothelial NO synthase expression, and endothelial quiescence, by inhibiting EC activation² and angiogenesis.³

Interestingly, a paper from Ni et al⁴ published in 2010 identifies Dhh (desert hedgehog) and Klf2 as mechanosensitive genes modulated in mouse carotid artery endothelium when exposed to disturbed flow.

Dhh, together with Shh (sonic hedgehog) and Ihh (Indian hedgehog), belongs to the Hh (hedgehog) family of morphogens identified nearly 4 decades ago in *Drosophila* as crucial regulators of cell fate determination during embryogenesis.⁵ The interaction of Hh proteins with their specific receptor Ptch1 (patched-1) derepresses the transmembrane protein Smo (smoothed), which activates downstream pathways, including the Hh canonical pathway leading to the activation of Gli (gli family zinc finger) transcription factors and so-called Hh noncanonical pathways, which are independent of Smo and Gli.⁶ Activation of the

In August 2018, the average time from submission to first decision for all original research papers submitted to *Circulation Research* was 12.62 days. From the Inserm U1034, Biology of Cardiovascular Diseases, CHU de Bordeaux, Pessac, France (C. Caradu, T.C., C. Chapouly, S.G., P.-L.H., E.D., A.-P.G., M.-A.R.); Inserm U1045, Centre de recherche Cardio-thoracique, University of Bordeaux, France (M.D.); and Service de Médecine Vasculaire, CHU de Toulouse, France (A.B.-R.).

The online-only Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/CIRCRESAHA.118.313177>. Correspondence to Marie-Ange Renault, INSERM U1034, 1, avenue de Magellan 33604 Pessac, France. Email marie-ange.renault@inserm.fr

© 2018 American Heart Association, Inc.

Circulation Research is available at <https://www.ahajournals.org/journal/res>

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313177

Novelty and Significance

What Is Known?

- Therapeutic angiogenesis has failed to improve the prognosis of patients with critical limb ischemia.
- Cardiovascular risk factors promote microvessel dysfunction.

What New Information Does This Article Contribute?

- Human critical limb ischemia is associated with dysfunctional capillaries rather than a decreased capillary density.
- Improving endothelial dysfunction in mice enhances ischemic skeletal muscle perfusion and prevents myopathy.

The present study identifies a novel actor of endothelial function, that is, Dhh (Desert Hedgehog), a downstream target of Klf2

(Kruppel-like factor 2). We demonstrate that in adults Dhh is expressed in endothelial cells and that its expression, as well as that of Klf2, is upregulated by shear stress but downregulated by inflammatory cytokines. Moreover, Dhh deficiency induces endothelial cell activation and capillary leakage as a result of adherens junction impairment. Because Dhh agonists can ameliorate endothelial cell function in high glucose or inflammatory conditions, we hypothesized that CLI is a result of microvessel dysfunction, rather than a decreased capillary density—an assumption that was confirmed by our assessment of human CLI muscle biopsies. Finally, *in vitro* and in preclinical models, using currently available Dhh agonists, we demonstrate that improving endothelial cell function is an effective strategy to enhance ischemic muscle perfusion and repair.

Nonstandard Abbreviations and Acronyms

Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2
Ccl2	chemokine ligand 2
Cdh5	cadherin-5
CLI	critical limb ischemia
Dhh	desert hedgehog
ECs	endothelial cells
Gli	gli family zinc finger
Hh	hedgehog
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
Ihh	Indian hedgehog
IL-6	interleukin-6
Klf	kruppel-like factor
Mrc1	mannose receptor C-type 1
Mycn	v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived
MyoG	myogenin
NO	nitric oxide
Ptch1	patched-1
SAG	Smo agonist
Shh	sonic hedgehog
Smo	smoothened
SOD2	superoxide dismutase
TNF-α	tumor necrosis factor alpha
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF-A	vascular endothelial growth factor-A

Hh canonical pathway promotes cell survival and proliferation through the regulation of Bcl2 (B-cell leukemia/lymphoma 2), Mycn (v-myc avian myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived), and CyclinD1, while the noncanonical signaling has been involved in cell migration.

Within the past decades, accumulating evidences suggest that the Hh signaling is essential for microvessel integrity, especially at the blood-brain barrier^{7–10}; moreover, we recently demonstrated that knocking down Smo specifically in ECs leads to blood-nerve barrier breakdown in adult mice.¹¹ This highlights the endothelial Hh-driven regulation of neurovascular barriers.

Additionally, we and others reported that Dhh downregulation is associated to cardiovascular risk factors, such as age, diabetes mellitus, and obesity both in rodents^{11–13} and in human.¹⁴

Therefore, we hypothesized that endothelial-derived Dhh, through an autocrine signalization downstream of Klf2, is critical to maintain vascular integrity in adults. To verify our hypothesis, we first performed experiments identifying EC-derived Dhh as a crucial actor in maintaining EC intercellular junction integrity and immune quiescence. In addition, we explored the therapeutic potential of the Dhh-Klf2 axis in ECs; to do so, we pharmacologically restored Dhh activity at the endothelium to regain EC function to significantly improve critical limb ischemia (CLI).

Methods

The authors declare that all supporting data are available within the article.

Human Tissue Samples

Human muscle tissues were retrieved from a library of tissues collected for a hospital clinical research program entitled Critical Ischemia of Inferior Limbs: Metabolic, Morphological and Immunohistochemical Characterization of the Involved Tissues and Hedgehog Signaling and Human Ischemic Disease. The institutional review board of each center approved the study methodology and design, and all patients provided their consent to participate in the study, after receiving written information (see [Online Data Supplement](#) for more details).

Mice

C57BL/6J mice were obtained from Charles River Laboratories and bred in our animal facility. Dhh-floxed mice (Online Figure IA) were generated at the Institut Clinique de la Souris through the International Mouse Phenotyping Consortium from a vector generated by the European conditional mice mutagenesis program. Smo-floxed (Smo^{Fllox}) mice¹⁵ and Rosa26^{mTmG} mice¹⁶ were obtained from Jackson Laboratories. Pdgfb-Cre^{ERT2} mice¹⁷ and Cdh5-Cre^{ERT2} mice¹⁸ were a gift from M. Fruttiger and R.H. Adams, respectively.

Animal experiments were performed in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the local Animal Care and Use Committee of Bordeaux University.

Streptozotocin Treatment

Diabetes mellitus was induced in 6-week-old male C57BL/6 mice using the low-dose streptozotocin induction protocol as described in the [Online Data Supplement](#).

Hindlimb Ischemia Models and Assessments

Hindlimb ischemia was induced by sequential ligation of the femoral and iliac arteries at day 0 and day 4, as previously described¹⁹ (see [Online Data Supplement](#) for more details). To minimize pain caused by the surgery, mice were administered subcutaneously with 0.05 mg/kg buprenorphin 30 minutes before and 8 hours after surgery.

To assess proliferation, mice were injected intraperitoneally with 50 mg/kg BrdU (Sigma) 24 hours before sacrifice. For assessment of muscle hypoxia, mice were administered intraperitoneally with 60 mg/kg pimonidazole HCL (Hypoxprobe Inc) 1 hour before sacrifice. To assess capillary perfusion, mice were administered intravenously with 50 μ L fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled BSI-lectin (vector) 30 minutes before sacrifice.

Mice were sacrificed by cervical dislocation 28 days after surgery. To assess histological analyses and gene expression, the tibialis anterior muscle was harvested and cut in half. The lower half was fixed in methanol, paraffin embedded, and cut into 7 μ m sections, and the upper half was snap-frozen in liquid nitrogen. Each group included at least 6 animals. Only mice in which there was histological evidence of ischemia in the tibialis anterior muscle (revealed by hematoxylin and eosin staining) were included in the study.

In Vivo Permeability Assessment

To quantify vascular permeability, mice were injected in the tail vein with 50 μ L 25 mg/mL 70 kDa FITC dextran 30 minutes before sacrifice. Microscopic visualization of FITC dextran extravasation was performed on paraffin-embedded tissue sections.

Lung Edema Assessment

Lung edema was quantified using the wet/dry weight ratio. The wet weight was measured immediately after the lung was harvested, whereas the dry weight was measured after the lung was incubated for 72 hours at 85°C.

EC Isolation From Mouse Tissue

Ischemic tibialis anterior muscles or healthy muscles were dissociated in 2 mg/mL type 4 collagenase for 1 hour at 37°C under agitation and subsequently filtrated on 70 and 40 μ m cell strainers. ECs were labeled using rat anti-CD31 antibodies (BD Pharmingen Inc) and rat anti-Endoglin antibodies (Santa Cruz Biotechnology), then purified using anti-rat IgG MicroBeads (Miltenyi biotec) and MACS Cell Separation Columns (Miltenyi biotec) according to manufacturer's instruction.

Wire Myography

Femoral arteries, dissected and segmented (1.8–2.0 mm length), were mounted using 2 tungsten threads in a Mulvany myograph (Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) as previously described²⁰ (see [Online Data Supplement](#) for more details).

Corneal Angiogenesis

Corneal angiogenesis was assessed as previously described²¹ (See [Online Data Supplement](#) for more details).

Immunostaining

Before staining, cells were fixed with 100% methanol for 10 minutes. Thoracic aortas were fixed with 10% formalin for 10 minutes immediately after they were harvested, washed with PBS, cleaned, and opened longitudinally. Muscle, heart, brain, and lung tissues were fixed in methanol, paraffin embedded, and cut into 7- μ m-thick sections. Antibodies are fully described in the [Online Data Supplement](#).

Quantitative Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction

Following manufacturer's instructions, RNAs were isolated and homogenized, from 3 \times 10⁵ cells or from skeletal muscle previously snap-frozen in liquid nitrogen, using Tri Reagent (Molecular Research Center Inc). For quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction analyses, total RNA was reverse transcribed with Moloney Murine leukemia virus reverse transcriptase (Promega),

and amplification was performed on a DNA Engine Opticon2 (MJ Research Inc) using B-R SYBER Green SuperMix (Quanta Biosciences). Primer sequences are reported in [Online Table I](#). The relative expression of each mRNA was calculated by the comparative threshold cycle method and normalized to β -actin mRNA expression.

Cell Culture

In vitro experiments were performed using human umbilical vein ECs (Lonza) or human dermal microvascular ECs (Lonza). Human umbilical vein ECs were cultured in endothelial basal medium-2 supplemented with EGM-2 BulletKits (Lonza), whereas human dermal microvascular ECs were cultured in endothelial basal medium-2 medium supplemented with EGM-2MV BulletKit (Lonza). HeLa ATCC CCL-2 cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Before any treatment, cells were serum starved in 0.5% fetal bovine serum medium for 24 hours. Cell culture assays and plasmids are described in the [Online Data Supplement](#).

Statistics

Results are reported as mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed for significance with the nonparametric Mann-Whitney U test or the Kruskal-Wallis test (for than 2 groups) using GraphPad Prism v7.0 (GraphPad Inc, San Diego, Calif). Differences between groups were considered significant when $P\leq 0.05$ (* $P\leq 0.05$; ** $P\leq 0.01$; *** $P\leq 0.001$).

Results

Dhh Is Expressed in Adult ECs

In embryos, Dhh expression has previously been established in Schwann cells, Sertoli cells, and ECs.²² Nevertheless, until now, the role of EC-derived Dhh has never been investigated.

Therefore, we decided to start our project by screening for Dhh expression in adult ECs from various organs and found that Dhh mRNA is enriched in the CD31⁺ fractions of adult mouse brain, heart, and lungs (Figure 1A). Additionally, we showed by immunostaining that Dhh protein is expressed by ECs in human adult skeletal muscle (Figure 1B). Moreover, while detecting low level of Ihh mRNAs consistent with previous literature,²³ Shh mRNA expression was barely detectable in cultured ECs (Figure 1C), attesting that Dhh is the main Hh ligand expressed by ECs.

Dhh Is a Downstream Target of Klf2 Regulated by Proinflammatory Factors and Flow Conditions

Then, we investigated mechanisms that control Dhh expression in ECs and found that Dhh is specifically downregulated by inflammatory cytokines including TNF- α (tumor necrosis factor alpha) and IL (interleukin)-1 β and by oxidative stress (H₂O₂; Figure 1D). On the contrary, Dhh mRNA expression is significantly increased in ECs cultured under flow conditions (Figure 1E).

To investigate the molecular mechanisms involved in TNF- α -induced Dhh downregulation, we cloned the human Dhh promoter and performed gene reporter assays. We found that the Dhh promoter region regulated by TNF- α is included between base pair -124 and base pair -54 of the Dhh promoter (Figure 2A). Interestingly, within this promoter region, MatInspector software (Genomatix) identified 2 guanine, cytosine (GC)-rich regions potentially recognized by Klf2. We next verified that Klf2 is able to activate the Dhh promoter (Figure 2B). Indeed, Klf2 activates all Dhh promoter constructs, except for the -54 Dhh prom

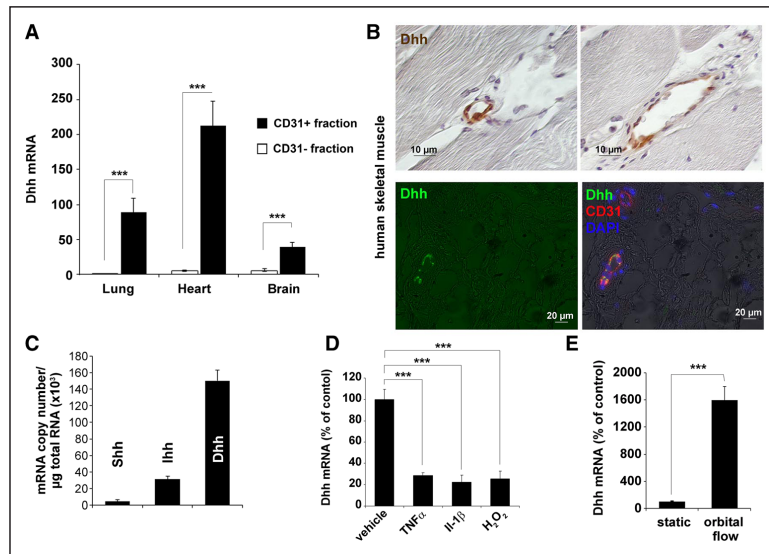


Figure 1. Dhh is expressed by adult endothelial cells (ECs). **A**, ECs from mouse brain, heart, and lungs were labeled with anti-CD31 antibodies and magnetically sorted. Dhh mRNA expression was measured via RT-qPCR (reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction) in both CD31⁺ and CD31⁻ fractions (n=4 mice/group). **B**, Human skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-Dhh antibodies (in brown or green). ECs were identified using anti-CD31 antibodies. **C**, Shh (sonic hedgehog), Ihh (Indian hedgehog), and Dhh (desert hedgehog) mRNAs were quantified via RT-qPCR in human umbilical vein ECs (HUVECs). The experiment was repeated 3 \times , each experiment included triplicates. **D**, HUVECs were treated or not with 10 ng/mL TNF- α (tumor necrosis factor alpha), 10 ng/mL IL (interleukin)-1 β , and 100 mmol/L H₂O₂ for 6 h. Dhh mRNA was quantified by RT-qPCR. **E**, ECs were cultured under static or orbital flow condition. Dhh mRNA was quantified by RT-qPCR. ***P<0.001, Mann-Whitney U test.

plasmid which does not include the 2 GC-rich regions potentially bound by Klf2 (Figure 2C). To confirm the role of these 2 GC-rich regions, located at base pair -74 (GC rich 1) and base pair -59 (GC rich 2) in mediating Klf2-induced Dhh promoter activation, we mutated each of these *cis*-regulating sequences (Figure 2D). As shown in Figure 2E, Klf2 is not able to activate the -124 Dhh prom plasmid when GC-rich 1 and GC-rich 2 sequences are mutated. Finally, to confirm the essential role of Klf2 in promoting Dhh expression in ECs, we downregulated Klf2 expression in human umbilical vein ECs through small interfering RNA transfection and found that Klf2 knockdown significantly inhibits Dhh expression in ECs (Figure 2F).

Altogether, these results demonstrate that Dhh is a direct transcriptional target of Klf2 in ECs and that Dhh expression is modulated by inflammation and disturbed flow.

EC-Derived Dhh Is a Critical Regulator of Endothelium Integrity

We then hypothesized that Dhh may mimic some of the Klf2 effects on EC function. Therefore, we performed cell culture assays in which Dhh expression was knocked down using small interfering RNAs. When Dhh expression is downregulated in ECs, Cdh5 (cadherin-5)-dependent junctions are altered and display a zig-zag phenotype (Figure 3A). Accordingly, Cdh5 interaction with β -catenin is significantly reduced, (Figure 3B) and EC monolayer permeability to 70-kDa FITC dextran is significantly increased (Figure 3C). The role of Dhh in maintaining adherens junction was then

verified *in vivo* in mice in which Dhh expression has been specifically knocked out in ECs, that is, Pdgfb-cre^{ERT2}; Dhh^{Flox/Flox} mice (Dhh^{ECKO}; Online Figure 1). Cdh5 staining of en face aortas displays significantly thicker junctions in Dhh^{ECKO} mice compared with their control littermates (Figure 3D). The consequences of EC-EC junction alterations observed in the absence of endothelial Dhh were then measured after intravenous FITC-labeled 70-kDa dextran administration. As shown in Figure 3E and 3F, abnormal vessel leakage is observed both in the brain and in the heart of Dhh^{ECKO} mice, which also display lung edema (Figure 3G).

Moreover, we showed that EC-derived Dhh is necessary to prevent EC activation: cell culture assays reveal that Dhh knockdown promotes both the expression of adhesion molecules such as VCAM-1 and ICAM-1 and the expression of inflammatory cytokines including IL-6 and Ccl2 (chemokine ligand 2; Figure 4A). The increased VCAM-1 expression in Dhh^{ECKO} vessels is confirmed *in vivo* in lung sections (Figure 4B). Finally, we measured the consequences of Dhh knockdown-induced EC activation on neutrophil infiltration in the lungs after mice were administered with lipopolysaccharide. As expected, the density of neutrophils is significantly higher in lipopolysaccharide-treated Dhh^{ECKO} mice compared with lipopolysaccharide-treated control mice (Figure 4C), which confirms the essential role of Dhh in preventing ECs from acquiring a proinflammatory phenotype.

In conclusion, this set of data demonstrates for the first time that EC-derived Dhh, as well as Klf2, are essential in

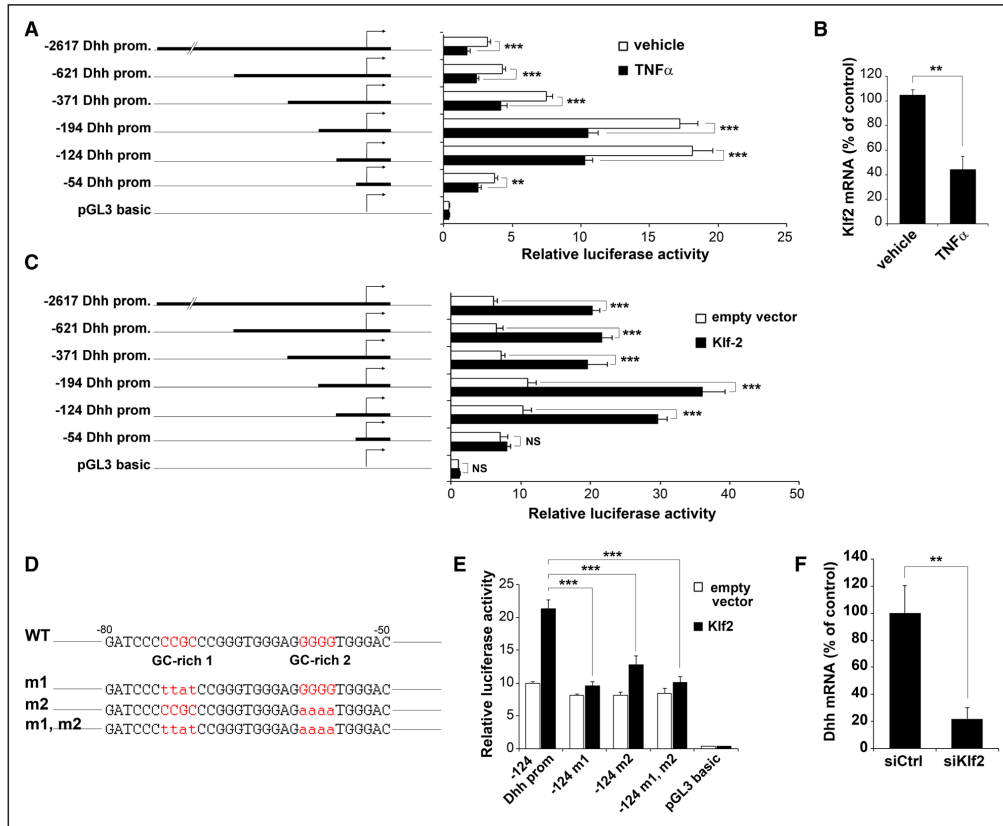


Figure 2. Dhh is a downstream target of Klf2 (kruppel-like factor 2). **A**, Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were transfected with plasmids expressing luciferase driven by fragments of human Dhh (desert hedgehog) promoter. Luciferase activity was measured after cells were treated or not with 10 ng/mL TNF- α (tumor necrosis factor alpha) for 6 h. The experiment was repeated 3x, each experiment included triplicates. **B**, HUVECs were treated or not with 10 ng/mL TNF- α for 6 h. Klf2 mRNA was quantified by RT-qPCR (reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction). **C**, HeLa were transfected with plasmids expressing luciferase driven by fragments of human Dhh promoter, together with a Klf2 expressing vector or an empty vector. Luciferase activity was measured 48 hours later. **D**, -80 to -50 sequence of human Dhh promoter, WT or mutated, together with a Klf2 expressing vector or an empty vector. Luciferase activity was measured 48 hours later. **E**, HeLa were transfected with plasmids expressing luciferase driven by 124 bp of human Dhh promoter, WT or mutated, together with a Klf2 expressing vector or an empty vector. Luciferase activity was measured 48 hours later. **F**, HUVECs were transfected with Klf2 or control small interfering RNAs (siRNAs). Dhh mRNA was quantified by RT-qPCR. Both qPCR assays and gene reporter assays were repeated 3x, each experiment included triplicates. ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$, Mann-Whitney U test. NS indicates not significant.

maintaining endothelial intercellular junction integrity and immune quiescence.

Restoring Dhh-Induced Signaling Prevents EC Dysfunction

To test whether Klf2 regulation of EC function depends on Dhh and to verify that Dhh knockdown participates to inflammation and diabetes mellitus-induced EC dysfunction, we then used either a small-molecule agonist of Smo, SAG (smo agonist)²⁴ or Dhh-conditioned medium to restore Dhh activity in TNF- α or glucose-treated cells in vitro and in lipopolysaccharide-treated mice or diabetic mice in vivo. We showed that conditioned medium from Dhh-overexpressing HeLa significantly reduces VCAM-1 expression induced by TNF- α (Figure 5A) but also VCAM-1 overexpression in cells transfected with Klf2 small interfering RNA (Figure 5B).

Moreover, we demonstrated that SAG restores Cdh5 interaction with β -catenin both in TNF- α and high-glucose-treated cells in vitro (Figure 5C) and that, while Cdh5 staining of glucose-treated ECs displays a zig-zag phenotype reflecting altered junction integrity, SAG-treated ECs have more linear junctions (Figure 5D). Consistently, in vivo, we observed that SAG administration prevents lipopolysaccharide-induced Cdh5 straining thickening of en face aortas (Figure 5E and 5F) and lipopolysaccharide-induced impairment of the endothelial Cdh5- β -catenin interaction in lung extracts (Figure 5G).

The effect of SAG on endothelial NO synthase activity was then evaluated using vasomotricity tests ex vivo. We found a significant impairment of the acetylcholine-dependent femoral artery relaxation in diabetic mice compared with control, which is normalized in diabetic mice treated with SAG.

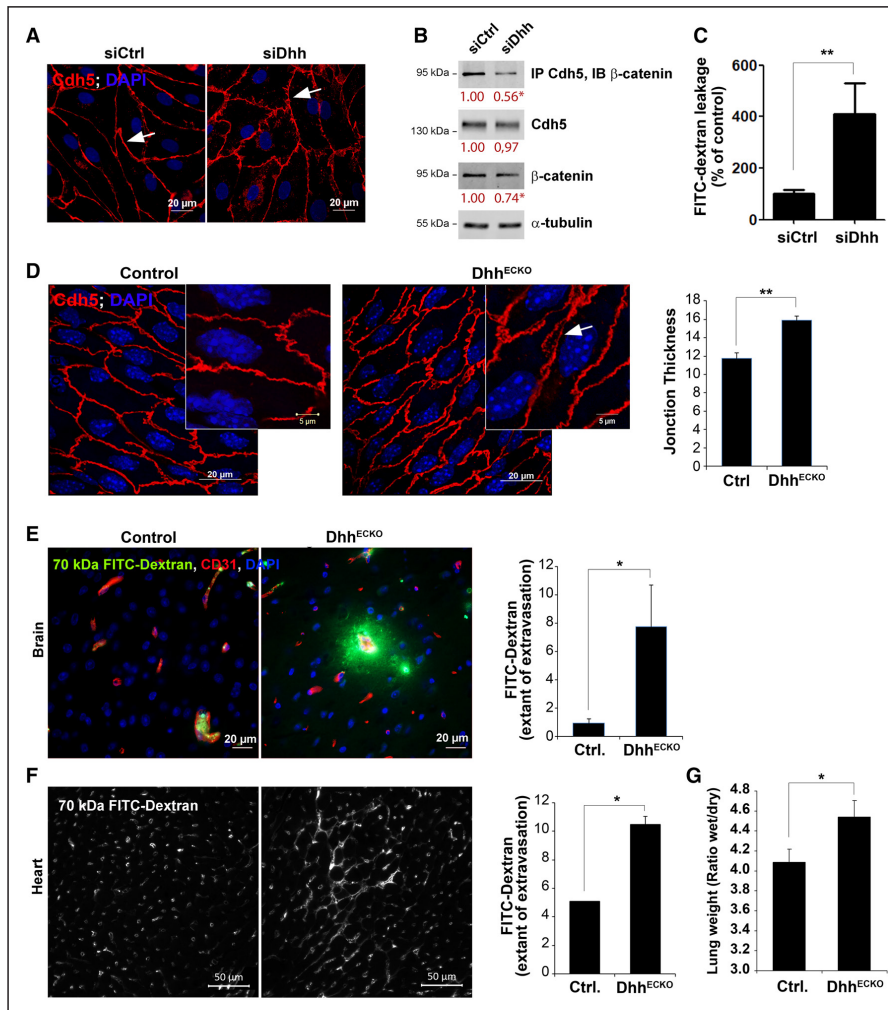


Figure 3. Endothelial cell (EC)-derived Dhh (desert hedgehog) is a critical regulator of endothelium integrity. **A**, Human dermal microvascular ECs (HMVECs) were transfected with Dhh or control small interfering RNAs (siRNAs). Cdh5 (cadherin-5) localization was evaluated by immunofluorescent staining (in red) of a confluent cell monolayer. Nuclei were stained with DAPI (in blue). The experiment was repeated 3×. **B–C**, Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were transfected with Dhh or control small interfering RNA (siRNAs). **B**, β-Catenin interaction with Cdh5 (cadherin-5) was evaluated by coimmunoprecipitation assay. The experiment was repeated 5×. **C**, Endothelial monolayer permeability to 70 kDa fluorescein isothiocyanate (FITC) dextran was assessed using Transwells. The experiment was repeated 3×, each experiment included triplicates. **D**, Aortas were harvested from Dhh^{EKO} mice and their control littermates and stained with anti-Cdh5 antibodies (in red). Nuclei were stained with DAPI (in blue). En face staining is shown. **E–G**, Dhh^{EKO} mice and their control littermates were administered with FITC-labeled 70 kDa Dextran, 30 min before they were sacrificed. **E**, Brain cross sections were immunostained with anti-CD31 antibodies to identify ECs. Nuclei were stained with DAPI (blue). FITC dextran extravasation was quantified as the % of FITC+ surface area (n=5 mice/group). **F**, Heart cross sections are shown. FITC dextran extravasation was quantified as the % of FITC+ surface area (n=5 mice/group). **G**, Pulmonary edema was quantified as the ratio of wet/dry lung weight (n=14 and 20 mice/group, respectively). *P<0.05, **P<0.01. Mann-Whitney U test.

Importantly, in the presence of nitrous oxide donor nitroprusside sodium, we do not observe any difference between the 3 groups, which confirms that the relaxation comes as a result of an endothelial dysfunction and that the SAG acts by rescuing endothelial NO production (Figure 5H).

Altogether, these data, especially in vitro data, demonstrate for the first time that Dhh downregulation mediates TNF-α or high-glucose-induced EC dysfunction downstream of Klf2 and highlights the strong potential of Dhh agonist in preventing EC dysfunction.

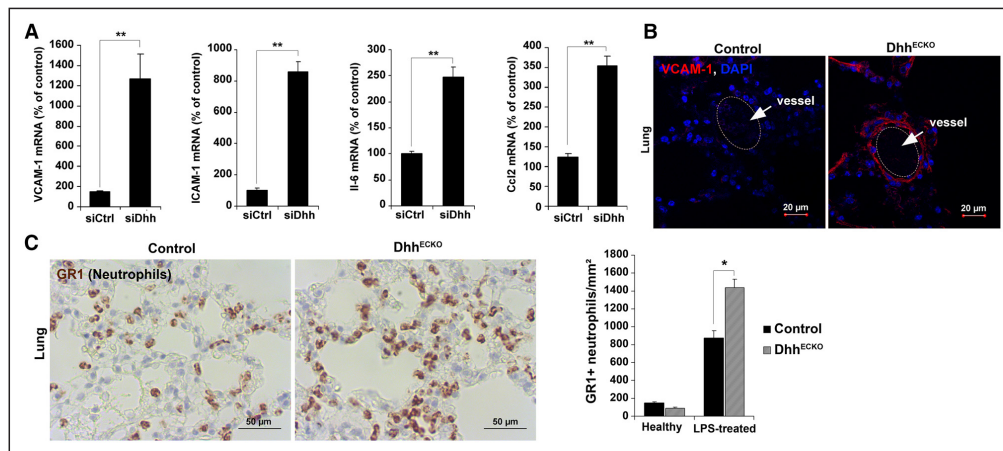


Figure 4. EC-derived Dhh (desert hedgehog) is necessary to prevent endothelial cell (EC) activation. **A**, Human umbilical vein ECs were transfected with Dhh or control small interfering RNAs (siRNAs). VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1), IL-6 (interleukin)-6, and Ccl2 (Chemokine ligand 2) mRNA expression was quantified via RT-qPCR (reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction). The experiment was repeated 3 \times , each experiment included triplicates. **B**, Lung sections from Dhh^{EKO} and their control littermates were immunostained with anti-VCAM-1 antibodies (in red). Nuclei were stained with DAPI (in blue). **C**, Dhh^{EKO} and their control littermates were administered or not with 10 mg/kg lipopolysaccharide (LPS). Mice were sacrificed 6 h later. Lung sections were immunostained with anti-GR1 antibodies to identify neutrophils. Neutrophils density in the lung was quantified as the number of GR1⁺ cells/mm² (n=8 mice/group). * P ≤0.05; ** P ≤0.01. Mann-Whitney U test.

Human CLI Is a Model of EC Dysfunction

To study endothelial dysfunction in humans, we accumulated muscle biopsies from 25 CLI patients (Rutherford 5–6) and 10 control patients and performed a series of immunohistological analyses. As expected, we found that the muscle from patients with CLI shows myopathic features with the presence of immature muscle fibers, characterized by a smaller size (Figure 6A) and a significant increase in desmin-negative areas (Figure 6B) associated with increased fibrosis areas (Figure 6C). We then evaluated capillary density and, unexpectedly, observed no significant difference in capillary density in the muscle biopsies from CLI patients and those of control patients (Figure 6D). However, biopsy samples from patients with CLI show a significant increase in albumin extravasation, indicating abnormal vascular leakage (Figure 6E). Additionally, biopsies from patients with CLI show clear signs of inflammation, with a significantly higher density of macrophages. Notably, macrophages were all Mrc1 (mannose receptor C-type 1)+M2 macrophages (Figure 6F).

This set of data reveals that the phenotype of muscle biopsies from patients with CLI is characterized by a capillary density equivalent to that of healthy muscles. Nevertheless, muscle tissues from patients with CLI display clear signs of endothelial dysfunction, including increased vascular leakage and local inflammation. This microvascular dysfunction is associated with significant muscle damage.

Chronic Critical Limb Ischemia Is Associated With EC Dysfunction and Dhh Downregulation

We then designed experiments to explain the role of Dhh in endothelial dysfunction in the setting of ischemia. Since we wanted to closely mimic human CLI, we induced chronic limb ischemia in diabetic mice by sequential ligation of the femoral

and iliac arteries.¹⁹ In this model, 3 months after the onset of ischemia, blood flow in the ischemic leg remains very low, with an ischemic leg's blood flow/control leg's blood flow ratio below 0.4 (Online Figure IIA). Unexpectedly, ischemic muscle capillary density is similar to that of healthy muscles (Online Figure IIB), but capillaries are leakier (Online Figure IIC), and the muscle is inflamed with increased VCAM-1 expression and significant M2 macrophage infiltration (Online Figure IID). Interestingly, this phenotype fully matches the phenotype of human CLI (Rutherford 5–6).

Altogether, these data show for the first time that both human and mouse ischemic skeletal muscle tissues display altered microvessel integrity in CLI condition but no variability in capillary density.

In following, we quantified Dhh expression in the ischemic muscle of diabetic mice having undergone sequential ligation surgery: Dhh mRNA expression was measured in ECs isolated from the ischemic muscle and compared with its expression in ECs from healthy muscles. Dhh expression is significantly lower in the CD31-positive fraction of ischemic muscles compared with that of healthy muscles (Online Figure IIIA), suggesting that Dhh agonist may be used to improve EC function in this model. Importantly, expression of Dhh receptors Ptch1 and Smo are not modulated by ischemia (data not shown). In addition, we verified that Dhh regulation by Klf2 and Dhh regulation of Cdh5-dependant intercellular junction integrity still occur in hypoxic conditions (Online Figure IIIB and IIIC) and that SAG can reduce ischemia-induced capillary leakage and macrophage recruitment in Dhh^{EKO} mice. To do so, Dhh^{EKO} mice were randomly assigned to be treated with NaCl or SAG, immediately after the second hindlimb ischemia surgery was performed (ie, ligation of the iliac artery) and until sacrifice (Online Figure IIID and IIIE).

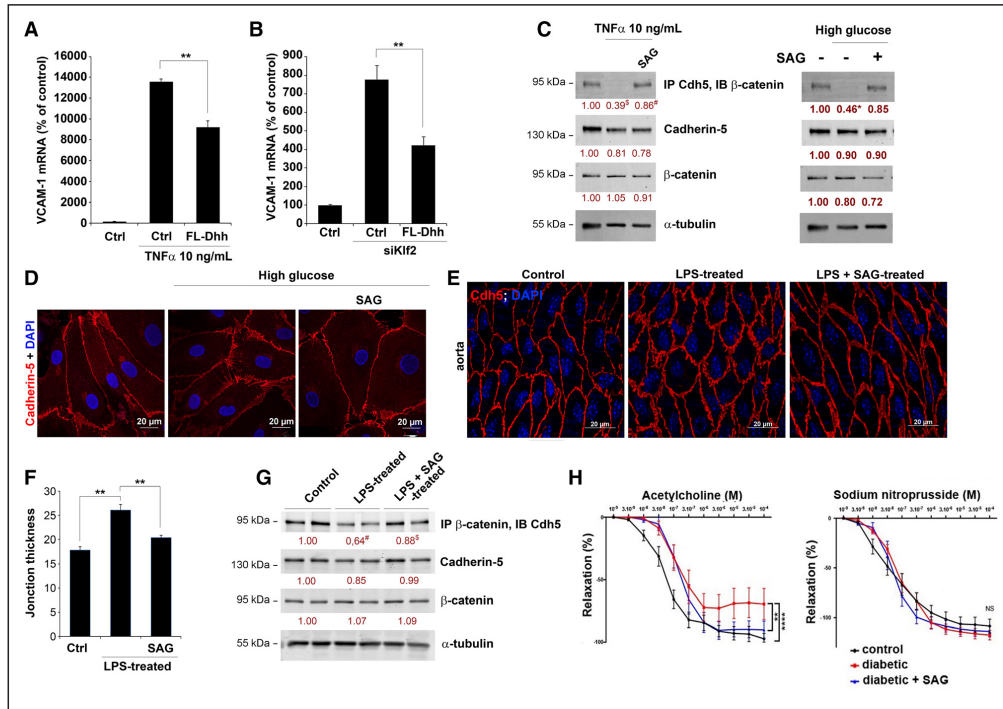


Figure 5. Restoring Dhh (desert hedgehog)-induced signaling prevents endothelial cell (EC) dysfunction. **A**, Human umbilical vein ECs (HUVECs) were treated or not with 10 ng/mL TNF α , in the presence of control or FL-Dhh containing culture medium. VCAM-1 mRNA expression was quantified via RT-qPCR. The experiment was repeated 3 times, each experiment included triplicates. **B**, HUVECs were transfected with Klf2 or control siRNAs, in the presence or not of 100 nM SAG. VCAM-1 mRNA expression was quantified via RT-qPCR. The experiment was repeated 3 times, each experiment included triplicates. **C**, HUVECs were treated or not with 10 ng/mL TNF- α (tumor necrosis factor alpha) and high glucose levels, in the presence or not of 100 nmol/L SAG (smoothened agonist). β -Catenin interaction with Cdh5 (cadherin-5) was evaluated by coimmunoprecipitation assay. The experiment was repeated 3 \times . **D**, HUVECs were treated or not with high glucose levels, in the presence or not of 100 nmol/L SAG. ECs were immunostained with anti-Cdh5 antibodies (in red). Nuclei were stained with DAPI (in blue). **E–G**, C57BL/6 mice were sacrificed 6 h after they were administered or not with 10 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) together or not with 5 mg/kg SAG. **E**, Aortas were immunostained with anti-Cdh5 antibodies (in red). Nuclei were stained with DAPI (in blue). En face staining is shown (n=8 mice/group). **F**, Average junction thickness was quantified as the % of Cdh5⁺ surface area and normalized to the number of nuclei/HPF (n=5 aorta/group). **G**, β -Catenin interaction with Cdh5 was evaluated by coimmunoprecipitation assay in lung protein extracts. **H**, Femoral arteries were harvested from control (Ctrl) mice, and streptozotocin-induced diabetic mice treated or not with SAG therapy and submitted to vasomotricity tests. The cumulative concentration-relaxation curve to ACh and nitroprusside sodium (SNP) is shown. The response is expressed as the percentage of decrease of phenylephrine-induced precontraction. Values were normalized to an initial 80 mmol/L KCl-induced contraction level. *P \leq 0.05, **P \leq 0.01, Mann-Whitney U test. NS indicates not significant.

SAG Therapy Improved EC Function and Ameliorated Microvessel Perfusion Without Increasing Capillary Density

We then setup experiments to test Dhh agonist therapeutic potential; more specifically, we measured how Dhh agonist improves EC function and tissue perfusion in ischemic cardiovascular conditions like CLI, often combined with diabetic and chronic inflammatory disorders.²⁵ Similarly, to Dhh^{ECKO} mice, diabetic mice were randomly assigned to be treated with NaCl or SAG, immediately after the second hindlimb ischemia surgery was performed (ie, ligation of the iliac artery) and until sacrifice.

Interestingly, as opposed to the Hh ligands,^{26–28} SAG has no proangiogenic properties. Indeed, quantitative analysis of CD31-positive surface areas shows the absence of angiogenic response after implantation of corneal pellets

impregnated with SAG (Online Figure IV). Therefore, this model allows us to test whether reducing EC dysfunction without increasing capillary density is a suitable strategy to improve ischemic muscle perfusion.

As expected, SAG therapy does not modify capillary density within the ischemic skeletal muscle (Figure 7A). On the contrary, it significantly reduces the interstitial albumin-positive surface area (Figure 7B), VCAM-1, and SOD2 (superoxide dismutase 2) expression (Figure 7C and 7E) and associated macrophage infiltration (Figure 7D). Altogether, these results demonstrate that SAG successfully decreases vascular leakage and EC activation but also restores ECs antioxidant capacity.

We then followed up by testing whether ameliorating EC dysfunction improves capillary perfusion. We first measured vessel perfusion by administrating mice intravenously with FITC-labeled BS1-lectin and found that the number

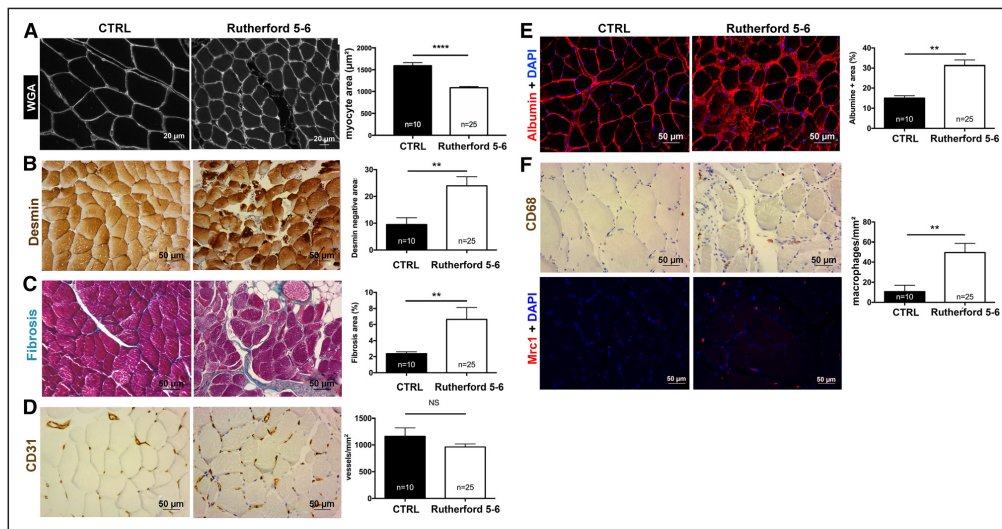


Figure 6. Chronic critical limb ischemia is associated with endothelial cell (EC) dysfunction. Muscle samples were taken from control (Ctrl) patients (while undergoing saphenous stripping, at areas considered healthy by the surgeon, they had no history or clinical signs of peripheral artery disease; n=10), critical limb ischemia (CLI) patients (during bypass or amputations), at ischemic areas (Rutherford class 5–6, n=25). **A**, Skeletal muscle cross sections were stained with wheat germ agglutinin (WGA), Alexa Fluor 488 conjugates to identify membranes. Myocyte surface area was measured using Image J. **B**, Skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-desmin antibodies to identify myocytes (brown), and impaired myogenesis was quantified as desmin-negative areas, **C**, Skeletal muscle cross sections were stained with Masson trichrome to identify fibrosis and quantified as light green surface areas. **D**, Skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-CD31 antibodies to identify ECs (brown) and quantified as the number of CD31-positive, CD45-negative elements. **E**, Human skeletal muscle cross sections were submitted to immunofluorescence labeling with anti-albumin antibodies (red) and quantified as positive albumin areas. **F**, Human skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-CD68 antibodies to identify macrophages (brown) and quantified as the number of CD68-positive elements. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, Mann-Whitney U test. NS indicates not significant.

of lectin-positive compared with CD31-positive elements is significantly increased in SAG-treated mice (Figure 8A). We then measured the overall blood flow recovery in the ischemic foot and found that ischemic leg/control leg's blood flow ratio is increased by almost 140% in SAG-treated mice (Figure 8B). Moreover, we analyzed the myocyte phenotype and found that SAG significantly decreases desmin-negative areas, known to be associated with improved myocyte differentiation (Figure 8C), the myocytes acquiring a larger, square, and more regular shape (Figure 8D). In addition, MyoG (myogenin; Figure 8E) expression level is significantly diminished in SAG-treated muscles, as well as cell proliferation (Figure 8F).

Taken together, these data demonstrate for the first time that the SAG therapy successfully improves ischemic skeletal muscle perfusion and recovery, through a significant upturn of EC function.

SAG Ameliorated EC Dysfunction and Ischemic Muscle Repair by Targeting ECs

Finally, to prove that ECs are the cells responding to the SAG and to verify that myopathy is prevented by treating EC dysfunction, endothelial Smo-deficient (Smo^{ECKO}) mice induced with diabetes mellitus underwent sequential ligation surgery coupled or not with SAG therapy for 24 days.

Compared with wild-type mice, SAG therapy does not induce any difference in the number of Cdh5-positive elements

within the ischemic muscle of Smo^{ECKO} mice (Online Figure VA), and conversely, the percentage of both albumin-positive surface area and macrophage density are comparable in Smo^{ECKO} mice treated or not with SAG (Online Figure VB and VC). Moreover, SAG therapy does not increase foot perfusion in Smo^{ECKO} mice treated or not with SAG as illustrated by the unchanged ischemic foot/control foot's blood flow ratio (Online Figure VD). Finally, the SAG does not improve myocyte differentiation (Online Figure VE).

About the previously observed effects of the SAG therapy, these data strongly support the assumption that Dhh agonist targets EC function via a Smo-dependent interaction at the EC surface because all the effects observed in wild-type mice are abrogated by endothelial Smo deletion. Consequently, ameliorating EC dysfunction appears to be a successful strategy to improve muscle perfusion and recovery in the setting of CLI.

Discussion

Surprisingly, despite several developmental studies reporting Dhh expression at the endothelium,²² Dhh function in adult ECs had never been explored before. In this article, we hypothesized for the first time that endothelial Dhh loss of expression in cardiovascular ischemic disorders may be a major molecular event triggering EC dysfunction downstream of Klf2.

Such a paradigm is supported by the literature, showing that Dhh is downregulated by several cardiovascular risk

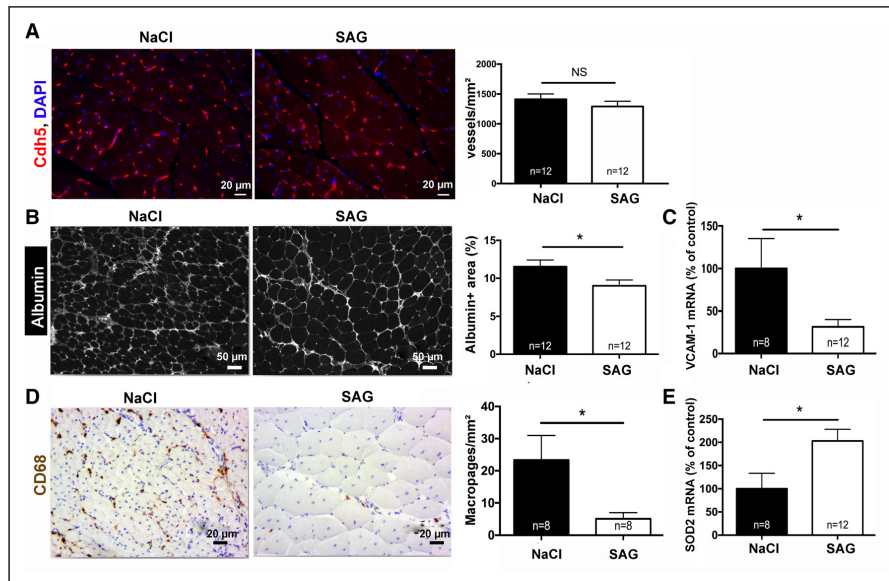


Figure 7. SAG (smoothed agonist) therapy improved endothelial cell (EC) function without increasing capillary density. Diabetic mice that underwent sequential femoral and iliac artery ligation were treated or not with SAG ($n=12$ mice/group). **A**, Mouse skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-Cdh5 (cadherin-5) antibodies to identify ECs (brown), and quantified as the number of Cdh5-positive elements. **B**, Mouse skeletal muscle cross sections were submitted to immunofluorescence labeling with anti-albumin antibodies (white), and quantified as the %-positive albumin areas. **C**, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), mRNA expression was quantified via RT-qPCR (reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction). **D**, Mouse skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-CD68 to identify macrophages (brown), and quantified as the number of CD68-positive elements. **E**, SOD2 (superoxide dismutase 2) mRNA expression was quantified via RT-qPCR. * $P\leq 0.05$, ** $P\leq 0.01$, Mann-Whitney U test. NS indicates not significant.

factors, including age¹³ and diabetes mellitus¹¹ and our data pointing the ability of SAG therapy to prevent TNF- α or high-glucose-induced EC dysfunction. Additionally, SAG has been previously shown to prevent blood-brain barrier disruption induced by stroke⁹ or HIV infection,¹⁰ and we demonstrated before that it restores Cldn5 expression and prevents endoneurial capillary leakage associated to neuropathy in diabetic mice.¹¹

Interestingly, Klf2 has also been identified as a molecular switch regulating endothelial function in health and disease²⁹ by modulating the endothelial barrier function¹ and by preventing EC activation.² Here, we link Dhh as a downstream effector of Klf2. Indeed, we molecularly prove that Dhh is a direct transcriptional target of Klf2, supporting other studies in which Dhh modulation by Klf2 is shown in 2 microarray analyzes, one comparing the mRNA expression profile of human umbilical vein ECs transduced with a Klf2 expressing lentivirus versus empty lentivirus^{2,30} and the other comparing gene expression between double Klf2/Klf4 KO and wild-type ECs.³¹ Moreover, we demonstrate that Klf2 regulation of EC function depends on Dhh; indeed, restoring Hh signaling using Dhh-conditioned medium decreases VCAM-1 expression in ECs transfected with Klf2 small interfering RNAs.

Importantly, unlike the transcription factor Klf2, Dhh is a secreted molecule of which activity can be mimicked by designed agonists, as it is already the case for Smo. Moreover, therapies currently available to improve EC activity, like

angiotensin-converting enzyme inhibitors, angiotensin type-1 receptor antagonists, and statins, are limited by preventing only some features of EC dysfunction (including oxidative stress, proinflammatory phenotype, and endothelial NO synthase uncoupling).³² Therefore, the SAG represents one of the best options to resolve EC dysfunction because of its wide spectrum of action.

In this article, we also establish that the ischemic muscle of patients with CLI presents a myopathic phenotype, without any changes in the number of capillary but with evident signs of microvessel disruption. Additionally, we demonstrate that targeting EC dysfunction significantly improves muscle perfusion with unmodified capillary density, leading to muscle damage alleviation. Therefore, our work opens up new prospects for alternative therapies to treat CLI.

Importantly, previous studies failed to clearly establish whether capillary density within the ischemic muscle is increased, diminished, or unmodified; however, 2 studies have reported altered capillary structure with significant thickening of the basement membrane.^{33,34} Interestingly, our study reveals that capillary density within the ischemic muscle of patients with CLI is equivalent to that of healthy skeletal muscles from control subjects. Indeed, 3 levels of biopsies performed for each patient with CLI, from the most ischemic area to the edge of amputation, display no significant changes in capillary density (data not shown). Moreover, we reveal a

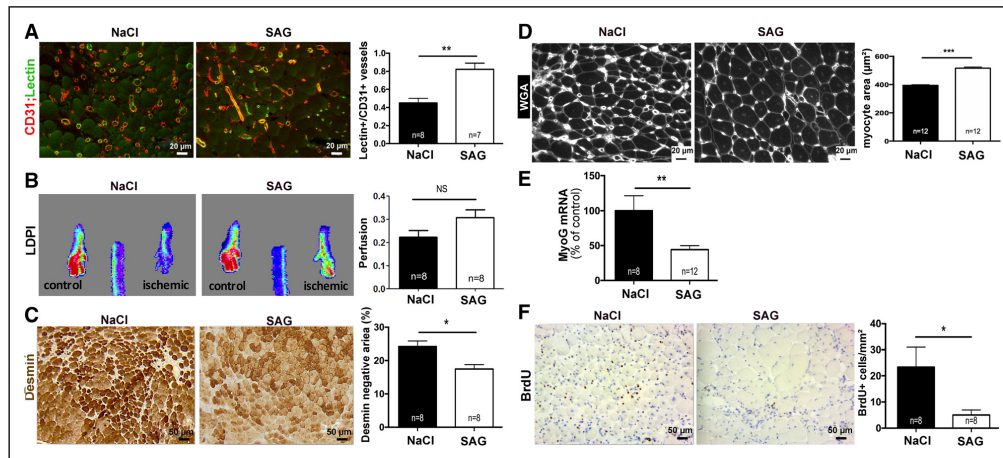


Figure 8. SAG (smoothed agonist) therapy improved microvessel perfusion and reduced myopathic features. Diabetic mice that underwent sequential femoral and iliac artery ligation were treated or not with SAG. **A**, Mouse skeletal muscle cross sections were submitted to fluorescence labeling ($\times 260$) of Isolectin-B4 to identify perfused vessels (green) and anti-CD31 antibodies (red) to identify ECs. Vessel perfusion was assessed with quantitative analysis of the ratio of Isolectin-B4-positive elements over CD31-positive elements. **B**, Perfusion ratio of ischemic limb over control limb on laser Doppler perfusion imaging. **C**, Mouse skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-desmin antibodies to identify myocytes (brown; $\times 260$) and quantified as % desmin-negative areas. **D**, Muscle cross sections were stained with wheat germ agglutinin (WGA), Alexa Fluor 488 conjugates to identify membranes. Myocyte surface area was measured using Image J. **E**, MyoG (myogenesis) mRNA expression was quantified via RT-qPCR (reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction). **F**, Mouse skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-BrdU antibodies to identify cell proliferation (brown) and quantified as the number of BrdU-positive elements. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Mann-Whitney U test. NS indicates not significant.

clear microangiopathy associated to ischemia, characterized by an increased capillary permeability coupled with muscle inflammation, reflecting EC activation. Importantly, this microangiopathy is consistently found in our mouse model and associated to significantly increased levels of VCAM-1 and ICAM-1 at the endothelium, together with decreased antioxidant properties.

Based on the assumption that an increased blood vessel density would improve tissue perfusion and lead to limb salvage, several proangiogenic therapies have been tested, first in animal models of hindlimb ischemia and then, under clinical trials, in patients experiencing ischemic disorders. The first results obtained in animals were very promising.^{35,36} Consistently, phase I clinical trials successfully demonstrated increased collateral vessel formation after arterial gene transfer of VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A)-encoding plasmids in patients with CLI.³⁷ However, in the meantime, larger randomized clinical trials testing angiogenic therapies for intermittent claudication or CLI have given negative results.³⁸ The measured end points were amputation rates, decrease in pain, and peak walking time.

Because of our results, showing that capillary density is not diminished in the ischemic muscle of patients with CLI, and the mixed results obtained in previous studies with proangiogenic therapies, we assumed that stimulating capillary density may not be the best approach to sufficiently improve ischemic muscle perfusion and to reach a balance allowing muscle recovery and therefore limb salvage. To verify our hypothesis, we decided to further explore the role of EC dysfunction in the pathophysiology of CLI, of which symptoms are mainly linked to muscle ischemia, induced by macrovascular

arterial lesions driving hypoperfusion. We show that ischemic muscles have normal capillary density, with evident signs of microvessel dysfunction. More importantly, we demonstrate that improving EC dysfunction in capillaries is a successful strategy to promote ischemic muscle perfusion and to prevent myopathy; indeed, we highlight that SAG therapy succeeds in restraining EC activation and vascular leakage and restores SOD2 expression. This leads to an improved capillary perfusion and a better myocyte organization, characterized by a lower desmin and MyoG expression and a wider myofiber cross-sectional area. This corroborates data from the literature showing that desmin expression level, together with a round shape of myofibers, are inversely correlated with calf muscle strength in patients with peripheral artery diseases.^{39,40}

Conclusions

In conclusion, we demonstrate for the first time the critical role of Dhh-Klf2 signaling at the endothelium in cardiovascular ischemic disorders in adults. Indeed by using a novel mouse model displaying Dhh knockdown specifically in ECs, we prove that Dhh, downstream of Klf2, is essential to maintain endothelial integrity by tightening EC adherens junctions and preventing endothelial activation. Therefore, we identify Dhh as a novel target for the development of alternative therapies that would play on EC function but not angiogenesis, as proangiogenic strategies have failed to improve patient disabilities so far.

Acknowledgments

We thank Annabel Reynaud, Jérôme Guignard, Sylvain Grolleau, and Myriam Petit-Roussel for their technical help. We thank Béatrice Jaspard-Vinassa for plasmid constructions. We thank Christelle Boullé for administrative assistance.

Sources of Funding

This study was sponsored by the Toulouse University Hospital Centre and supported by a grant from the French Ministry of Health (Interregional Clinical Research Hospital Program PHRC-I 2009 N°RCB: 2009-A00889-48), the Société de Chirurgie Vasculaire et Endovasculaire de langue française, and the Fondation de France, Appels d'Offre Recherche sur les maladies Cardiovasculaires 2013 and 2018. Additionally, this study was co-funded by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and by the University of Bordeaux.

Disclosures

None.

References

- Lin Z, Natesan V, Shi H, Dong F, Kawanami D, Mahabeshwar GH, Atkins GB, Nayak L, Cui Y, Finigan JH, Jain MK. Kruppel-like factor 2 regulates endothelial barrier function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30:1952–1959. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.211474
- Dekker RJ, Boon RA, Rondaj MG, Kragt A, Volger OL, Elderkamp YW, Meijers JC, Voorberg J, Pannekoek H, Horrevoets AJ. KLF2 provokes a gene expression pattern that establishes functional quiescent differentiation of the endothelium. *Blood*. 2006;107:4354–4363. doi: 10.1182/blood-2005-08-3465
- Bhattacharya R, Senbanerjee S, Lin Z, Mir S, Hamik A, Wang P, Mukherjee P, Mukhopadhyay D, Jain MK. Inhibition of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by the Kruppel-like factor KLF2. *J Biol Chem*. 2005;280:28848–28851. doi: 10.1074/jbc.C500200200
- Ni CW, Qiu H, Rezzan A, Kwon K, Nam D, Son DJ, Visvader JE, Jo H. Discovery of novel mechanosensitive genes in vivo using mouse carotid artery endothelium exposed to disturbed flow. *Blood*. 2010;116:e66–e73. doi: 10.1182/blood-2010-04-278192
- Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature*. 1980;287:795–801.
- Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The hedgehog signal transduction network. *Sci Signal*. 2012;5:re6. doi: 10.1126/scisignal.2002906
- Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, Sabbagh M, Wosik K, Bourbonnière L, Bernard M, van Horsen J, de Vries HE, Charron F, Prat A. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science*. 2011;334:1727–1731. doi: 10.1126/science.1206936
- Xia YP, He QW, Li YN, Chen SC, Huang M, Wang Y, Gao Y, Huang Y, Wang MD, Mao L, Hu B. Recombinant human sonic hedgehog protein regulates the expression of ZO-1 and occludin by activating angiotensin-1 in stroke damage. *PLoS One*. 2013;8:e68891. doi: 10.1371/journal.pone.0068891
- Chechneva OV, Mayrhofer F, Daugherty DJ, Krishnamurthy RG, Bannerman P, Pleasure DE, Deng W. A Smoothed receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury. *Cell Death Dis*. 2014;5:e1481. doi: 10.1038/cddis.2014.446
- Singh VB, Singh MV, Gorantla S, Poluektova LY, Maggirwar SB. Smoothed agonist reduces human immunodeficiency virus type-1-induced blood-brain barrier breakdown in humanized mice. *Sci Rep*. 2016;6:26876. doi: 10.1038/srep26876
- Chapouly C, Yao Q, Vandierdonck S, Larrieu-Lahargue F, Mariani JN, Gadeau AP, Renault MA. Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: implication in diabetes. *Cardiovasc Res*. 2016;109:217–227. doi: 10.1093/cvr/cvv263
- Calcutt NA, Allendoerfer KL, Mizisin AP, et al. Therapeutic efficacy of sonic hedgehog protein in experimental diabetic neuropathy. *J Clin Invest*. 2003;111:507–514. doi: 10.1172/JCI15792
- Renault MA, Robbesyn F, Chapouly C, Yao Q, Vandierdonck S, Reynaud A, Belloc I, Traiffort E, Ruat M, Desgranges C, Gadeau AP. Hedgehog-dependent regulation of angiogenesis and myogenesis is impaired in aged mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2013;33:2858–2866. doi: 10.1161/ATVBAHA.113.302494
- Braune J, Weyer U, Matz-Soja M, Hobsusch C, Kern M, Kunath A, Klötting N, Kralisch S, Blüher M, Gebhardt R, Zavros Y, Bechmann I, Gericke M. Hedgehog signalling in myeloid cells impacts on body weight, adipose tissue inflammation and glucose metabolism. *Diabetologia*. 2017;60:889–899. doi: 10.1007/s00125-017-4223-5
- Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development*. 2001;128:5099–5108.
- Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis*. 2007;45:593–605. doi: 10.1002/dvg.20335
- Claxton S, Kostourou V, Jadeja S, Chambon P, Hodivala-Dilke K, Fruttiger M. Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium. *Genesis*. 2008;46:74–80. doi: 10.1002/dvg.20367
- Azzoni E, Conti V, Campana L, Dellavalle A, Adams RH, Cossu G, Brunelli S. Hemogenic endothelium generates mesoangioblasts that contribute to several mesodermal lineages in vivo. *Development*. 2014;141:1821–1834. doi: 10.1242/dev.103242
- Lejay A, Choquet P, Thaveau F, Singh F, Schlagowski A, Charles AL, Lavery G, Metzger D, Zoll J, Chakfe N, Geny B. A new murine model of sustainable and durable chronic critical limb ischemia fairly mimicking human pathology. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2015;49:205–212. doi: 10.1016/j.ejvs.2014.12.010
- Dumas de la Roque E, Smeralda G, Quignard JF, Freund-Michel V, Courtois A, Marthan R, Muller B, Guibert C, Dubois M. Altered vasoreactivity in neonatal rats with pulmonary hypertension associated with bronchopulmonary dysplasia: Implication of both eNOS phosphorylation and calcium signaling. *PLoS one*. 2017;12:e0173044. doi: 10.1371/journal.pone.0173044
- Kenyon BM, Voest EE, Chen CC, Flynn E, Folkman J, D'Amato RJ. A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:1625–1632.
- Bitgood MJ, McMahon AP. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev Biol*. 1995;172:126–138. doi: 10.1006/dbio.1995.0010
- Dakubo GD, Mazerolle C, Furimsky M, Yu C, St-Jacques B, McMahon AP, Wallace VA. Indian hedgehog signaling from endothelial cells is required for sclera and retinal pigment epithelium development in the mouse eye. *Dev Biol*. 2008;320:242–255. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.05.528
- Chen JK, Taipale J, Young KE, Maiti T, Beachy PA. Small molecule modulation of smoothed activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:14071–14076.
- Dopheide JF, Geissler P, Rubrech J, Trumpp A, Zeller GC, Bock K, Dorweiler B, Dünschede F, Münzel T, Radsak MP, Espinola-Klein C. Inflammation is associated with a reduced number of pro-angiogenic Tie-2 monocytes and endothelial progenitor cells in patients with critical limb ischemia. *Angiogenesis*. 2016;19:67–78. doi: 10.1007/s10456-015-9489-y
- Pola R, Ling LE, Silver M, Corbley MJ, Kearney M, Blake Pepinsky R, Shapiro R, Taylor FR, Baker DP, Asahara T, Isner JM. The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nat Med*. 2001;7:706–711. doi: 10.1038/89083
- Renault MA, Chapouly C, Yao Q, Larrieu-Lahargue F, Vandierdonck S, Reynaud A, Petit M, Jaspard-Vinassa B, Belloc I, Traiffort E, Ruat M, Duplâa C, Couffignal T, Desgranges C, Gadeau AP. Desert hedgehog promotes ischemia-induced angiogenesis by ensuring peripheral nerve survival. *Circ Res*. 2013;112:762–770. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300871
- Renault MA, Roncalli J, Tongers J, Thorne T, Klyachko E, Misener S, Volpert OV, Mehta S, Burg A, Luedemann C, Qin G, Kishore R, Losordo DW. Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2010;49:490–498. doi: 10.1016/j.yjmcc.2010.05.003
- Atkins GB, Jain MK. Role of Kruppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circ Res*. 2007;100:1686–1695. doi: 10.1161/01.RES.0000267856.00713.0a
- Kumar A, Lin Z, SenBanerjee S, Jain MK. Tumor necrosis factor alpha-mediated reduction of KLF2 is due to inhibition of MEF2 by NF-kappaB and histone deacetylases. *Mol Cell Biol*. 2005;25:5893–5903. doi: 10.1128/MCB.25.14.5893-5903.2005
- Sangwung P, Zhou G, Nayak L, et al. KLF2 and KLF4 control endothelial identity and vascular integrity. *JCI Insight*. 2017;2:e91700. doi: 10.1172/jci.insight.91700
- Jensen HA, Mehta JL. Endothelial cell dysfunction as a novel therapeutic target in atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2016;14:1021–1033. doi: 10.1080/14779072.2016.1207527
- Baum O, Torchetti E, Malik C, Hoier B, Walker M, Walker PJ, Odriozola A, Graber F, Tschanz SA, Bangsbo J, Hoppeler H, Askew CD, Hellsten Y.

- Capillary ultrastructure and mitochondrial volume density in skeletal muscle in relation to reduced exercise capacity of patients with intermittent claudication. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2016;310:R943–R951. doi: 10.1152/ajpregu.00480.2015
34. Ho TK, Rajkumar V, Black CM, Abraham DJ, Baker DM. Increased angiogenic response but deficient arteriolization and abnormal microvessel ultrastructure in critical leg ischemia. *Br J Surg*. 2006;93:1368–1376. doi: 10.1002/bjs.5496
 35. Couffinhal T, Silver M, Kearney M, Sullivan A, Witzenbichler B, Magner M, Annex B, Peters K, Isner JM. Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice. *Circulation*. 1999;99:3188–3198.
 36. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 1994;93:662–670. doi: 10.1172/JCI117018
 37. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischemic limb. *Lancet*. 1996;348:370–374.
 38. Cooke JP, Losordo DW. Modulating the vascular response to limb ischemia: angiogenic and cell therapies. *Circ Res*. 2015;116:1561–1578.
 39. Koutakis P, Miserlis D, Myers SA, Kim JK, Zhu Z, Papoutsis E, Swanson SA, Haynatzki G, Ha DM, Carpenter LA, McComb RD, Johanning JM, Casale GP, Pipinos II. Abnormal accumulation of desmin in gastrocnemius myofibers of patients with peripheral artery disease: associations with altered myofiber morphology and density, mitochondrial dysfunction and impaired limb function. *J Histochem Cytochem*. 2015;63:256–269. doi: 10.1369/0022155415569348
 40. Koutakis P, Myers SA, Cluff K, Ha DM, Haynatzki G, McComb RD, Uchida K, Miserlis D, Papoutsis E, Johanning JM, Casale GP, Pipinos II. Abnormal myofiber morphology and limb dysfunction in claudication. *J Surg Res*. 2015;196:172–179. doi: 10.1016/j.jss.2015.02.011

Données supplémentaires

Detailed Methods

Human tissue samples

Human muscle tissues were retrieved from a library of tissues collected for a hospital clinical research program entitled "Critical ischemia of inferior limbs: metabolic, morphologic and immunohistochemical characterization of the involved tissues". (N°RCB: 2009-A00889-48, PHRC N°09 038 08). In this preliminary observational multicenter study, 30 lower limbs of consecutive patients suffering from CLI were analyzed. All patients underwent open surgical revascularization procedures or amputation between August 2010 and April 2012 at one of three major vascular centers in south-west France (Limoges, Bordeaux, Toulouse). The presence of CLI was assessed by clinical evaluation (Rutherford class 4 to 6)¹ associated with an ankle or toe systolic blood pressure <50 or 30 mmHg, respectively. In the absence of contra-indication or technical impossibility, three levels of biopsies were performed for each patient, from the most ischemic one to the edge of amputation. Tissues were immediately fixed in methanol and sent to Inserm UMR1034 (core lab) where the morphology and immunohistochemistry studies were performed. A total of 25 tissue samples were obtained from patients meeting the criteria for CLI, with a Rutherford class of either 5 or 6. Muscle samples were also retrieved from 10 control (CTRL) patients, free from any history or clinical signs of peripheral artery disease, undergoing saphenous stripping during the same study period. Samples were collected from the mid-portion of the calf in the vascular department of the Bordeaux university hospital and submitted to the same fixation and inclusion protocol. The institutional review board of each center approved the study methodology and design, and all patients provided their consent to participate in the study, after receiving written information.

Mice

C57BL/6J mice were obtained from Charles River Laboratories and bred in our animal facility. Dhh Floxed mice (Online Figure IA) were generated at the "Institut Clinique de la Souris" through the International Mouse Phenotyping Consortium (IMPC) from a vector generated by the European conditional mice mutagenesis program, EUCOMM. Smo Floxed (Smo^{Flox}) mice² and Rosa26^{mTmG} mice³ were obtained from Jackson Laboratories. Pdgfb-Cre^{ERT2} mice⁴ and Cdh5-Cre^{ERT2} mice⁵ were a gift from respectively M. Fruttiger and RH. Adams.

Pdgfb-Cre^{ERT2} mice were genotyped using the following primers 5'-CCAGCCGCCGTCGCAACT-3' and 5'-GCCCGGGGATCACTCTCG-3'. Cdh5-Cre^{ERT2} mice were genotyped using the following primers: 5'-TAAAGATATCTCACGTACTGACGGTG-3' and 5'-TCTCTGACCAGAGTCATCCTTAGC-3' that amplify 493 bp of the Cre recombinase sequence. Dhh Floxed mice were genotyped using the following primers 5'-TGGGTGTCCTTACAATCCGC-3' and 5'-CAACCACTGGACCGAAGGAGGAA-3' which amplifies a 375 bp fragment of the WT allele or a 428 bp fragment if the allele is floxed. Smo Floxed mice were genotyped using the following primers 5'-CCACTGCGAGCCTTTGCGCTAC-3' and 5'-CCATCACCTCCGCGTCGCA-3' which amplifies a 446 bp fragment of the WT allele and 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC-3' and 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC-3' which amplifies 280 bp of the floxed allele. Rosa26^{mTmG} mice were genotyped using the following three primers 5'-CTCTGCTGCCTCTGGCTTCT-3', 5'-CGAGGCGGATCACAAGCAATA-3', and 5'-TCAATGGGCGGGGTCGTT-3'.

Animal experiments were performed in accordance with the guidelines from Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the local Animal Care and Use Committee of Bordeaux University.

The Cre recombinase in Pdgfb-Cre^{ERT2} mice was activated by intraperitoneal injection of 1 mg tamoxifen for 5 consecutive days at 8 weeks of age. Mice were phenotyped 4 weeks later. Successful and specific activation of the Cre recombinase was verified in both Pdgfb-Cre^{ERT2}, Rosa26^{mTmG} mice and Cdh5-Cre^{ERT2}, Rosa26^{mTmG} mice (Online Figure IB). Both males and females were used in equal proportions.

Streptozotocin treatment

6 week old mice were injected intraperitoneally with 55 mg/kg/day of streptozotocin (Sigma) dissolved in sterile citrate buffer (0.05 mol/L sodium citrate, pH 4.5, 45 mg/kg) after 4 hours of fasting. Either streptozotocin or citrate buffer (CTRL) was administered for 5 days consecutively

during the first week of the study. Mice were weighted and blood samples collected from the vena caudalis to measure glycemia using a glucose analyzer [One Touch Ultra Mini Blood Glucose Monitoring System; Johnson & Johnson (China) Co.]. Mice with glycemia >280 mg/dL were considered diabetic and used for experiments ⁶. The surgery to induce HLI was performed 14 weeks after induction of diabetes.

Hindlimb ischemia models and assessments

Hindlimb ischemia (HLI) was induced by sequential ligation of the femoral and iliac arteries (*Lig. seq.*) at day 0 and day 4, as previously described ⁷. Surgery was performed under general anesthesia, and induction was ensured by spontaneous ventilation through a mask delivering a mixture of 4% isoflurane (Aerrane; Baxter Healthcare, Maurepas, France) and air and maintained with a mixture of 2% isoflurane and air. Mice were aseptically prepared and a 5 mm incision was made in the left thigh region and re-used on day 4. On day 0, ligation of the left femoral artery was performed midway between the superficial epigastric artery and the bifurcation of the popliteal and saphenous arteries by a nod of 7.0 Prolene[®] (Ethicon, Issy les Moulineaux, France), three collateral vessels were also ligatured. Four days later, ligation of the right common iliac artery was performed by a retroperitoneal approach 0.5 cm distal to its origin, after visualization of the origin of the internal iliac artery. The connective tissues were closed with 6.0 absorbable running sutures. In this unilateral ischemia model, the contralateral limb can be considered as a control. The duration of ischemia was counted from the first operation onwards. To minimize the pain caused by the surgery, mice were administered subcutaneously with 0.05 mg/kg buprenorphin 30 minutes before and 8 hours after surgery.

Mice were sacrificed at day 28. Tibialis anterior muscles were harvested, fixed in methanol, paraffin-embedded, and cut into 7- μ m sections for histological assessment or snap frozen in liquid nitrogen for gene expression analysis. Only mice, in which there was histologic evidence of ischemia in the tibialis anterior muscle (muscle fibers with central nuclei), as assessed by hematoxylin and eosin (H&E) staining, were included in the study.

Fibrosis was assessed after Masson trichrome staining of muscle sections by quantifying the percentage of light green-positive area. Skeletal muscle mean surface area was measured using the Image J software after membrane staining with Wheat Germ Agglutinin (WGA), Alexa Fluor[™] 488 Conjugate (Invitrogen) in 10 pictures randomly taken under x260 magnification. Edema was measured after albumin staining of muscle sections using a sheep anti-albumin antibody (Abcam). For each muscle/lung sections, CD31-, GR-1-, Lectin-, CD68-, hypoxyprome-, BrdU-, light green- or albumin-positive areas were quantified in 10 pictures randomly taken under x260 magnification. Myogenesis was assessed on desmin staining (rabbit polyclonal anti-desmin antibodies, Millipore) of muscle sections and quantified, at a magnification of 20X, as the percentage of remaining desmin-negative area on a single picture of the entire muscle. Immunohistochemistry was performed on the Ventana Benchmark auto-staining system for reproducibility. All pictures (taken on an Axiozoom V16 (Zeiss)) and quantifications (done using ImageJ/Fiji v2.0.0-rc-59 software (National Institute of Health, USA)) were performed by an investigator blinded. More precisely, all samples were assigned a random number prior to animal sacrifice, data collection and analysis. At the end of the experiment, the genotype/treatment for each animal was unveiled to allow data comparison and experimental conclusion.

Immunostaining

Prior to staining, cells were fixed with 100% methanol for 10 minutes. Thoracic aortas were fixed with 10% formalin for 10 minutes immediately after they were harvested, washed with PBS, cleaned and opened longitudinally. Muscle, heart, brain, and lung tissues were fixed in methanol; paraffin embedded and cut into 7 μ m thick sections.

Capillary density was measured in sections stained with CD31 or Cdh5 antibodies (rat anti-mouse CD31 antibodies, BD Pharmingen Inc, Cat# 553370, mouse anti-human CD31 antibodies, Dako, Cat# M0823 or goat anti mouse Cdh5, R&D systems, Cat# AF1002). Pan-leucocytes were identified using mouse anti-human CD45 antibodies (BD Pharmingen Inc, Cat#550539). Macrophage density was assessed after CD68 and Mrc-1 staining (rat anti-CD68 antibodies, Biolegend, Cat #137001), mouse

anti-human CD68, Dako, Cat # M0876), goat anti-mouse Mrc-1, R&D systems, Cat #AF2535, mouse anti-human Mrc-1, R&D systems, Cat# MAB25341). Neutrophils were stained with a rat anti-Ly6G (GR1) antibody (BD Pharmingen Inc, Cat#551459). Dhh expression was quantified using a rabbit anti-C terminal Dhh antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat# sc-13089). Cell-cell junctions were stained using a goat anti-Cadherin-5 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat# sc-6458) and VCAM-1 was revealed using a rabbit anti VCAM-1 antibody (Abcam, Cat# ab134047). Muscle hypoxia was quantified using the Hypoxyprobe™-1 Plus kit following the manufacturer's instructions and BrdU-positive cells were stained using a rat anti-BrdU antibody (Oxford Biotechnology, Cat# OBT00305).

For immunohistochemical analyses, primary antibodies were sequentially coupled with biotin-conjugated secondary antibodies (anti-rat antibodies, Vector Laboratories, Cat#BA-4001, anti-rabbit antibodies, Amersham, Cat#RPN1004, anti-mouse antibodies, Jackson ImmunoResearch, Cat# 715-065-151) and streptavidin-HRP complex (Amersham); the staining was then revealed with a DAB substrate kit (Vector Laboratories) and tissue sections were counterstained with hematoxylin.

For immunofluorescence analyzes, primary antibodies were resolved with Alexa-Fluor-conjugated secondary polyclonal antibodies (Invitrogen, Cat# A-21206, A-21208, A-11077, A-11057, A-31573, A-10037) and nuclei were counterstained with DAPI (1/5000).

For both immunohistochemical and immunofluorescence analyses, negative controls using secondary antibodies only were done to check for antibody specificity.

Wire myography

Femoral arteries, dissected and segmented (1.8-2.0 mm length) were mounted using two tungsten threads in a Mulvany myograph (Danish Myo Technology, Aarhus, Denmark) as previously described⁸. Arteries were bathed in Krebs buffer (119 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.17 mM MgSO₄, 1.18 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ and 5.5 mM glucose) and maintained at 37°C. The arteries were studied under a resting tension corresponding to equivalent transmural pressures of 100 mmHg (13.3kPa), which was previously shown to be the optimal resting tension in a passive length-tension relationship. The arteries functionality was checked by adding 80 mM KCl and no difference was observed between the three groups. The relaxant responses to acetylcholine and sodium nitroprusside were determined after pre-contraction with phenylephrine (3.10⁻⁷M, which corresponds to approximately 90% of the maximal contraction) by adding increased concentrations (ranging from 10⁻⁹ to 10⁻⁶M) of the vasodilatation agent and by building the concentration/relaxation curve.

Cell culture

In vitro experiments were performed using human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Lonza) or human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HMVEC-D) (Lonza). HUVECs were cultured in endothelial basal medium-2 (EBM-2) supplemented with EGM™-2 BulletKits™ (Lonza) while HMVEC-D were cultured in EBM-2 medium supplemented with EGM™-2MV BulletKit™ (Lonza). HeLa ATCC®CCL-2™ cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) supplemented with 10% fetal bovine serum. Cell from passage 3 to passage 6 were used. Before any treatment cells were serum starved in 0.5% fetal bovine serum medium for 24 hours.

siRNA/Transfection

HUVECs were transfected with human Dhh siRNA: rArCrUrCrUrUrArArArGgArGrGrArCrUrArUrUrUrArGCC, human Klf2 siRNA: rUrGrCrUrGrGrArGrGrCrArArGrCrCrArArAUU or universal scrambled negative control siRNA duplex (Origen) using JetPRIME™ transfection reagent (Polyplus Transfection), according to the manufacturer's instructions.

Plasmids/Transfection

The -2617 to +152, 621 to +152, -371 to +152, -194 to +152, -124 to +152 and -54 to +152 fragments of the human Dhh promoter were amplified by PCR and cloned into the *PvuII-NheI* sites of pGL3 basic vector (Promega). The Klf-2 encoding vector pcDNA3-hKlf2 (50) was kindly provided by H. Ohguchi.

HUVECs and HeLa cells were transfected using JetPRIME™ transfection reagent (Polyplus Transfection), according to the manufacturer's instructions.

For gene reporter assays, cells were transfected with pGL3 basic vector (Promega) alone or containing fragments of Dhh promoter together with a transcription factor expressing vector, and pHook-LacZ (Invitrogen). After 48h incubation, cell lysis was harvested by using Passive Lysis Buffer (Promega). Luciferase and β -galactosidase activity were measured using Luciferase assay reagent (Promega) according to the manufacturer's instructions and the ONPG spectrophotometric method, respectively.

Immunoprecipitation/Western blot analysis

Prior to western blot analysis, Cadherin-5 (Cdh5) was immunoprecipitated with goat anti-Cdh5 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-6458).

Expression of β -catenin and Cdh5, were evaluated by SDS PAGE, using a rabbit anti- β -catenin antibody (Sigma, Cat# C2206), and a goat anti-Cdh5 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-6458). Protein loading quantity was controlled using a monoclonal anti- α -tubulin antibody (Sigma). Secondary antibodies were from Invitrogen, Cat#A-21039, A-21084, A-21036). The signal was then revealed by using an Odyssey Infrared imager (Li-cor).

In vitro permeability assay

150 000 cells were seeded in Transwell® inserts. The day after, 0.5 mg/mL 70 kDa FITC-Dextran (Sigma) was added to the upper chamber. FITC fluorescence in the lower chamber was measured 20 minutes later.

Online Table

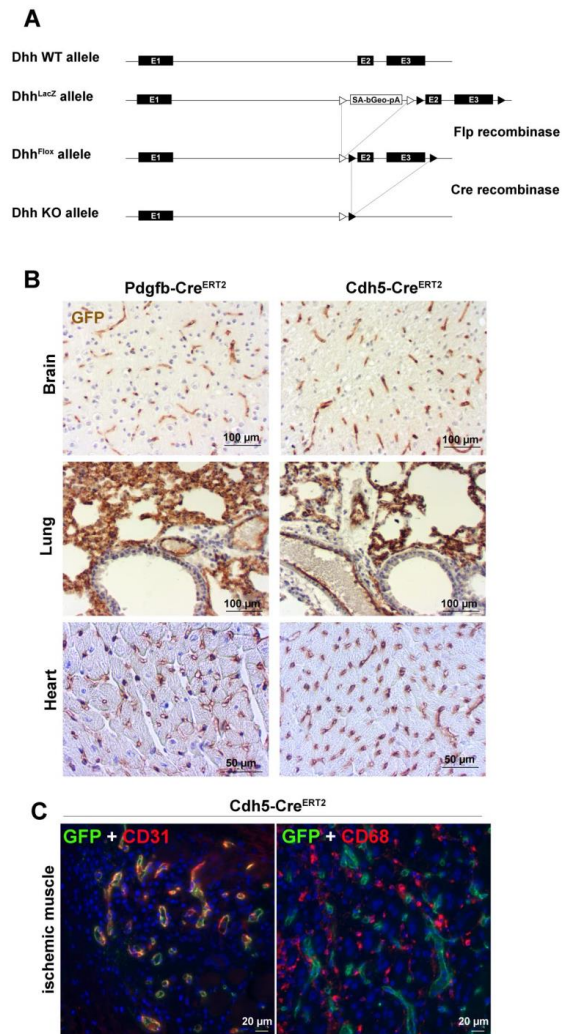
mβ-actin	F	5' - CCTGAACCCTAAGGCCAACC - 3'
	R	5' - TAGCCCTCGTAGATGGGCAC - 3'
mMyh1	F	5' - TGAGGAAGCGGAGGAACAAT - 3'
	R	5' - GTCACCTTCTGCACTTGGAT - 3'
mMyoG	F	5' - CAATGCACTGGAGTTCGGT - 3'
	R	5' - GTGATGGCTTTTGACACCAA - 3'
mSOD2	F	5' - TGCCCAAACCTATCGTGTCC - 3'
	R	5' - AACCAAGGACCCAATGAGCCA - 3'
mVCAM-1	F	5' - CGTACACCATCCGCCAGGCA - 3'
	R	5' - TAGAGTGAAGGAGTTCGGGCG - 3'
mICAM-1	F	5' - TGGCCTGGGGGATGCACACT - 3'
	R	5' - CCACCGGGCTGTAGGTGGGT - 3'
mPGC-1β	F	5' - GAGGGCTCCGGCACTTCC - 3'
	R	5' - CGTACTTGCTTTTCCCAGATG - 3'
mDhh	F	5' - CTTTGGACTGCCCATCTCCTCTCT - 3'
	R	5' - CTTGTAGAGTAGCGGCACGAG - 3'
hβ-actin	F	5' - GGAGGAGCTGGAAGCAGCC - 3'
	R	5' - GCTGTGCTACGTCGCCCTG - 3'
hVCAM-1	F	5' - GGCCAGTTGAAGGATGCGGG - 3'
	R	5' - AGAGCACGAGAAGCTCAGGAGAA - 3'
hSOD2	F	5' - GGGCAAGGTGGAACCTTTG - 3'
	R	5' - GCTTCCTCACTCTCTCACCAG - 3'

F forward, *R* reverse

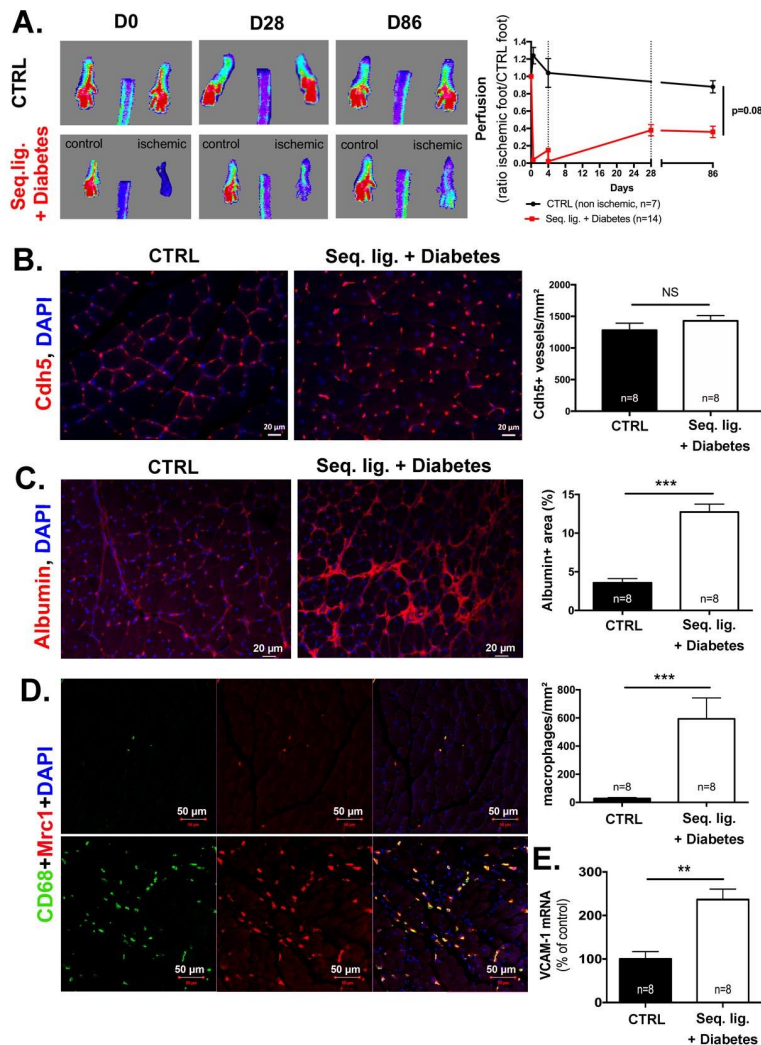
β-actin was used as the household gene

Online Table I: List of primers used for reverse transcription (RT) quantitative polymer chain reaction (qPCR)

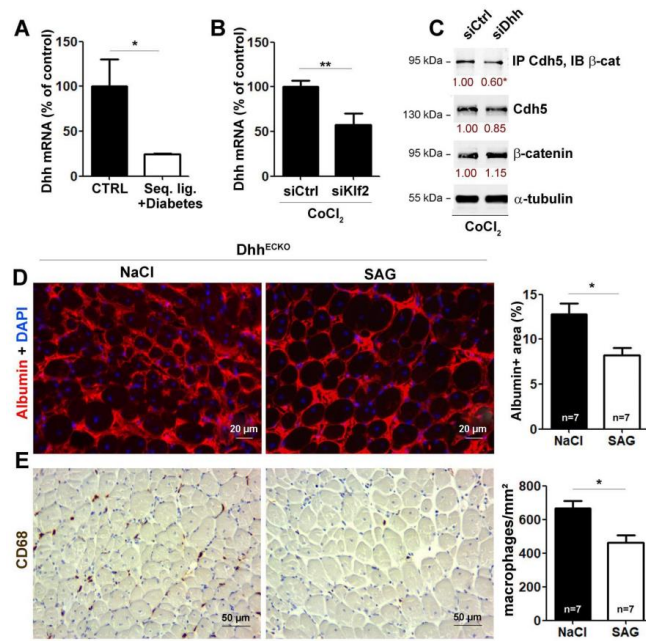
Online Figures



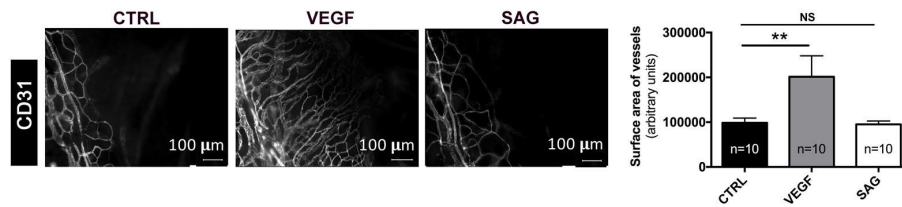
Online Figure I: (A) Schema representing Dhh Floxed allele. (B-C) Pdgfb-Cre^{ERT2} or Cdh5-Cre^{ERT2} mice were bred together with Rosa26^{mTmG} mice. Mice were sacrificed one week after they were administered with tamoxifen. (B) Brain, lung and Heart cross sections, were immuno-stained with anti-GFP antibodies to identify cells in which recombination occurred. (C) Ischemic muscle cross sections were submitted to immuno-fluorescence labeling with anti-CD31 or 68 antibodies (red) (x100) and anti-GFP antibodies (green). Nuclei were stained with DAPI (in blue).



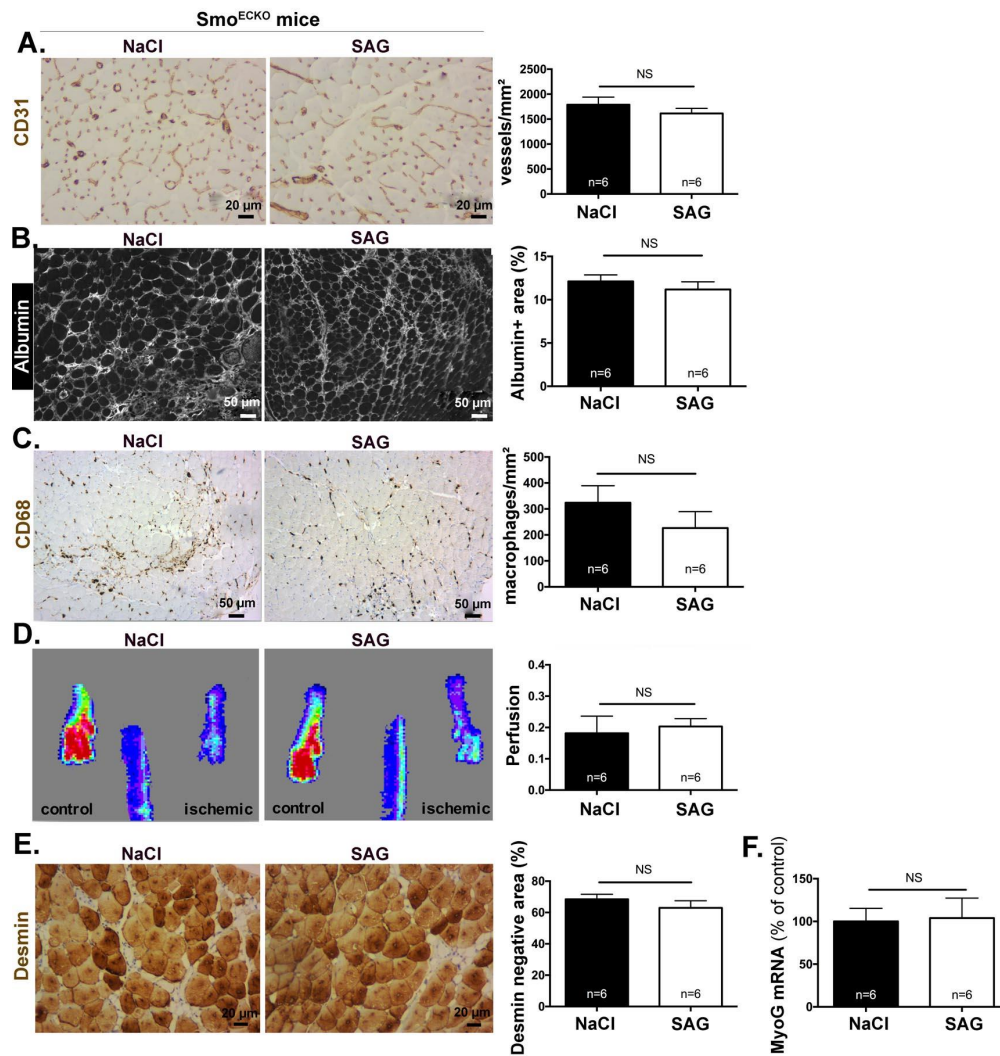
Online Figure II: Diabetic mice display a dramatic decrease in foot perfusion with “normal” capillary density after sequential femoral and iliac artery ligation. Diabetic mice underwent Seq.lig. surgery (n=12 mice). Control mice were not diabetic and free of ischemia (n=12 mice). Mice were sacrificed 28 days after surgery. (A) Perfusion ratio of ischemic limb over control limb on laser Doppler perfusion imaging. (B) Mouse skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-Cdh5 antibodies to identify ECs (brown), and quantified as the number of Cdh5 positive elements. (C) Mouse skeletal muscle cross sections were submitted to immuno-fluorescence labeling with anti-albumin antibodies (red), and quantified as % positive albumin areas. (D) Mice skeletal muscle cross sections were co-immunostained with anti-CD68 (in green) and Mrc1 (in red) antibodies to identify and qualify macrophages, and quantified as the number of CD68 positive elements. (E) VCAM-1 mRNA expression was quantified via RT-qPCR (n=8 per group). **: $p \leq 0.01$, ***: $p \leq 0.001$, NS: not significant. Mann Whitney test



Online Figure III: Dhh is downregulated in ECs within the ischemic muscle (A) Diabetic mice underwent Seq.lig. surgery. Control mice were not diabetic and free of ischemia. Mice were sacrificed 28 days after surgery. Dhh mRNA expression was quantified via RT-qPCR in ECs isolated from the ischemic muscle of diabetic mice (n=4) and from the muscle of healthy CTRL mice (free of ischemia, n = 4). (B) HUVECs were transfected with Klf2 or control siRNAs and cultured in the presence of 150 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 . Dhh mRNA was quantified by RT-qPCR. Both qPCR assays and gene reporter assays were repeated 3 times, each experiment included triplicates. (C) HUVECs were transfected with Dhh or control siRNAs and cultured in the presence of 150 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 . β -catenin interaction with Cdh5 was evaluated by co-immunoprecipitation assay. The experiment was repeated 4 times. (D-E) $\text{Cdh5-Cre}^{\text{ERT2}}$, $\text{Dhh}^{\text{Fllox/Fllox}}$ (Dhh^{ECKO}) mice were submitted to sequential femoral and iliac artery ligation and treated by intraperitoneal injections of a placebo (NaCl, n = 7) or SAG therapy (n = 7). (D) Ischemic muscle cross sections were immunostained with anti-albumin antibodies (red) and quantified as positive albumin areas. (E) Ischemic muscle cross sections were immunostained with anti-CD68 immuno-staining to identify macrophages (brown) quantified as the number of CD68 positive elements/ mm^2 . *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, Mann Whitney test.



Online Figure IV: SAG is not pro-angiogenic in the mouse model of corneal angiogenesis. Micropellets containing the dilution polymer (CTRL), VEGF (positive-CTRL) or SAG therapy were implanted in mice eyes. Flat whole-mount of mice cornea were immunostained with anti-CD31 antibodies (white) (x80) 10 days after implantation and quantified as the surface of CD31 positive elements. *: $p \leq 0.05$, **: $p \leq 0.01$, NS: not significant. Kruskal Wallis test.



Online Figure V : SAG improved EC function and ischemic muscle repair by targeting ECs. Diabetic Cdh5-Cre^{ERT2}, Smo^{Flox/Flox} mice were submitted to sequential femoral and iliac artery ligation and treated by intraperitoneal injections of a placebo (NaCl, n = 6) or SAG therapy (n = 6). (A) Mice skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-Cdh5 antibodies to identify ECs (brown) (x260) quantified as the number of Cdh5-positive elements (B) Mice skeletal muscle cross sections were submitted to immuno-fluorescence labeling with anti-albumin antibodies (red) (x100) quantified as positive albumin areas (C) Mice skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-CD68 immuno-staining to identify macrophages (brown) (x260) quantified as the number of CD68 positive elements (D) Perfusion ratio of ischemic limb over control limb on laser Doppler perfusion imaging (E) Mice skeletal muscle cross sections were immunostained with anti-desmin antibodies to identify myocytes (brown) (x260) quantified as desmin negative areas desmin immuno-staining in brown (x260) and quantitative analysis of desmin negative areas (F) MyoG mRNA expression was quantified via RT-qPCR. NS: not significant, Mann Whitney test.

Supplemental references

1. Dormandy JA, Rutherford RB. Management of peripheral arterial disease (pad). Tasc working group. Transatlantic inter-society consensus (tasc). *J Vasc Surg.* 2000;31:S1-S296
2. Long F, Zhang XM, Karp S, Yang Y, McMahon AP. Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development.* 2001;128:5099-5108
3. Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent cre reporter mouse. *Genesis.* 2007;45:593-605
4. Claxton S, Kostourou V, Jadeja S, Chambon P, Hodivala-Dilke K, Fruttiger M. Efficient, inducible cre-recombinase activation in vascular endothelium. *Genesis.* 2008;46:74-80
5. Azzoni E, Conti V, Campana L, Dellavalle A, Adams RH, Cossu G, Brunelli S. Hemogenic endothelium generates mesoangioblasts that contribute to several mesodermal lineages in vivo. *Development.* 2014;141:1821-1834
6. Luo JD, Wang YY, Fu WL, Wu J, Chen AF. Gene therapy of endothelial nitric oxide synthase and manganese superoxide dismutase restores delayed wound healing in type 1 diabetic mice. *Circulation.* 2004;110:2484-2493
7. Lejay A, Choquet P, Thaveau F, Singh F, Schlagowski A, Charles AL, Laverny G, Metzger D, Zoll J, Chakfe N, Geny B. A new murine model of sustainable and durable chronic critical limb ischemia fairly mimicking human pathology. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2015;49:205-212
8. Dumas de la Roque E, Smeralda G, Quignard JF, Freund-Michel V, Courtois A, Marthan R, Muller B, Guibert C, Dubois M. Altered vasoreactivity in neonatal rats with pulmonary hypertension associated with bronchopulmonary dysplasia: Implication of both enos phosphorylation and calcium signaling. *PLoS one.* 2017;12:e0173044

VII. Perspectives de l'étude

Notre étude a permis tout d'abord de révéler que Shh endogène ne favorise pas l'angiogenèse post-ischémie. Au contraire, l'absence de Shh conduit à une inflammation tissulaire ischémique aberrante et à une angiogenèse transitoire accrue.

Par ailleurs notre étude a démontré que l'ischémie critique de membre inférieur chez l'homme est associée à des capillaires dysfonctionnels plutôt qu'à une diminution de la densité capillaire. L'amélioration du dysfonctionnement endothélial chez la souris améliore la perfusion musculaire squelettique et prévient la myopathie ischémique.

La présente étude identifie un nouvel acteur de la fonction endothéliale, Dhh, une cible en aval de Klf2. Nous démontrons que chez l'adulte, Dhh est exprimé dans les CE et que son expression, ainsi que celle de Klf2, est régulée positivement par les contraintes de cisaillement mais régulée négativement par les cytokines inflammatoires.

De plus, une carence en Dhh induit une activation des CE et une fuite capillaire en raison d'une altération des jonctions adhérentes. Étant donné que les agonistes de Dhh peuvent améliorer la fonction des CE dans des conditions de glucose ou d'inflammation élevés, nous avons émis l'hypothèse que l'ICC est le résultat d'un dysfonctionnement des microvaisseaux, plutôt qu'une diminution de la densité capillaire - une hypothèse qui a été confirmée par notre évaluation des biopsies de muscle humain en ICC.

Enfin, *in vitro* et dans des modèles précliniques, en utilisant des agonistes Dhh actuellement disponibles, nous démontrons que l'amélioration de la fonction des CE par un agoniste de Dhh est une stratégie efficace pour améliorer la perfusion et la réparation des muscles ischémiques.

1. Perspectives fondamentales

Alors que les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-tendant les effets vasculaires de la signalisation Hh restent insaisissables, certains consensus apparaissent. L'étanchéité de la barrière endothéliale induite par Hh semble dépendre de l'activation de la signalisation Hh dans les CE elles-mêmes. Cependant, certains mécanismes restent à élucider. En effet, la différenciation de l'angioblaste dépendrait directement de l'activation des CE par les ligands Hh (Hochman et al. 2006b) et la différenciation artérielle induite par Hh serait soit dépendante de la régulation positive de VEGFA dans une autre cellule (Nathan D. Lawson, Vogel, et Weinstein 2002), soit une conséquence directe de l'activation de la signalisation Hh dans les CE (Williams et al. 2010b).

Jusqu'à présent, très peu d'études ont utilisé des **souris KO conditionnelles spécifiques de cellules** pour étudier la régulation Hh de la biologie des vaisseaux sanguins, ce qui limite la précision des connaissances mécaniques. Cependant, des études utilisant des souris Smo KO spécifiques à la CE montrent que la vascularisation du poumon embryonnaire (Andrew C. White, Lavine, et Ornitz 2007) et l'angiogenèse post-ischémie de patte chez les souris adultes n'impliquent pas l'activation de la signalisation Hh dans les CE (M.-A. Renault, Chapouly, et al. 2013; Gupta et al. 2018b), contrairement à l'étanchéité endothéliale induite par Hh dans le système nerveux (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011; Chapouly et al. 2016b). Plusieurs études *in vitro* ont rapporté que le traitement des CE par des ligands Hh favorisait la migration des CE (M.-A. Renault et al. 2010; Hochman et al. 2006b; Soleti et al. 2009b; Q.-W. He et al. 2013a; Ariel H. Polizio et al. 2011), leur prolifération (Q.-W. He et al. 2013b) et la morphogenèse capillaire (M.-A. Renault et al. 2010; Steven A. Vokes et al. 2004; Azzi et al. 2015b; Soleti et al. 2009b; Pilar Chinchilla et al. 2010; Q.-W. He et al. 2013b), suggérant que les ligands Hh peuvent favoriser l'angiogenèse via une action directe sur les CE, au moins dans certains organes ou conditions.

De plus, alors que VEGFA semble être le principal effecteur de l'angiogenèse induite par Hh, l'étude de la régulation de l'expression de VEGFA par la signalisation Hh a été mal étudiée et limitée aux cellules cancéreuses et même si la plupart des études s'accordent à dire que la signalisation Hh est pro-angiogénique, plusieurs données

contradictoires existent. En effet, la signalisation Hh endogène s'est d'abord avérée favoriser l'angiogenèse post-ischémie et l'administration systémique d'anticorps anti-Hh s'est avérée diminuer les niveaux d'ARNm de VEGFA et la reperfusion des membres ischémiques (Roberto Pola et al. 2003). Cependant, le KO de Gli3 qui, au contraire, induit une activité accrue de la signalisation canonique Hh, s'est également avéré altérer la reperfusion des membres ischémiques (M.-A. Renault et al. 2009; M.-A. Renault, Vandierdonck, et al. 2013, 3). Conformément à ces deux dernières études, nous venons de démontrer que la carence en Shh est associée à une régulation positive indirecte de VEGFA et à une angiogenèse accélérée post-ischémie. Par conséquent, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour comprendre pleinement le rôle de la signalisation Hh endogène dans le membre ischémique. **Par exemple, il serait intéressant de comparer l'activité de signalisation Hh chez les souris auxquelles seraient administrés des anticorps bloquant Hh à celle de souris déficientes pour Shh en utilisant des souris avec gènes rapporteurs afin de pouvoir quantifier l'activité de la signalisation Hh et l'expression de VEGFA dans différents types de cellules.**

Par ailleurs, les mécanismes sous-jacents à l'action de Hh sur le système vasculaire restent mal compris également en raison du **manque d'anticorps fiables, spécifiques et sensibles qui pourraient être utilisés pour détecter l'expression des ligands et récepteurs Hh afin de pouvoir identifier correctement les cellules productrices mais également réceptrices dans la signalisation Hh.** Ainsi, les anticorps anti-Shh les plus utilisés reconnaissent également Ihh et Dhh; c'est le cas des anticorps de lapin anti-Shh (Santa-Cruz, sc-9024), des anticorps de chèvre anti-Shh (Santa-Cruz, sc-1194) et des anticorps de souris anti-Shh (5E1, DHSB)). De ce fait, les effets vasculaires induits par les ligands Hh ont été principalement attribués à Shh, alors que ce n'est peut-être pas le cas. Par exemple, Shh a été suggéré comme étant celui qui favorise l'étanchéité de la BHE à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques (Jorge Ivan Alvarez et al. 2011), tandis qu'une étude récente de séquençage d'ARN sur cellules isolées montre que c'est Dhh, et non pas Shh ou Ihh, qui est exprimé dans l'unité gliovasculaire du cerveau adulte en conditions physiologiques (Vanlandewijck et al. 2018).

2. Perspectives cliniques

La FDA précise qu'une amélioration significative de la survie sans amputation majeure sera nécessaire pour obtenir une autorisation de mise sur le marché, ce qui a découragé le développement de nouveaux médicaments dans l'indication d'ICC par l'industrie pharmaceutique (Cooke et Losordo 2015). Notre étude, par une meilleure compréhension des mécanismes physio-pathologiques sous-jacents à l'ICC, a permis d'identifier la dysfonction endothéliale comme une nouvelle cible thérapeutique, notamment chez les patients diabétiques. Les essais thérapeutiques préliminaires ciblant la voie Hh semblent prometteurs à ce niveau, cependant, il reste nécessaire de **mieux préciser l'implication de cette voie chez l'homme**, idéalement par le biais d'études histologiques et de l'expression protéique. Par ailleurs, il existe un besoin réel d'utilisation de nouvelles **techniques d'imagerie de flux** avec une résolution suffisante, comme l'imagerie par résonance magnétique (IRM) de perfusion, pour permettre de mieux comprendre ces éventuels déficits de perfusion capillaire et pouvoir mesurer l'éventuel bénéfice obtenu par la mise en place d'une thérapie.

De plus, même si la thérapie SAG semble permettre de s'affranchir du phénomène d'angiogenèse, la voie Hh reste une voie de signalisation impliquée dans certains **cancers**. Des études supplémentaires sont nécessaires afin de pouvoir déterminer si l'utilisation d'agonistes de Smo et non des ligands Hh, pourrait permettre de **découpler les effets thérapeutiques de la voie en Hh de leurs potentiels effets carcinogènes** (Dellovade et al. 2006).

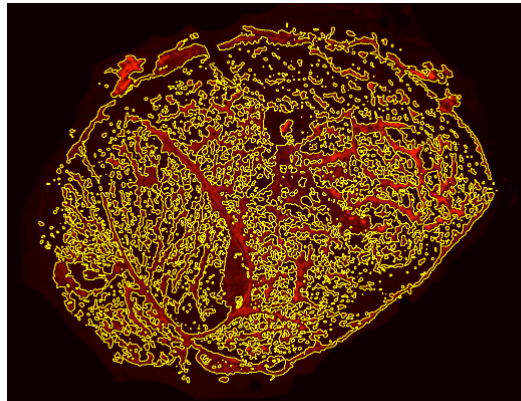
Comme mentionné dans le chapitre précédent, la disponibilité d'anticorps spécifiques de la voie Hh est un pré-requis nécessaire pour comprendre pleinement les mécanismes qui conduisent à l'activation de la voie Hh dans les lésions tissulaires post-ischémie, d'une part parce que le rôle de la signalisation Hh endogène est encore incertain et discordant et d'autre part en raison du potentiel carcinogène de Shh. **C'est pourquoi il est nécessaire de concevoir des thérapies ciblant des molécules de signalisation spécifiques qui favoriseraient la revascularisation des tissus ischémiques mais pas la carcinogenèse.**

Ainsi, de récentes études ont pu mettre en évidence des divergences intéressantes entre les mécanismes d'action médiés par le SAG et le GSA-10 (autre agoniste de Smo). En effet, *in vitro*, le GSA-10 ne stimule pas la prolifération des cellules granulaires du cervelet, et son effet sur la différenciation des cellules n'est pas lié à une augmentation de la transcription Gli1 (Gorojankina et al. 2013). De plus, cette molécule bloque l'activité luciférase Gli-dépendante induite par le SAG, ce qui suggère qu'elle joue également le rôle d'un antagoniste de la voie canonique de la signalisation Hh (Gorojankina et al. 2013).

Pour l'instant il n'existe aucune donnée concrète permettant de déterminer le **type d'agoniste** le mieux adapté pour une utilisation clinique (protéine Hh recombinante, thérapie génique, ou petite molécule agoniste de Smo). D'autre part, il est essentiel de pouvoir déterminer la **dose et la durée de traitement** optimales (les effets sont-ils perdus ou non lors de l'arrêt d'administration de l'agent thérapeutique ?) mais surtout le **mode de délivrance** le plus adapté : injection intramusculaire ou administration intra-artérielle/intra-collatérale. Enfin, l'évolution de l'ingénierie tissulaire et la nanotechnologie sont en pleine évolution et permettront peut-être une administration de médicaments plus localisée, afin de maximiser leur action et de minimiser les effets systémiques (Gotsman et Lichtman 2007), par le biais par exemple de l'utilisation de ballons actifs.

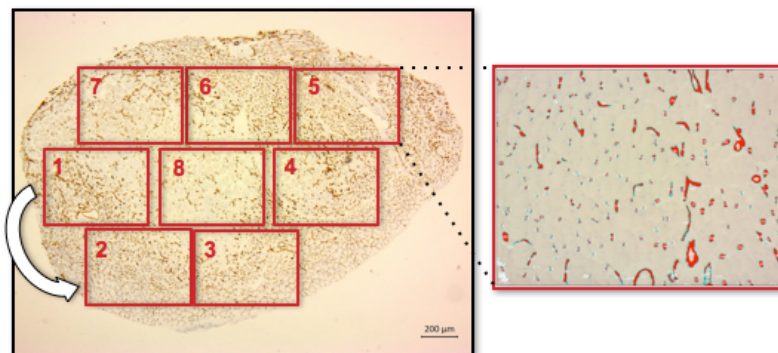
ANNEXES

A. Mesure de la surface marquée par l'albumine



Immuno-marquage Albumine (rouge) au grossissement x20 après application de la méthode de seuillage « Triangle » permettant de contourer ensuite les zones Albumine positives et de mesurer leur surface à l'aide du logiciel Image J

B. Mesure du nombre d'éléments marqués



Exemple d'immuno-marquage CD31(marron) au grossissement x20 à gauche et au grossissement x260 dans l'encadré à droite. La coupe est balayée dans le sens horaire de façon systématique afin de parcourir toute sa surface, 10 photos par coupe ont été prises au total. Dans l'encadré on peut voir la sensibilité de détection du logiciel Image J après réalisation de la macro adaptée (les éléments comptés apparaissent en rouge entouré de bleu)

Annexe 1. Mesures après immunomarquage

REFERENCES

Abe, Yoshinori, Eri Oda-Sato, Kei Tobiume, Keiko Kawauchi, Yoichi Taya, Koji Okamoto, Moshe Oren, et Nobuyuki Tanaka. 2008. « Hedgehog signaling overrides p53-mediated tumor suppression by activating Mdm2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (12) : 4838-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712216105>.

Abmayr, Susan M., et Grace K. Pavlath. 2012. « Myoblast fusion: lessons from flies and mice ». *Development (Cambridge, England)* 139 (4) : 641-56. <https://doi.org/10.1242/dev.068353>.

Aboyans, Victor, Jean-Baptiste Ricco, Marie-Louise E. L. Bartelink, Martin Björck, Marianne Brodmann, Tina Cohnert, Jean-Philippe Collet, et al. 2018. « 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO) The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS) ». *European Heart Journal* 39 (9) : 763-816. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx095>.

Adams, Ralf H., et Kari Alitalo. 2007. « Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (6) : 464-78. <https://doi.org/10.1038/nrm2183>.

ADVANCE Collaborative Group, Anushka Patel, Stephen MacMahon, John Chalmers, Bruce Neal, Laurent Billot, Mark Woodward, et al. 2008. « Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes ». *The New England Journal of Medicine* 358 (24) : 2560-72. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0802987>.

Afsar, Baris, Rengin E. Afsar, Tuncay Dagel, Ege Kaya, Suat Erus, Alberto Ortiz, Adrian Covic, et Mehmet Kanbay. 2018. « Capillary rarefaction from the kidney point of view ». *Clinical Kidney Journal* 11 (3) : 295-301. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfx133>.

Agouni, Abdelali, H. Ahmed Mostefai, Chiarra Porro, Nunzia Carusio, Julie Favre, Vincent Richard, Daniel Henrion, M. Carmen Martínez, et Ramarosan Andriantsitohaina. 2007. « Sonic hedgehog carried by microparticles corrects endothelial injury through nitric oxide release ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (11) : 2735-41. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8079com>.

Agrawal, V., D. Y. Kim, et Y. G. Kwon. 2017. « Hhip regulates tumor-stroma-mediated upregulation of tumor angiogenesis ». *Exp Mol Med* 49 (1) : e289. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.139> emm2016139 [pii].

Ahlgren, U., J. Jonsson, L. Jonsson, K. Simu, et H. Edlund. 1998. « Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes ». *Genes & Development* 12 (12) : 1763-68. <https://doi.org/10.1101/gad.12.12.1763>.

Ahmed, Rafeeq P. H., Khawaja Husnain Haider, Jiang Shujia, Muhammad Rizwan Afzal, et Muhammad Ashraf. 2010. « Sonic Hedgehog gene delivery to the rodent heart promotes angiogenesis via iNOS/netrin-1/PKC pathway ». *PloS One* 5 (1) : e8576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008576>.

Akash, Muhammad Sajid Hamid, Qi Shen, Kanwal Rehman, et Shuqing Chen. 2012. « Interleukin-1 receptor antagonist: a new therapy for type 2 diabetes mellitus ». *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101 (5) : 1647-58. <https://doi.org/10.1002/jps.23057>.

Alexandrescu, Vlad, Christian Ngongang, Gaetane Vincent, Gilles Ledent, et Gérard Hubermont. 2011. « Deep calf veins arterialization for inferior limb preservation in diabetic patients with extended ischaemic wounds, unfit for direct arterial reconstruction: preliminary results according to an angiosome model of perfusion ». *Cardiovascular Revascularization Medicine: Including Molecular Interventions* 12 (1) : 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.carrev.2009.12.002>.

Ali, Hirowati, Noriaki Emoto, Keiko Yagi, Nicolas Vignon-Zellweger, Kazuhiko Nakayama, Kinta

Hatakeyama, Yujiro Asada, Yoshiyuki Rikitake, et Ken-Ichi Hirata. 2013. « Localization and characterization of a novel secreted protein, SCUBE2, in the development and progression of atherosclerosis ». *The Kobe Journal of Medical Sciences* 59 (4) : E122-131.

Althouse, Andrew D., J. Dawn Abbott, Kim Sutton-Tyrrell, Alan D. Forker, Manuel S. Lombardero, L. Virginia Buitrón, Ivan Pena-Sing, Jean-Claude Tardif, Maria Mori Brooks, et BARI 2D Study Group. 2013. « Favorable effects of insulin sensitizers pertinent to peripheral arterial disease in type 2 diabetes: results from the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation 2 Diabetes (BARI 2D) trial ». *Diabetes Care* 36 (10) : 3269-75. <https://doi.org/10.2337/dc12-2265>.

Alvarez, J. I., A. Dodelet-Devillers, H. Kebir, I. Ifergan, P. J. Fabre, S. Terouz, M. Sabbagh, et al. 2011. « The Hedgehog Pathway Promotes Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Immune Quiescence ». *Science* 334 (6063) : 1727-31. <https://doi.org/10.1126/science.1206936>.

Alvarez, Jorge Ivan, Aurore Dodelet-Devillers, Hania Kebir, Igal Ifergan, Pierre J. Fabre, Simone Terouz, Mike Sabbagh, et al. 2011. « The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence ». *Science (New York, N.Y.)* 334 (6063) : 1727-31. <https://doi.org/10.1126/science.1206936>.

American Diabetes Association. 2003. « Peripheral arterial disease in people with diabetes ». *Diabetes Care* 26 (12) : 3333-41.

Armulik, Annika, Alexandra Abramsson, et Christer Betsholtz. 2005. « Endothelial/pericyte interactions ». *Circulation Research* 97 (6) : 512-23. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000182903.16652.d7>.

Arnold, Ludovic, Adeline Henry, Françoise Poron, Yasmine Baba-Amer, Nico van Rooijen, Anne Plonquet, Romain K. Gherardi, et Bénédicte Chazaud. 2007. « Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis ». *The Journal of Experimental Medicine* 204 (5) : 1057-69. <https://doi.org/10.1084/jem.20070075>.

Asai, J., H. Takenaka, K. F. Kusano, M. Ii, C. Luedemann, C. Curry, E. Eaton, et al. 2006. « Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling ». *Circulation* 113 (20) : 2413-24.

Asai, Jun, Hideya Takenaka, Kengo F. Kusano, Masaaki Ii, Corinne Luedemann, Cynthia Curry, Elizabeth Eaton, et al. 2006. « Topical sonic hedgehog gene therapy accelerates wound healing in diabetes by enhancing endothelial progenitor cell-mediated microvascular remodeling ». *Circulation* 113 (20) : 2413-24. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.603167>.

Astorga, J., et P. Carlsson. 2007. « Hedgehog induction of murine vasculogenesis is mediated by Foxf1 and Bmp4 ». *Development* 134 (20) : 3753-61.

Athar, Mohammad, Xiuwei Tang, Juliette L. Lee, Levy Kopelovich, et Arianna L. Kim. 2006. « Hedgehog signalling in skin development and cancer ». *Experimental Dermatology* 15 (9) : 667-77. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2006.00473.x>.

Avogaro, Angelo, Saula Vigili de Kreutzenberg, et Gianpaolo Fadini. 2008. « Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus ». *Diabetes Research and Clinical Practice* 82 Suppl 2 (décembre) : S94-101. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.09.021>.

Ayers, Katie L., et Pascal P. Thérond. 2010. « Evaluating Smoothed as a G-protein-coupled receptor for Hedgehog signalling ». *Trends in Cell Biology* 20 (5) : 287-98. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.02.002>.

Azzi, Sandy, Lucas Treps, Héloïse M. Leclair, Hai-Mi Ngo, Elizabeth Harford-Wright, et Julie Gavard. 2015a. « Desert Hedgehog/Patch2 Axis Contributes to Vascular Permeability and Angiogenesis in Glioblastoma ». *Frontiers in Pharmacology* 6 : 281. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00281>.

———. 2015b. « Desert Hedgehog/Patch2 Axis Contributes to Vascular Permeability and Angiogenesis in Glioblastoma ». *Frontiers in Pharmacology* 6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00281>.

Azzoni, Emanuele, Valentina Conti, Lara Campana, Arianna Dellavalle, Ralf H. Adams, Giulio Cossu, et Silvia Brunelli. 2014. « Hemogenic endothelium generates mesoangioblasts that contribute to several mesodermal lineages in vivo ». *Development* 141 (9) : 1821-34. <https://doi.org/10.1242/dev.103242>.

Bäck, M., C. Weber, et E. Lutgens. 2015. « Regulation of atherosclerotic plaque inflammation ». *Journal of Internal Medicine* 278 (5) : 462-82. <https://doi.org/10.1111/joim.12367>.

Bader, B. L., H. Rayburn, D. Crowley, et R. O. Hynes. 1998. « Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins ». *Cell* 95 (4) : 507-19. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81618-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81618-9).

Bai, C. Brian, Wojtek Auerbach, Joon S. Lee, Daniel Stephen, et Alexandra L. Joyner. 2002. « Gli2, but not Gli1, is required for initial Shh signaling and ectopic activation of the Shh pathway ». *Development (Cambridge, England)* 129 (20) : 4753-61.

Bai, C. Brian, Daniel Stephen, et Alexandra L. Joyner. 2004. « All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3 ». *Developmental Cell* 6 (1) : 103-15. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00394-0](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00394-0).

Banerjee, Monisha, et Madhukar Saxena. 2012. « Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 413 (15-16) : 1163-70. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.03.021>.

Bangs, Fiona, et Kathryn V. Anderson. 2017. « Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling ». *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 (5). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028175>.

Baum, Oliver, Eleonora Torchetti, Corinna Malik, Birgitte Hoier, Meegan Walker, Philip J. Walker, Adolfo Odriozola, et al. 2016. « Capillary ultrastructure and mitochondrial volume density in skeletal muscle in relation to reduced exercise capacity of patients with intermittent claudication ». *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 310 (10) : R943-951. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00480.2015>.

Becher, O. J., D. Hambardzumyan, E. I. Fomchenko, H. Momota, L. Mainwaring, A. M. Bleau, A. M. Katz, et al. 2008. « Gli activity correlates with tumor grade in platelet-derived growth factor-induced gliomas ». *Cancer Res* 68 (7) : 2241-49. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6350> 68/7/2241 [pii].

Becker, F., H. Robert-Ebadi, J. -B. Ricco, C. Setacci, P. Cao, G. de Donato, H. H. Eckstein, et al. 2011. « Chapter I: Definitions, Epidemiology, Clinical Presentation and Prognosis ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery, Management of Critical Limb Ischaemia and Diabetic Foot. Clinical Practice Guidelines of the European Society for Vascular Surgery*, 42 (décembre) : 54-12. [https://doi.org/10.1016/S1078-5884\(11\)60009-9](https://doi.org/10.1016/S1078-5884(11)60009-9).

Belch, Jill, William R. Hiatt, Iris Baumgartner, I. Vickie Driver, Sigrid Nikol, Lars Norgren, Eric Van Belle, et TAMARIS Committees and Investigators. 2011. « Effect of fibroblast growth factor NV1FGF on amputation and death: a randomised placebo-controlled trial of gene therapy in critical limb ischaemia ». *Lancet (London, England)* 377 (9781) : 1929-37. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60394-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60394-2).

Belgacem, Yesser H., et Laura N. Borodinsky. 2015. « Inversion of Sonic hedgehog action on its canonical pathway by electrical activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (13) : 4140-45. <https://doi.org/10.1073/pnas.1419690112>.

Beloti, Márcio M., Larissa S. Bellesini, et Adalberto L. Rosa. 2005a. « Purmorphamine enhances osteogenic activity of human osteoblasts derived from bone marrow mesenchymal cells ». *Cell Biology*

International 29 (7) : 537-41. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.02.007>.

Beloti, Márcio M., Larissa S. Bellesini, et Adalberto Luiz Rosa. 2005b. « The effect of purmorphamine on osteoblast phenotype expression of human bone marrow mesenchymal cells cultured on titanium ». *Biomaterials* 26 (20) : 4245-48. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.039>.

Benameur, Tarek, Raffaella Soleti, Chiara Porro, Ramaroson Andriantsitohaina, et Maria Carmen Martínez. 2010. « Microparticles carrying Sonic hedgehog favor neovascularization through the activation of nitric oxide pathway in mice ». *PloS One* 5 (9) : e12688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012688>.

Benedict, Kelly F., Gregory S. Coffin, Eugene J. Barrett, et Thomas C. Skalak. 2011. « Hemodynamic systems analysis of capillary network remodeling during the progression of type 2 diabetes ». *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 18 (1) : 63-73. <https://doi.org/10.1111/j.1549-8719.2010.00069.x>.

Berlin, Jordan, Johanna C. Bendell, Lowell L. Hart, Irfan Firdaus, Ira Gore, Robert C. Hermann, Mary F. Mulcahy, et al. 2013. « A randomized phase II trial of vismodegib versus placebo with FOLFOX or FOLFIRI and bevacizumab in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (1) : 258-67. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1800>.

Berman, David M., Sunil S. Karhadkar, Andrew R. Hallahan, Joel I. Pritchard, Charles G. Eberhart, D. Neil Watkins, James K. Chen, et al. 2002. « Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade ». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5586) : 1559-61. <https://doi.org/10.1126/science.1073733>.

Berrios-Otero, Cesar A., Youssef Zaim Wadghiri, Brian J. Nieman, Alexandra L. Joyner, et Daniel H. Turnbull. 2009. « Three-dimensional micro-MRI analysis of cerebral artery development in mouse embryos ». *Magnetic Resonance in Medicine* 62 (6) : 1431-39. <https://doi.org/10.1002/mrm.22113>.

Bettencourt-Dias, Mónica, Friedhelm Hildebrandt, David Pellman, Geoff Woods, et Susana A. Godinho. 2011. « Centrosomes and cilia in human disease ». *Trends in genetics: TIG* 27 (8) : 307-15. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.05.004>.

Bhattacharya, Resham, Sucharita Senbanerjee, Zhiyong Lin, Samy Mir, Anne Hamik, Ping Wang, Priyabrata Mukherjee, Debabrata Mukhopadhyay, et Mukesh K. Jain. 2005. « Inhibition of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by the Kruppel-like factor KLF2 ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (32) : 28848-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500200200>.

Bidet, Michel, Olivier Joubert, Benoit Lacombe, Marine Ciantar, Rony Nehmé, Patrick Mollat, Lionel Brétilon, et al. 2011. « The hedgehog receptor patched is involved in cholesterol transport ». *PloS One* 6 (9) : e23834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023834>.

Bijlsma, M. F., P. J. Leenders, B. J. Janssen, M. P. Peppelenbosch, H. Ten Cate, et C. A. Spek. 2008. « Endogenous hedgehog expression contributes to myocardial ischemia-reperfusion-induced injury ». *Exp Biol Med (Maywood)* 233 (8) : 989-96.

Birukov, Konstantin G. 2009. « Cyclic stretch, reactive oxygen species, and vascular remodeling ». *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (7) : 1651-67. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2390>.

Bitgood, M. J., et A. P. McMahon. 1995a. « Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo ». *Dev. Biol.* 172(1) : 126-38.

———. 1995b. « Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo ». *Developmental Biology* 172 (1) : 126-38. <https://doi.org/10.1006/dbio.1995.0010>.

Bitgood, M. J., L. Shen, et A. P. McMahon. 1996a. « Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline ». *Current Biology* 6(3) : 298-304.

———. 1996b. « Sertoli cell signaling by Desert hedgehog regulates the male germline ». *Current biology: CB* 6 (3) : 298-304.

Braune, Julia, Ulrike Weyer, Madlen Matz-Soja, Constance Hobusch, Matthias Kern, Anne Kunath, Nora Klötting, et al. 2017. « Hedgehog signalling in myeloid cells impacts on body weight, adipose tissue inflammation and glucose metabolism ». *Diabetologia* 60 (5) : 889-99. <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4223-5>.

Brilha, Sara, Catherine W. M. Ong, Babette Weksler, Nacho Romero, Pierre-Olivier Couraud, et Jon S. Friedland. 2017. « Matrix metalloproteinase-9 activity and a downregulated Hedgehog pathway impair blood-brain barrier function in an in vitro model of CNS tuberculosis ». *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16250-3>.

Briscoe, James, et Pascal P. Thérond. 2013. « The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (7) : 416-29. <https://doi.org/10.1038/nrm3598>.

Brisset, Anne C., Brant E. Isakson, et Brenda R. Kwak. 2009. « Connexins in Vascular Physiology and Pathology ». *Antioxidants & Redox Signaling* 11 (2) : 267-82. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2115>.

Brown, L. A., A. R. Rodaway, T. F. Schilling, T. Jowett, P. W. Ingham, R. K. Patient, et A. D. Sharrocks. 2000. « Insights into early vasculogenesis revealed by expression of the ETS-domain transcription factor Fli-1 in wild-type and mutant zebrafish embryos ». *Mech Dev* 90 (2) : 237-52.

Brunton, Shirley A., John H. A. Stibbard, Lee L. Rubin, Oivin M. Guicherit, Lawrence I. Kruse, Stephen Price, Raffaella di Lucrezia, et al. 2009. « Potent agonists of the Hedgehog signaling pathway ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 19 (15) : 4308-11. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.05.096>.

Bueno-Betí, Carlos, Susana Novella, Raffaella Soletti, Ana Mompeón, Luisa Vergori, Juan Sanchís, Ramarason Andriantsitohaina, María Carmen Martínez, et Carlos Hermenegildo. 2019. « Microparticles harbouring Sonic hedgehog morphogen improve the vasculogenesis capacity of endothelial progenitor cells derived from myocardial infarction patients ». *Cardiovascular Research* 115 (2) : 409-18. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy189>.

Buonamici, Silvia, Juliet Williams, Michael Morrissey, Anlai Wang, Ribo Guo, Anthony Vattay, Kathy Hsiao, et al. 2010. « Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma ». *Science Translational Medicine* 2 (51) : 51ra70. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001599>.

Burton, H. W., B. M. Carlson, et J. A. Faulkner. 1987. « Microcirculatory adaptation to skeletal muscle transplantation ». *Annual Review of Physiology* 49 : 439-51. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.49.030187.002255>.

Buttitta, Laura, Rong Mo, Chi-Chung Hui, et Chen-Ming Fan. 2003. « Interplays of Gli2 and Gli3 and their requirement in mediating Shh-dependent sclerotome induction ». *Development (Cambridge, England)* 130 (25) : 6233-43. <https://doi.org/10.1242/dev.00851>.

Byrd, N., S. Becker, P. Maye, R. Narasimhaiah, B. St-Jacques, X. Zhang, J. McMahon, A. McMahon, et L. Gabel. 2002. « Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis ». *Development* 129 (2) : 361-72.

Cahill, Paul A., et Eileen M. Redmond. 2016. « Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health ». *Atherosclerosis* 248 (mai) : 97-109. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007>.

Calcutt, Nigel A., Karen L. Allendoerfer, Andrew P. Mizisin, Alicia Middlemas, Jason D. Freshwater,

Monica Burgers, Rigel Ranciato, et al. 2003. « Therapeutic efficacy of sonic hedgehog protein in experimental diabetic neuropathy ». *The Journal of Clinical Investigation* 111 (4) : 507-14. <https://doi.org/10.1172/JCI15792>.

Callaghan, Brian C., Junguk Hur, et Eva L. Feldman. 2012. « Diabetic neuropathy: one disease or two? » *Current Opinion in Neurology* 25 (5) : 536-41. <https://doi.org/10.1097/WCO.0b013e328357a797>.

Cao, Renhai, Sharon Lim, Hong Ji, Yin Zhang, Yunlong Yang, Jennifer Honek, Eva-Maria Hedlund, et Yihai Cao. 2011. « Mouse corneal lymphangiogenesis model ». *Nature Protocols* 6 (6) : 817-26. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.359>.

Cao, X., J. Geradts, M. W. Dewhirst, et H. W. Lo. 2012. « Upregulation of VEGF-A and CD24 gene expression by the tGLI1 transcription factor contributes to the aggressive behavior of breast cancer cells ». *Oncogene* 31 (1) : 104-15. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.219> onc2011219 [pii].

Caradu, Caroline, Thierry Couffignal, Candice Chapouly, Sarah Guimbal, Pierre-Louis Hollier, Eric Ducasse, Alessandra Bura-Rivière, Mathilde Dubois, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2018. « Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults ». *Circulation Research* 123 (9) : 1053-65. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313177>.

Caradu, Caroline, Alexandre Guy, Chloé James, Annabel Reynaud, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2018. « Endogenous Sonic Hedgehog limits inflammation and angiogenesis in the ischaemic skeletal muscle of mice ». *Cardiovascular Research* 114 (5) : 759-70. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy017>.

Carmeliet, P. 2000. « Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis ». *Nature Medicine* 6 (4) : 389-95. <https://doi.org/10.1038/74651>.

Carmeliet, P., V. Ferreira, G. Breier, S. Pollefeyt, L. Kieckens, M. Gertsenstein, M. Fahrig, et al. 1996. « Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele ». *Nature* 380 (6573) : 435-39. <https://doi.org/10.1038/380435a0>.

Carmeliet, Peter, et Rakesh K. Jain. 2011. « Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis ». *Nature* 473 (7347) : 298-307. <https://doi.org/10.1038/nature10144>.

Chapouly, Candice, Sarah Guimbal, Pierre-Louis Hollier, et Marie-Ange Renault. 2019. « Role of Hedgehog Signaling in Vasculature Development, Differentiation, and Maintenance ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (12). <https://doi.org/10.3390/ijms20123076>.

Chapouly, Candice, Qinyu Yao, Soizic Vandierdonck, Frederic Larrieu-Lahargue, John N. Mariani, Alain-Pierre Gadeau, et Marie-Ange Renault. 2016a. « Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: implication in diabetes ». *Cardiovascular Research* 109 (2) : 217-27. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv263>.

———. 2016b. « Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: implication in diabetes ». *Cardiovascular Research* 109 (2) : 217-27. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv263>.

Chatterjee, Shampa, Elizabeth A. Browning, NanKang Hong, Kris DeBolt, Elena M. Sorokina, Weidong Liu, Morris J. Birnbaum, et Aron B. Fisher. 2012. « Membrane depolarization is the trigger for PI3K/Akt activation and leads to the generation of ROS ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 302 (1) : H105-114. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00298.2011>.

Chechneva, O. V., F. Mayrhofer, D. J. Daugherty, R. G. Krishnamurty, P. Bannerman, D. E. Pleasure, et W. Deng. 2014a. « A Smoothed receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury ». *Cell Death & Disease* 5 (octobre) : e1481. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.446>.

———. 2014b. « A Smoothened receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury ». *Cell Death Dis* 5 (octobre) : e1481. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.446> <https://doi.org/10.1038/cddis2014446> [pii].

Chen, James K., Jussi Taipale, Keith E. Young, Tapan Maiti, et Philip A. Beachy. 2002. « Small molecule modulation of Smoothened activity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (22) : 14071-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.182542899>.

Chen, K., Q. J. Chen, L. J. Wang, Z. H. Liu, Q. Zhang, K. Yang, H. B. Wang, et al. 2016. « Increment of HFABP Level in Coronary Artery In-Stent Restenosis Segments in Diabetic and Nondiabetic Minipigs: HFABP Overexpression Promotes Multiple Pathway-Related Inflammation, Growth and Migration in Human Vascular Smooth Muscle Cells ». *J Vasc Res* 53 (1-2) : 27-38. <https://doi.org/000446652> [pii] [10.1159/000446652](https://doi.org/10.1159/000446652).

Chen, Sheng-Cai, Ming Huang, Quan-Wei He, Yan Zhang, Elvis Nana Opoku, Hang Yang, Hui-Juan Jin, Yuan-Peng Xia, et Bo Hu. 2017. « Administration of sonic hedgehog protein induces angiogenesis and has therapeutic effects after stroke in rats ». *Neuroscience* 352 : 285-95. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.03.054>.

Chen, W., T. Tang, J. Eastham-Anderson, D. Dunlap, B. Alicke, M. Nannini, S. Gould, et al. 2011. « Canonical hedgehog signaling augments tumor angiogenesis by induction of VEGF-A in stromal perivascular cells ». *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (23) : 9589-94.

Cheng, S. W., L. L. Wu, A. C. Ting, H. Lau, et J. Wong. 1999. « Screening for asymptomatic carotid stenosis in patients with peripheral vascular disease: a prospective study and risk factor analysis ». *Cardiovascular Surgery (London, England)* 7 (3) : 303-9. [https://doi.org/10.1016/s0967-2109\(98\)00115-x](https://doi.org/10.1016/s0967-2109(98)00115-x).

Cheng, Steven Yan, et J. Michael Bishop. 2002. « Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (8) : 5442-47. <https://doi.org/10.1073/pnas.082096999>.

Chinchilla, P., L. Xiao, M. G. Kazanietz, et N. A. Riobo. 2010. « Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways ». *Cell Cycle* 9 (3) : 570-79.

Chinchilla, Pilar, Liqing Xiao, Marcelo G. Kazanietz, et Natalia A. Riobo. 2010. « Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (3) : 570-79. <https://doi.org/10.4161/cc.9.3.10591>.

Chiu, K. W. H., R. S. M. Davies, P. G. Nightingale, A. W. Bradbury, et D. J. Adam. 2010. « Review of direct anatomical open surgical management of atherosclerotic aorto-iliac occlusive disease ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 39 (4) : 460-71. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2009.12.014>.

Choi, Byoung-Joo, Yoshiki Matsuo, Tatsuo Aoki, Taek-Geun Kwon, Abhiram Prasad, Rajiv Gulati, Ryan J. Lennon, Lilach O. Lerman, et Amir Lerman. 2014. « Coronary endothelial dysfunction is associated with inflammation and vasa vasorum proliferation in patients with early atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 34 (11) : 2473-77. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.304445>.

Choi, Young-Eun, Young Ryun Cha, Kyoung-min Lee, Hyun Jin Kim, et Chang-Hwan Yoon. 2015. « Proangiogenic cells enhanced persistent and physiologic neovascularization compared with macrophages ». *Experimental & Molecular Medicine* 47 (9) : e186-e186. <https://doi.org/10.1038/emm.2015.60>.

Chuang, P. T., et A. P. McMahon. 1999. « Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein ». *Nature* 397 (6720) : 617-21. <https://doi.org/10.1038/17611>.

Ciavarella, A., A. Silletti, A. Mustacchio, M. Gargiulo, M. C. Galaverni, A. Stella, et P. Vannini. 1993. « Angiographic evaluation of the anatomic pattern of arterial obstructions in diabetic patients with critical limb ischaemia ». *Diabete & Metabolisme* 19 (6) : 586-89.

Ciuffetti, Giovanni, Giuseppe Schillaci, Salvatore Innocente, Rita Lombardini, Leonella Pasqualini, Salvatore Notaristefano, et Elmo Mannarino. 2003. « Capillary rarefaction and abnormal cardiovascular reactivity in hypertension ». *Journal of Hypertension* 21 (12) : 2297-2303.

Clausen, B.E., C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, et I. Förster. 1999. « Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice ». *Transgenic Research* 8 (4) : 265-77. <https://doi.org/10.1023/A:1008942828960>.

Claxton, Suzanne, Vassiliki Kostourou, Shalini Jadeja, Pierre Chambon, Kairbaan Hodivala-Dilke, et Marcus Fruttiger. 2008. « Efficient, inducible Cre-recombinase activation in vascular endothelium ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 46 (2) : 74-80. <https://doi.org/10.1002/dvg.20367>.

Coats, Paul, et Roger Wadsworth. 2005. « Marriage of resistance and conduit arteries breeds critical limb ischemia ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 288 (3) : H1044-1050. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00773.2004>.

Colnot, C., L. de la Fuente, S. Huang, D. Hu, C. Lu, B. St-Jacques, et J. A. Helms. 2005. « Indian hedgehog synchronizes skeletal angiogenesis and perichondrial maturation with cartilage development ». *Development* 132 (5) : 1057-67.

Compagna, Rita, Bruno Amato, Salvatore Massa, Maurizio Amato, Raffaele Grande, Lucia Butrico, Stefano de Franciscis, et Raffaele Serra. 2015. « Cell Therapy in Patients with Critical Limb Ischemia ». *Stem Cells International* 2015 : 931420. <https://doi.org/10.1155/2015/931420>.

Conte, Michael S., Andrew W. Bradbury, Philippe Kolh, John V. White, Florian Dick, Robert Fitridge, Joseph L. Mills, et al. 2019. « Global Vascular Guidelines on the Management of Chronic Limb-Threatening Ischemia ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 58 (1S) : S1-S109.e33. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2019.05.006>.

Conte, Michael S., Patrick J. Geraghty, Andrew W. Bradbury, Nathanael D. Hevelone, Stuart R. Lipsitz, Gregory L. Moneta, Mark R. Nehler, Richard J. Powell, et Anton N. Sidawy. 2009. « Suggested objective performance goals and clinical trial design for evaluating catheter-based treatment of critical limb ischemia ». *Journal of Vascular Surgery* 50 (6) : 1462-1473.e1-3. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2009.09.044>.

Cooke, John P., et Douglas W. Losordo. 2015. « Modulating the Vascular Response to Limb Ischemia: Angiogenic and Cell Therapies ». *Circulation research* 116 (9) : 1561-78. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.303565>.

Cooper, Michael K., Christopher A. Wassif, Patrycja A. Krakowiak, Jussi Taipale, Ruoyu Gong, Richard I. Kelley, Forbes D. Porter, et Philip A. Beachy. 2003. « A defective response to Hedgehog signaling in disorders of cholesterol biosynthesis ». *Nature Genetics* 33 (4) : 508-13. <https://doi.org/10.1038/ng1134>.

Corada, M., F. Liao, M. Lindgren, M. G. Lampugnani, F. Breviario, R. Frank, W. A. Muller, D. J. Hicklin, P. Bohlen, et E. Dejana. 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) : 1679-84. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.6.1679>.

Corcoran, Ryan B., et Matthew P. Scott. 2006. « Oxysterols stimulate Sonic hedgehog signal transduction and proliferation of medulloblastoma cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (22) : 8408-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602852103>.

Couffinhal, T., M. Silver, M. Kearney, A. Sullivan, B. Witzgenbichler, M. Magner, B. Annex, K. Peters, et J. M. Isner. 1999. « Impaired collateral vessel development associated with reduced expression of vascular endothelial growth factor in ApoE^{-/-} mice ». *Circulation* 99 (24) : 3188-98.

Coultas, L., E. Nieuwenhuis, G. A. Anderson, J. Cabezas, A. Nagy, R. M. Henkelman, C. C. Hui, et J. Rossant. 2010. « Hedgehog regulates distinct vascular patterning events through VEGF-dependent and -independent mechanisms ». *Blood* 116 (4) : 653-60.

Coussens, L. M., W. W. Raymond, G. Bergers, M. Laig-Webster, O. Behrendtsen, Z. Werb, G. H. Caughey, et D. Hanahan. 1999. « Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis ». *Genes & Development* 13 (11) : 1382-97. <https://doi.org/10.1101/gad.13.11.1382>.

Cox, Brandon C., Zhiyong Liu, Marcia M. Mellado Lagarde, et Jian Zuo. 2012. « Conditional gene expression in the mouse inner ear using Cre-loxP ». *Journal of the Association for Research in Otolaryngology: JARO* 13 (3) : 295-322. <https://doi.org/10.1007/s10162-012-0324-5>.

Cui, D., X. Chen, J. Yin, W. Wang, M. Lou, et S. Gu. 2012. « Aberrant activation of Hedgehog/Gli1 pathway on angiogenesis in gliomas ». *Neurol India* 60 (6) : 589-96. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.105192> ni_2012_60_6_589_105192 [pii].

Dakubo, G. D., C. Mazerolle, M. Furimsky, C. Yu, B. St-Jacques, A. P. McMahon, et V. A. Wallace. 2008. « Indian hedgehog signaling from endothelial cells is required for sclera and retinal pigment epithelium development in the mouse eye ». *Dev Biol* 320 (1) : 242-55.

Das, Jayanta R., et Robert T. Eberhardt. 2013. « Contemporary risk assessment and cardiovascular outcomes in peripheral arterial disease ». *Cardiovascular & Hematological Disorders Drug Targets* 13 (3) : 185-96. <https://doi.org/10.2174/1871529x1303140129154241>.

Dassule, H. R., P. Lewis, M. Bei, R. Maas, et A. P. McMahon. 2000. « Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth ». *Development (Cambridge, England)* 127 (22) : 4775-85.

Dejana, Elisabetta. 2004. « Endothelial cell-cell junctions: happy together ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (4) : 261-70. <https://doi.org/10.1038/nrm1357>.

Dekker, Rob J., Reinier A. Boon, Mariska G. Rondaij, Astrid Kragt, Oscar L. Volger, Yvonne W. Elderkamp, Joost C. M. Meijers, Jan Voorberg, Hans Pannekoek, et Anton J. G. Horrevoets. 2006. « KLF2 provokes a gene expression pattern that establishes functional quiescent differentiation of the endothelium ». *Blood* 107 (11) : 4354-63. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-3465>.

Del Sal, G., M. E. Ruaro, L. Philipson, et C. Schneider. 1992. « The growth arrest-specific gene, gas1, is involved in growth suppression ». *Cell* 70 (4) : 595-607. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90429-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90429-g).

Dellovade, Tammy, Justyna T. Romer, Tom Curran, et Lee L. Rubin. 2006. « The hedgehog pathway and neurological disorders ». *Annual Review of Neuroscience* 29 : 539-63. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.112858>.

Dhatariya, Ketan, Stephen C. Bain, John B. Buse, Richard Simpson, Lise Tarnow, Margit Staum Kaltoft, Michael Stellfeld, Karen Tornøe, Richard E. Pratley, et LEADER Publication Committee on behalf of the LEADER Trial Investigators. 2018. « The Impact of Liraglutide on Diabetes-Related Foot Ulceration and Associated Complications in Patients With Type 2 Diabetes at High Risk for Cardiovascular Events: Results From the LEADER Trial ». *Diabetes Care* 41 (10) : 2229-35. <https://doi.org/10.2337/dc18-1094>.

Di Mauro, C., R. Rosa, V. D'Amato, P. Ciciola, A. Servetto, R. Marciano, R. C. Orsini, et al. 2017. « Hedgehog signalling pathway orchestrates angiogenesis in triple-negative breast cancers ». *Br J Cancer* 116 (11) : 1425-35. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.116> bjc2017116 [pii].

Diabetes Control and Complications Trial Research Group, D. M. Nathan, S. Genuth, J. Lachin, P. Cleary, O. Crofford, M. Davis, L. Rand, et C. Siebert. 1993. « The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus ». *The New England Journal of Medicine* 329 (14) : 977-86. <https://doi.org/10.1056/NEJM199309303291401>.

Ding, Q., J. Motoyama, S. Gasca, R. Mo, H. Sasaki, J. Rossant, et C. C. Hui. 1998. « Diminished Sonic hedgehog signaling and lack of floor plate differentiation in Gli2 mutant mice ». *Development (Cambridge, England)* 125 (14) : 2533-43.

Dohle, E., S. Fuchs, M. Kolbe, A. Hofmann, H. Schmidt, et C. J. Kirkpatrick. 2011. « Comparative study assessing effects of sonic hedgehog and VEGF in a human co-culture model for bone vascularisation strategies ». *Eur Cell Mater* 21 (février) : 144-56. <https://doi.org/vol021a12> [pii].

Dohle, Eva, Sabine Fuchs, Marlen Kolbe, Alexander Hofmann, Harald Schmidt, et Charles James Kirkpatrick. 2010. « Sonic hedgehog promotes angiogenesis and osteogenesis in a coculture system consisting of primary osteoblasts and outgrowth endothelial cells ». *Tissue Engineering. Part A* 16 (4) : 1235-37. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0493>.

Donath, Marc Y., et Steven E. Shoelson. 2011. « Type 2 diabetes as an inflammatory disease ». *Nature Reviews. Immunology* 11 (2) : 98-107. <https://doi.org/10.1038/nri2925>.

Dormandy, J. A., et R. B. Rutherford. 2000. « Management of peripheral arterial disease (PAD). TASC Working Group. TransAtlantic Inter-Society Consensus (TASC) ». *Journal of Vascular Surgery* 31 (1 Pt 2) : S1-296.

Dormandy, John A., Bernard Charbonnel, David J. A. Eckland, Erland Erdmann, Massimo Massi-Benedetti, Ian K. Moules, Allan M. Skene, et al. 2005. « Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events): a randomised controlled trial ». *Lancet (London, England)* 366 (9493) : 1279-89. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67528-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67528-9).

Doyle, A. J., E. M. Redmond, D. L. Gillespie, P. A. Knight, J. P. Cullen, P. A. Cahill, et D. J. Morrow. 2015. « Differential expression of Hedgehog/Notch and transforming growth factor-beta in human abdominal aortic aneurysms ». *J Vasc Surg* 62 (2) : 464-70. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2014.02.053> S0741-5214(14)00322-X [pii].

Duan, Xuchen, Yurie Murata, Yanqiu Liu, Claudia Nicolae, Bjorn R. Olsen, et Agnes D. Berendsen. 2015. « Vegfa regulates perichondrial vascularity and osteoblast differentiation in bone development ». *Development (Cambridge, England)* 142 (11) : 1984-91. <https://doi.org/10.1242/dev.117952>.

Dubó, Sebastián, David Gallegos, Lissette Cabrera, Luis Sobrevia, Leandro Zúñiga, et Marcelo González. 2016. « Cardiovascular Action of Insulin in Health and Disease: Endothelial L-Arginine Transport and Cardiac Voltage-Dependent Potassium Channels ». *Frontiers in Physiology* 7 : 74. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00074>.

Duff, Steve, Michael S. Mafilios, Prajakta Bhounsule, et James T. Hasegawa. 2019. « The burden of critical limb ischemia: a review of recent literature ». *Vascular Health and Risk Management* 15 : 187-208. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S209241>.

Dutta, S., S. Bonner-Weir, M. Montminy, et C. Wright. 1998. « Regulatory factor linked to late-onset diabetes? » *Nature* 392 (6676) : 560. <https://doi.org/10.1038/33311>.

Dutzmann, J., A. Koch, S. Weisheit, K. Sonnenschein, L. Korte, M. Haertle, T. Thum, J. Bauersachs, D. G. Sedding, et J. M. Daniel. 2017. « Sonic hedgehog-dependent activation of adventitial fibroblasts promotes neointima formation ». *Cardiovasc Res* 113 (13) : 1653-63. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvx158> 4083273 [pii].

Dyer, M. A., S. M. Farrington, D. Mohn, J. R. Munday, et M. H. Baron. 2001. « Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo ». *Development* 128 (10) : 1717-30.

Edwards, James L., Andrea M. Vincent, Hsinlin T. Cheng, et Eva L. Feldman. 2008. « Diabetic neuropathy: mechanisms to management ». *Pharmacology & Therapeutics* 120 (1) : 1-34. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2008.05.005>.

« Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group ». 1998. *Lancet (London, England)* 352 (9131) : 854-65.

Engelke C. s. d. « Distal venous arterialization for lower limb salvage: angiographic appearances and interventional procedures. - PubMed - NCBI ». Consulté le 31 octobre 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553829>.

Faber James E., Zhang Hua, Lassance-Soares Roberta M., Prabhakar Pranay, Najafi Amir H., Burnett Mary Susan, et Epstein Stephen E. 2011. « Aging Causes Collateral Rarefaction and Increased Severity of Ischemic Injury in Multiple Tissues ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (8) : 1748-56. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.111.227314>.

Fang, Shentong, et Petri Salven. 2011. « Stem cells in tumor angiogenesis ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 50 (2) : 290-95. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.10.024>.

Farahani, Ramin M., Babak Sarrafpour, Mary Simonian, Qing Li, et Neil Hunter. 2012. « Directed glia-assisted angiogenesis in a mature neurosensory structure: pericytes mediate an adaptive response in human dental pulp that maintains blood-barrier function ». *The Journal of Comparative Neurology* 520 (17) : 3803-26. <https://doi.org/10.1002/cne.23162>.

Farber, Alik, et Robert T. Eberhardt. 2016. « The Current State of Critical Limb Ischemia: A Systematic Review ». *JAMA surgery* 151 (11) : 1070-77. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2016.2018>.

Farzan, Shohreh F., Samer Singh, Neal S. Schilling, et David J. Robbins. 2008. « Hedgehog Processing and Biological Activity ». *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology* 294 (4) : G844-49. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00564.2007>.

Ferrara, N., et K. Alitalo. 1999. « Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors ». *Nature Medicine* 5 (12) : 1359-64. <https://doi.org/10.1038/70928>.

Findley, Clarence M., Robert G. Mitchell, Brian D. Duscha, Brian H. Annex, et Christopher D. Kontos. 2008. « Plasma levels of soluble Tie2 and vascular endothelial growth factor distinguish critical limb ischemia from intermittent claudication in patients with peripheral arterial disease ». *Journal of the American College of Cardiology* 52 (5) : 387-93. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.02.045>.

Fitzpatrick, E., X. Han, W. Liu, E. Corcoran, D. Burtenshaw, D. Morrow, J. C. Helt, P. A. Cahill, et E. M. Redmond. 2017. « Alcohol Reduces Arterial Remodeling by Inhibiting Sonic Hedgehog-Stimulated Stem Cell Antigen-1 Positive Progenitor Stem Cell Expansion ». *Alcohol Clin Exp Res* 41 (12) : 2051-65. <https://doi.org/10.1111/acer.13499>.

Fong, Lai Yen, Chin Theng Ng, Zhi Li Cheok, Mohamad Aris Mohd Moklas, Muhammad Nazrul Hakim, et Zuraini Ahmad. 2016. « Barrier protective effect of asiatic acid in TNF- α -induced activation of human aortic endothelial cells ». *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 23 (2) : 191-99. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.11.019>.

Fontaine, Coralie, Wendy Cousin, Magali Plaisant, Christian Dani, et Pascal Peraldi. 2008. « Hedgehog signaling alters adipocyte maturation of human mesenchymal stem cells ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 26 (4) : 1037-46. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0974>.

Fowkes, F. Gerald R., Diana Rudan, Igor Rudan, Victor Aboyans, Julie O. Denenberg, Mary M.

- McDermott, Paul E. Norman, et al. 2013. « Comparison of global estimates of prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2000 and 2010: a systematic review and analysis ». *Lancet (London, England)* 382 (9901) : 1329-40. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61249-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61249-0).
- Frank-Kamenetsky, Maria, Xiaoyan M. Zhang, Steve Bottega, Oivin Guicherit, Hynek Wichterle, Henryk Dudek, David Bumcrot, et al. 2002. « Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothed agonists and antagonists ». *Journal of Biology* 1 (2) : 10. <https://doi.org/10.1186/1475-4924-1-10>.
- Frontini, Matthew J., Zengxuan Nong, Robert Gros, Maria Drangova, Caroline O'Neil, Mona N. Rahman, Oula Akawi, Hao Yin, Christopher G. Ellis, et J. Geoffrey Pickering. 2011. « Fibroblast growth factor 9 delivery during angiogenesis produces durable, vasoresponsive microvessels wrapped by smooth muscle cells ». *Nature Biotechnology* 29 (5) : 421-27. <https://doi.org/10.1038/nbt.1845>.
- Fujita, Kyoko, Takeshi Miyamoto, et Shizuya Saika. 2009. « Sonic hedgehog: its expression in a healing cornea and its role in neovascularization ». *Molecular Vision* 15 (mai) : 1036-44.
- Fung, Erik, et Armin Helisch. 2012. « Macrophages in collateral arteriogenesis ». *Frontiers in Physiology* 3 : 353. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00353>.
- Furchgott, R. F., et J. V. Zawadzki. 1980a. « The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine ». *Nature* 288 (5789) : 373-76. <https://doi.org/10.1038/288373a0>.
- . 1980b. « The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine ». *Nature* 288 (5789) : 373-76.
- Gaengel Konstantin, Genové Guillem, Armulik Annika, et Betsholtz Christer. 2009. « Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (5) : 630-38. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.161521>.
- Gale, N. W., et G. D. Yancopoulos. 1999. « Growth factors acting via endothelial cell-specific receptor tyrosine kinases: VEGFs, angiopoietins, and ephrins in vascular development ». *Genes & Development* 13 (9) : 1055-66. <https://doi.org/10.1101/gad.13.9.1055>.
- Geng, L., K. C. Cuneo, M. K. Cooper, H. Wang, K. Sekhar, A. Fu, et D. E. Hallahan. 2007. « Hedgehog signaling in the murine melanoma microenvironment ». *Angiogenesis* 10 (4) : 259-67. <https://doi.org/10.1007/s10456-007-9078-9>.
- Geudens, Ilse, et Holger Gerhardt. 2011. « Coordinating cell behaviour during blood vessel formation ». *Development (Cambridge, England)* 138 (21) : 4569-83. <https://doi.org/10.1242/dev.062323>.
- Gibbons, Gary W., et Palma M. Shaw. 2012. « Diabetic vascular disease: characteristics of vascular disease unique to the diabetic patient ». *Seminars in Vascular Surgery* 25 (2) : 89-92. <https://doi.org/10.1053/j.semvascsurg.2012.04.005>.
- Gkaliagkousi, Eugenia, et Albert Ferro. 2011. « Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function ». *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 16 : 1873-97.
- Gonzalez-Quesada, Carlos, Michele Cavalera, Anna Biernacka, Ping Kong, Dong-Wook Lee, Amit Saxena, Olga Frunza, Marcin Dobaczewski, Arti Shinde, et Nikolaos G. Frangogiannis. 2013. « Thrombospondin-1 induction in the diabetic myocardium stabilizes the cardiac matrix in addition to promoting vascular rarefaction through angiopoietin-2 upregulation ». *Circulation Research* 113 (12) : 1331-44. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302593>.
- Gorojankina, Tatiana, Lucile Hoch, Hélène Faure, Hermine Roudaut, Elisabeth Traiffort, Angèle Schoenfelder, Nicolas Girard, et al. 2013. « Discovery, molecular and pharmacological characterization of GSA-10, a novel small-molecule positive modulator of Smoothed ». *Molecular*

Pharmacology 83 (5) : 1020-29. <https://doi.org/10.1124/mol.112.084590>.

Gotsman, Israel, et Andrew H. Lichtman. 2007. « Targeting interferon-gamma to treat atherosclerosis ». *Circulation Research* 101 (4) : 333-34. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.155838>.

Greenblatt, David Yu, Victoria Rajamanickam, et Matthew W. Mell. 2011. « Predictors of surgical site infection after open lower extremity revascularization ». *Journal of Vascular Surgery* 54 (2) : 433-39. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.01.034>.

Grounds, M. D. 1999. « Muscle regeneration: molecular aspects and therapeutic implications ». *Current Opinion in Neurology* 12 (5) : 535-43. <https://doi.org/10.1097/00019052-199910000-00007>.

Guo, D. Q., L. W. Wu, J. D. Dunbar, O. N. Ozes, L. D. Mayo, K. M. Kessler, J. A. Gustin, et al. 2000. « Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation ». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (15) : 11216-21.

Gupta, Rajesh, Alexander R. Mackie, Sol Misener, Lijun Liu, Douglas W. Losordo, et Raj Kishore. 2018a. « Endothelial smoothed-dependent hedgehog signaling is not required for sonic hedgehog induced angiogenesis or ischemic tissue repair ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 98 (5) : 682-91. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0028-5>.

———. 2018b. « Endothelial smoothed-dependent hedgehog signaling is not required for sonic hedgehog induced angiogenesis or ischemic tissue repair ». *Laboratory Investigation* 98 (5) : 682-91. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0028-5>.

Hadden, M. Kyle. 2014. « Hedgehog pathway agonism: therapeutic potential and small-molecule development ». *ChemMedChem* 9 (1) : 27-37. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300358>.

Hallikas, Outi, Kimmo Palin, Natalia Sinjushina, Reetta Rautiainen, Juha Partanen, Esko Ukkonen, et Jussi Taipale. 2006. « Genome-wide prediction of mammalian enhancers based on analysis of transcription-factor binding affinity ». *Cell* 124 (1) : 47-59. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.042>.

Hameyer, Dorothe, Ate Loonstra, Leonid Eshkind, Steffen Schmitt, Cecilia Antunes, Annemiek Groen, Eric Bindels, et al. 2007. « Toxicity of ligand-dependent Cre recombinases and generation of a conditional Cre deleter mouse allowing mosaic recombination in peripheral tissues ». *Physiological Genomics* 31 (1) : 32-41. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00019.2007>.

Hammond, Katherine L., et Tanya T. Whitfield. 2009. « Expression of zebrafish hip: response to Hedgehog signalling, comparison with ptc1 expression, and possible role in otic patterning ». *Gene expression patterns: GEP* 9 (6) : 391-96. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2009.06.006>.

Hankey, Graeme J., Paul E. Norman, et John W. Eikelboom. 2006. « Medical treatment of peripheral arterial disease ». *JAMA* 295 (5) : 547-53. <https://doi.org/10.1001/jama.295.5.547>.

Hanna, Ann, et Lalita A. Shevde. 2016. « Hedgehog signaling: modulation of cancer properties and tumor microenvironment ». *Molecular Cancer* 15 : 24. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0509-3>.

Harris, L. G., L. K. Pannell, S. Singh, R. S. Samant, et L. A. Shevde. 2012. « Increased vascularity and spontaneous metastasis of breast cancer by hedgehog signaling mediated upregulation of cyr61 ». *Oncogene* 31 (28) : 3370-80. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.496> onc2011496 [pii].

Hartemann, Agnès, et André Grimaldi. 2019. *Guide pratique du diabète*. Elsevier Masson. MediGuides. <https://www.elsevier-masson.fr/guide-pratique-du-diabete-9782294764219.html>.

Hasan, Rim, Belal Firwana, Tarig Elraiyah, Juan Pablo Domecq, Gabriela Prutsky, Mohammed Nabhan, Larry J. Prokop, et al. 2016. « A systematic review and meta-analysis of glycemic control for the

prevention of diabetic foot syndrome ». *Journal of Vascular Surgery* 63 (2 Suppl) : 22S-28S.e1-2. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2015.10.005>.

Hazarika, Surovi, Ayotunde O. Dokun, Yongjun Li, Aleksander S. Popel, Christopher D. Kontos, et Brian H. Annex. 2007. « Impaired angiogenesis after hindlimb ischemia in type 2 diabetes mellitus: differential regulation of vascular endothelial growth factor receptor 1 and soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 ». *Circulation Research* 101 (9) : 948-56. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.107.160630>.

He, Hua, Hong Zhang, Bin Li, Guigang Li, et Zhitao Wang. 2010. « Blockade of the sonic hedgehog signalling pathway inhibits choroidal neovascularization in a laser-induced rat model ». *Journal of Huazhong University of Science and Technology. Medical Sciences = Hua Zhong Ke Ji Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ying De Wen Ban = Huazhong Keji Daxue Xuebao. Yixue Yingdewen Ban* 30 (5) : 659-65. <https://doi.org/10.1007/s11596-010-0560-z>.

He, Quan-Wei, Yuan-Peng Xia, Sheng-Cai Chen, Yong Wang, Ming Huang, Yan Huang, Jian-Yong Li, et al. 2013a. « Astrocyte-derived sonic hedgehog contributes to angiogenesis in brain microvascular endothelial cells via RhoA/ROCK pathway after oxygen-glucose deprivation ». *Molecular Neurobiology* 47 (3) : 976-87. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8396-8>.

———. 2013b. « Astrocyte-derived sonic hedgehog contributes to angiogenesis in brain microvascular endothelial cells via RhoA/ROCK pathway after oxygen-glucose deprivation ». *Molecular Neurobiology* 47 (3) : 976-87. <https://doi.org/10.1007/s12035-013-8396-8>.

Hebrok, M., S. K. Kim, B. St Jacques, A. P. McMahon, et D. A. Melton. 2000. « Regulation of pancreas development by hedgehog signaling ». *Development (Cambridge, England)* 127 (22) : 4905-13.

Helisch, Armin, Shawn Wagner, Nadeem Khan, Mary Drinane, Swen Wolfram, Matthias Heil, Tibor Ziegelhoeffer, et al. 2006. « Impact of mouse strain differences in innate hindlimb collateral vasculature ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (3) : 520-26. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000202677.55012.a0>.

Hellingman, A. A., A. J. N. M. Bastiaansen, M. R. de Vries, L. Seghers, M. A. Lijkwan, C. W. Löwik, J. F. Hamming, et P. H. A. Quax. 2010. « Variations in surgical procedures for hind limb ischaemia mouse models result in differences in collateral formation ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 40 (6) : 796-803. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2010.07.009>.

Hellström, Mats, Li-Kun Phng, Jennifer J. Hofmann, Elisabet Wallgard, Leigh Coultas, Per Lindblom, Jackelyn Alva, et al. 2007. « Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis ». *Nature* 445 (7129) : 776-80. <https://doi.org/10.1038/nature05571>.

Herder, C., T. Illig, W. Rathmann, S. Martin, B. Haastert, S. Müller-Scholze, R. Holle, et al. 2005. « Inflammation and type 2 diabetes: results from KORA Augsburg ». *Gesundheitswesen (Bundesverband Der Ärzte Des Öffentlichen Gesundheitsdienstes (Germany))* 67 Suppl 1 (août) : S115-121. <https://doi.org/10.1055/s-2005-858252>.

Herring, B. P., A. M. Hoggatt, S. L. Griffith, J. N. McClintick, et P. J. Gallagher. 2017. « Inflammation and vascular smooth muscle cell dedifferentiation following carotid artery ligation ». *Physiol Genomics* 49 (3) : 115-26. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00095.2016> [pii].

Hertzer, N. R., E. G. Beven, J. R. Young, P. J. O'Hara, W. F. Ruschhaupt, R. A. Graor, V. G. Dewolfe, et L. C. Maljovec. 1984. « Coronary artery disease in peripheral vascular patients. A classification of 1000 coronary angiograms and results of surgical management ». *Annals of Surgery* 199 (2) : 223-33. <https://doi.org/10.1097/0000658-198402000-00016>.

Hirsch, Alan T., Ziv J. Haskal, Norman R. Hertzer, Curtis W. Bakal, Mark A. Creager, Jonathan L. Halperin, Loren F. Hiratzka, et al. 2006. « ACC/AHA 2005 guidelines for the management of patients

with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic): executive summary a collaborative report from the American Association for Vascular Surgery/Society for Vascular Surgery, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, Society for Vascular Medicine and Biology, Society of Interventional Radiology, and the ACC/AHA Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease) endorsed by the American Association of Cardiovascular and Pulmonary Rehabilitation; National Heart, Lung, and Blood Institute; Society for Vascular Nursing; TransAtlantic Inter-Society Consensus; and Vascular Disease Foundation ». *Journal of the American College of Cardiology* 47 (6) : 1239-1312. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2005.10.009>.

Ho, T. K., V. Rajkumar, C. M. Black, D. J. Abraham, et D. M. Baker. 2006. « Increased angiogenic response but deficient arteriolization and abnormal microvessel ultrastructure in critical leg ischaemia ». *The British Journal of Surgery* 93 (11) : 1368-76. <https://doi.org/10.1002/bjs.5496>.

Hoch, Renée V., et Philippe Soriano. 2003. « Roles of PDGF in animal development ». *Development (Cambridge, England)* 130 (20) : 4769-84. <https://doi.org/10.1242/dev.00721>.

Hochman, Eldar, Asher Castiel, Jasmine Jacob-Hirsch, Ninnette Amariglio, et Shai Izraeli. 2006a. « Molecular pathways regulating pro-migratory effects of Hedgehog signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (45) : 33860-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605905200>.

———. 2006b. « Molecular pathways regulating pro-migratory effects of Hedgehog signaling ». *The Journal of Biological Chemistry* 281 (45) : 33860-70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M605905200>.

Holman, Rury R., Sanjoy K. Paul, M. Angelyn Bethel, David R. Matthews, et H. Andrew W. Neil. 2008. « 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes ». *The New England Journal of Medicine* 359 (15) : 1577-89. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0806470>.

Howard, Dominic P. J., Amitava Banerjee, Jack F. Fairhead, Linda Hands, Louise E. Silver, Peter M. Rothwell, et Oxford Vascular Study. 2015. « Population-Based Study of Incidence, Risk Factors, Outcome, and Prognosis of Ischemic Peripheral Arterial Events: Implications for Prevention ». *Circulation* 132 (19) : 1805-15. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.016424>.

Huaitong, X., F. Yuanyong, T. Yueqin, Z. Peng, S. Wei, et S. Kai. 2017. « Microvesicles releasing by oral cancer cells enhance endothelial cell angiogenesis via Shh/RhoA signaling pathway ». *Cancer Biol Ther* 18 (10) : 783-91. <https://doi.org/10.1080/15384047.2017.1373213>.

Huang, Hu, Jianbo He, Da'Kuawn Johnson, Yanhong Wei, Ying Liu, Shuang Wang, Gerard A. Luty, Elia J. Duh, et Richard D. Semba. 2015. « Deletion of placental growth factor prevents diabetic retinopathy and is associated with Akt activation and HIF1 α -VEGF pathway inhibition ». *Diabetes* 64 (1) : 200-212. <https://doi.org/10.2337/db14-0016>.

Huangfu, Danwei, et Kathryn V. Anderson. 2006. « Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates ». *Development (Cambridge, England)* 133 (1) : 3-14. <https://doi.org/10.1242/dev.02169>.

Hui, Chi-Chung, et Stephane Angers. 2011. « Gli proteins in development and disease ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 27 : 513-37. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154048>.

Hui, Mun, Aurélie Cazet, Radhika Nair, D. Neil Watkins, Sandra A. O'Toole, et Alexander Swarbrick. 2013. « The Hedgehog signalling pathway in breast development, carcinogenesis and cancer therapy ». *Breast cancer research: BCR* 15 (2) : 203. <https://doi.org/10.1186/bcr3401>.

Hummel, K. P., D. L. Coleman, et P. W. Lane. 1972. « The influence of genetic background on expression of mutations at the diabetes locus in the mouse. I. C57BL-KsJ and C57BL-6J strains ». *Biochemical Genetics* 7 (1) : 1-13. <https://doi.org/10.1007/BF00487005>.

Iafraiti, Mark D., John W. Hallett, George Geils, Gregory Pearl, Alan Lumsden, Eric Peden, Dennis

Bandyk, et al. 2011. « Early results and lessons learned from a multicenter, randomized, double-blind trial of bone marrow aspirate concentrate in critical limb ischemia ». *Journal of Vascular Surgery* 54 (6) : 1650-58. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.06.118>.

Iafrati, Mark D., Thomas F. O'Donnell, Bruce Perler, Karl A. Illig, John Hallett, Karen Woo, Greg Pearl, et Karl R. Stark. 2016. « SS03. Bone Marrow Aspirate Concentrate in Critical Limb Ischemia: Results of an Abridged Prospective Randomized Pivotal Trial in No Option CLI ». *Journal of Vascular Surgery, Abstracts of the 2016 Vascular Annual Meeting*, 63 (6, Supplement) : 47S. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.03.016>.

Ilan, N., S. Mahooti, D. L. Rimm, et J. A. Madri. 1999. « PECAM-1 (CD31) functions as a reservoir for and a modulator of tyrosine-phosphorylated beta-catenin ». *Journal of Cell Science* 112 Pt 18 (septembre) : 3005-14.

Incardona, J. P., W. Gaffield, R. P. Kapur, et H. Roelink. 1998. « The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction ». *Development (Cambridge, England)* 125 (18) : 3553-62.

« Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group ». 1998. *Lancet (London, England)* 352 (9131) : 837-53.

international diabetes federation. 2013. « IDF DIABETES ATLAS Sixth edition ». http://www.idf.org/sites/default/files/EN_6E_Atlas_Full_0.pdf.

Inzucchi, Silvio E., Bernard Zinman, David Fitchett, Christoph Wanner, Ele Ferrannini, Martin Schumacher, Claudia Schmoor, et al. 2018. « How Does Empagliflozin Reduce Cardiovascular Mortality? Insights From a Mediation Analysis of the EMPA-REG OUTCOME Trial ». *Diabetes Care* 41 (2) : 356-63. <https://doi.org/10.2337/dc17-1096>.

Iruela-Arispe, M. Luisa, et George E. Davis. 2009. « Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation ». *Developmental Cell* 16 (2) : 222-31. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.01.013>.

Isner, J. M., A. Pieczek, R. Schainfeld, R. Blair, L. Haley, T. Asahara, K. Rosenfield, S. Razvi, K. Walsh, et J. F. Symes. 1996. « Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb ». *Lancet (London, England)* 348 (9024) : 370-74.

Jaff, Michael R., Christopher J. White, William R. Hiatt, Gerry R. Fowkes, John Dormandy, Mahmood Razavi, Jim Reekers, et Lars Norgren. 2015. « An update on methods for revascularization and expansion of the TASC lesion classification to include below-the-knee arteries: A supplement to the inter-society consensus for the management of peripheral arterial disease (TASC II): The TASC steering committee ». *Catheterization and Cardiovascular Interventions: Official Journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* 86 (4) : 611-25. <https://doi.org/10.1002/ccd.26122>.

Jankowski, R. J., B. M. Deasy, et J. Huard. 2002. « Muscle-derived stem cells ». *Gene Therapy* 9 (10) : 642-47. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301719>.

Jia, Wenqing, Rong Wang, Jizong Zhao, Isabelle Yisha Liu, Dong Zhang, Xuejiang Wang, et Xiaodi Han. 2011. « E-selectin expression increased in human ruptured cerebral aneurysm tissues ». *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 38 (6) : 858-62. <https://doi.org/10.1017/s0317167100012439>.

Jiang, Xiu-Long, Ting Chen, et Xu Zhang. 2015. « Activation of sonic hedgehog signaling attenuates oxidized low-density lipoprotein-stimulated brain microvascular endothelial cells dysfunction in vitro ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8 (10) : 12820-28.

Jimeno, Antonio, Glen J. Weiss, Wilson H. Miller, Scott Gettinger, Bernard J. C. Eigel, Anne Lynne S. Chang, Joi Dunbar, et al. 2013. « Phase I study of the Hedgehog pathway inhibitor IPI-926 in adult

patients with solid tumors ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (10) : 2766-74. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3654>.

Jin, Richard C., Barbara Voetsch, et Joseph Loscalzo. 2005. « Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function ». *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 12 (3) : 247-58. <https://doi.org/10.1080/10739680590925493>.

Jin, Yongming, Austin Barnett, Yifan Zhang, Xin Yu, et Yu Luo. 2017. « Poststroke Sonic Hedgehog Agonist Treatment Improves Functional Recovery by Enhancing Neurogenesis and Angiogenesis ». *Stroke* 48 (6) : 1636-45. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.016650>.

Johnstone, M. T., S. J. Creager, K. M. Scales, J. A. Cusco, B. K. Lee, et M. A. Creager. 1993. « Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus ». *Circulation* 88 (6) : 2510-16.

Kanda, S., Y. Mochizuki, T. Suematsu, Y. Miyata, K. Nomata, et H. Kanetake. 2003. « Sonic hedgehog induces capillary morphogenesis by endothelial cells through phosphoinositide 3-kinase ». *J Biol Chem* 278 (10) : 8244-49.

Kaneto, Hideaki, Naoto Katakami, Munehide Matsuhisa, et Taka-aki Matsuoka. 2010. « Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis ». *Mediators of Inflammation* 2010 : 453892. <https://doi.org/10.1155/2010/453892>.

Kang, Jeanwan L., Virendra I. Patel, Mark F. Conrad, Glenn M. Lamuraglia, Thomas K. Chung, et Richard P. Cambria. 2008. « Common femoral artery occlusive disease: contemporary results following surgical endarterectomy ». *Journal of Vascular Surgery* 48 (4) : 872-77. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2008.05.025>.

Kasper, Maria, Harald Schnidar, Graham W. Neill, Michaela Hanneder, Stefan Klingler, Leander Blaas, Carmen Schmid, et al. 2006. « Selective modulation of Hedgehog/GLI target gene expression by epidermal growth factor signaling in human keratinocytes ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (16) : 6283-98. <https://doi.org/10.1128/MCB.02317-05>.

Kasprzak, Jarosław D., Magdalena Kłosińska, et Jarosław Drozd. 2006. « Clinical aspects of assessment of endothelial function ». *Pharmacological reports: PR* 58 Suppl : 33-40.

Katagiri, Seiichiro, Tetsuzo Tauchi, Seiichi Okabe, Yosuke Minami, Shinya Kimura, Taira Maekawa, Tomoki Naoe, et Kazuma Ohyashiki. 2013. « Combination of ponatinib with Hedgehog antagonist vismodegib for therapy-resistant BCR-ABL1-positive leukemia ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 19 (6) : 1422-32. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1777>.

Katoh, Yuriko, et Masaru Katoh. 2005. « Hedgehog signaling pathway and gastric cancer ». *Cancer Biology & Therapy* 4 (10) : 1050-54. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.10.2184>.

Kawahira, Hiroshi, Nancy H. Ma, Emmanouil S. Tzanakakis, Andrew P. McMahon, Pao-Tien Chuang, et Matthias Hebrok. 2003. « Combined activities of hedgehog signaling inhibitors regulate pancreas development ». *Development (Cambridge, England)* 130 (20) : 4871-79. <https://doi.org/10.1242/dev.00653>.

Kawahira, Hiroshi, David W. Scheel, Stuart B. Smith, Michael S. German, et Matthias Hebrok. 2005. « Hedgehog signaling regulates expansion of pancreatic epithelial cells ». *Developmental Biology* 280 (1) : 111-21. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.008>.

Kaye, Stanley B., Louis Fehrenbacher, Robert Holloway, Amnon Amit, Beth Karlan, Brian Slomovitz, Paul Sabbatini, et al. 2012. « A phase II, randomized, placebo-controlled study of vismodegib as maintenance therapy in patients with ovarian cancer in second or third complete remission ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (23) : 6509-18. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-1796>.

Keeler, R. F., et W. Binns. 1968. « Teratogenic compounds of *Veratrum californicum* (Durand). V. Comparison of cyclopien effects of steroidal alkaloids from the plant and structurally related compounds from other sources ». *Teratology* 1 (1) : 5-10. <https://doi.org/10.1002/tera.1420010103>.

Kilani, Badr, Virginie Gourdou-Latyszenok, Alexandre Guy, Marie-Lise Bats, Claire Peghaire, Marie Parrens, Marie-Ange Renault, et al. 2019. « Comparison of endothelial promoter efficiency and specificity in mice reveals a subset of Pdgfb-positive hematopoietic cells ». *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 17 (5) : 827-40. <https://doi.org/10.1111/jth.14417>.

Kivelä, Riikka, Mika Silvennoinen, Maarit Lehti, Sanni Jalava, Veikko Vihko, et Heikki Kainulainen. 2008. « Exercise-induced expression of angiogenic growth factors in skeletal muscle and in capillaries of healthy and diabetic mice ». *Cardiovascular Diabetology* 7 : 13. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-7-13>.

Koch, A. E., M. M. Halloran, C. J. Haskell, M. R. Shah, et P. J. Polverini. 1995. « Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 ». *Nature* 376 (6540) : 517-19. <https://doi.org/10.1038/376517a0>.

Kogerman, P., T. Grimm, L. Kogerman, D. Krause, A. B. Undén, B. Sandstedt, R. Toftgård, et P. G. Zaphiropoulos. 1999. « Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1 ». *Nature Cell Biology* 1 (5) : 312-19. <https://doi.org/10.1038/13031>.

Koike, J., N. Sagara, H. Kirikoshi, A. Takagi, T. Miwa, M. Hirai, et M. Katoh. 2000. « Molecular cloning and genomic structure of the betaTRCP2 gene on chromosome 5q35.1 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 269 (1) : 103-9. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2241>.

Kolesova, H., H. Roelink, et M. Grim. 2008. « Sonic hedgehog is required for the assembly and remodeling of branchial arch blood vessels ». *Dev Dyn* 237 (7) : 1923-34. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21608>.

Kolesová, Hana, Henk Roelink, et Milos Grim. 2008. « Sonic hedgehog is required for the assembly and remodeling of branchial arch blood vessels ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237 (7) : 1923-34. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21608>.

Koutakis, Panagiotis, Dimitrios Miserlis, Sara A. Myers, Julian Kyung-Soo Kim, Zhen Zhu, Evlampia Papoutsis, Stanley A. Swanson, et al. 2015. « Abnormal accumulation of desmin in gastrocnemius myofibers of patients with peripheral artery disease: associations with altered myofiber morphology and density, mitochondrial dysfunction and impaired limb function ». *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society* 63 (4) : 256-69. <https://doi.org/10.1369/0022155415569348>.

Koutakis, Panagiotis, Sara A. Myers, Kim Cluff, Duy M. Ha, Gleb Haynatzki, Rodney D. McComb, Koji Uchida, et al. 2015. « Abnormal myofiber morphology and limb dysfunction in claudication ». *Journal of Surgical Research* 196 (1) : 172-79. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.02.011>.

Kum, Steven, Yih Kai Tan, Michiel A. Schreve, Roberto Ferraresi, Ramon L. Varcoe, Andrej Schmidt, Dierk Scheinert, et al. 2017. « Midterm Outcomes From a Pilot Study of Percutaneous Deep Vein Arterialization for the Treatment of No-Option Critical Limb Ischemia ». *Journal of Endovascular Therapy* 24 (5) : 619-26. <https://doi.org/10.1177/1526602817719283>.

Kunjathoor, V. V., D. L. Wilson, et R. C. LeBoeuf. 1996. « Increased atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 97 (7) : 1767-73. <https://doi.org/10.1172/JCI118604>.

Kuroda, H., N. Kurio, T. Shimo, K. Matsumoto, M. Masui, K. Takabatake, T. Okui, et al. 2017. « Oral Squamous Cell Carcinoma-derived Sonic Hedgehog Promotes Angiogenesis ». *Anticancer Res* 37 (12) : 6731-37. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.12132>.

Kusano, K. F., K. L. Allendoerfer, W. Munger, R. Pola, M. Bosch-Marce, R. Kirchmair, Y. S. Yoon, et

- al. 2004. « Sonic hedgehog induces arteriogenesis in diabetic vasa nervorum and restores function in diabetic neuropathy ». *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (11) : 2102-7.
- Kusano, K. F., R. Pola, T. Murayama, C. Curry, A. Kawamoto, A. Iwakura, S. Shintani, et al. 2005. « Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling ». *Nat Med* 11 (11) : 1197-1204.
- Kusano, Kengo F., Karen L. Allendoerfer, William Munger, Roberto Pola, Marta Bosch-Marce, Rudolf Kirchmair, Young-sup Yoon, et al. 2004. « Sonic hedgehog induces arteriogenesis in diabetic vasa nervorum and restores function in diabetic neuropathy ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24 (11) : 2102-7. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000144813.44650.75>.
- Kusano, Kengo F., Roberto Pola, Toshinori Murayama, Cynthia Curry, Atsuhiko Kawamoto, Atsushi Iwakura, Satoshi Shintani, et al. 2005. « Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling ». *Nature Medicine* 11 (11) : 1197-1204. <https://doi.org/10.1038/nm1313>.
- Lambert, M. A., et J. J. F. Belch. 2013. « Medical management of critical limb ischaemia: where do we stand today? » *Journal of Internal Medicine* 274 (4) : 295-307. <https://doi.org/10.1111/joim.12102>.
- Lamont, R. E., W. Vu, A. D. Carter, F. C. Serluca, C. A. MacRae, et S. J. Childs. 2010. « Hedgehog signaling via angiotensin II is required for developmental vascular stability ». *Mech Dev* 127 (3-4) : 159-68.
- Lancaster, R. T., M. F. Conrad, V. I. Patel, R. P. Cambria, et G. M. LaMuraglia. 2012. « Predictors of early graft failure after infrainguinal bypass surgery: a risk-adjusted analysis from the NSQIP ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 43 (5) : 549-55. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2012.01.026>.
- Lau, J., H. Kawahira, et M. Hebrok. 2006. « Hedgehog signaling in pancreas development and disease ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 63 (6) : 642-52. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5357-z>.
- Lauth, Matthias, Asa Bergström, Takashi Shimokawa, et Rune Toftgård. 2007. « Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (20) : 8455-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609699104>.
- Lavine, K. J., A. Kovacs, et D. M. Ornitz. 2008. « Hedgehog signaling is critical for maintenance of the adult coronary vasculature in mice ». *J Clin Invest* 118 (7) : 2404-14.
- Lavine, K. J., F. Long, K. Choi, C. Smith, et D. M. Ornitz. 2008. « Hedgehog signaling to distinct cell types differentially regulates coronary artery and vein development ». *Development* 135 (18) : 3161-71.
- Lavine, K. J., A. C. White, C. Park, C. S. Smith, K. Choi, F. Long, C. C. Hui, et D. M. Ornitz. 2006. « Fibroblast growth factor signals regulate a wave of Hedgehog activation that is essential for coronary vascular development ». *Genes Dev* 20 (12) : 1651-66.
- Lawson, N. D., A. M. Vogel, et B. M. Weinstein. 2002. « Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation ». *Dev Cell* 3 (1) : 127-36.
- Lawson, Nathan D., Andreas M. Vogel, et Brant M. Weinstein. 2002. « Sonic hedgehog and vascular endothelial growth factor act upstream of the Notch pathway during arterial endothelial differentiation ». *Developmental Cell* 3 (1) : 127-36.
- Lee, S. W., M. A. Moskowitz, et J. R. Sims. 2007. « Sonic hedgehog inversely regulates the expression

of angiotensin-1 and angiotensin-2 in fibroblasts ». *Int J Mol Med* 19 (3) : 445-51.

Lejay, A., P. Choquet, F. Thaveau, F. Singh, A. Schlagowski, A.-L. Charles, G. Laverny, et al. 2015. « A new murine model of sustainable and durable chronic critical limb ischemia fairly mimicking human pathology ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 49 (2) : 205-12. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2014.12.010>.

Ley, Klaus, Carlo Laudanna, Myron I. Cybulsky, et Sussan Nourshargh. 2007. « Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated ». *Nature Reviews Immunology* 7 (9) : 678-89. <https://doi.org/10.1038/nri2156>.

Li, F., M. Duman-Scheel, D. Yang, W. Du, J. Zhang, C. Zhao, L. Qin, et S. Xin. 2010. « Sonic hedgehog signaling induces vascular smooth muscle cell proliferation via induction of the G1 cyclin-retinoblastoma axis ». *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30 (9) : 1787-94. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.208520> 30/9/1787 [pii].

Li, H., J. Li, Y. Li, P. Singh, L. Cao, L. J. Xu, D. Li, et al. 2012. « Sonic hedgehog promotes autophagy of vascular smooth muscle cells ». *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303 (11) : H1319-31. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00160.2012> ajpheart.00160.2012 [pii].

Li, T., J. Zhang, R. Y. Liu, Z. G. Lian, X. L. Chen, L. Ma, H. M. Sun, et Y. L. Zhao. 2013. « The role of the sonic hedgehog signaling pathway in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats ». *Neurosci Lett* 552 (septembre) : 81-86. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.07.042> S0304-3940(13)00704-0 [pii].

Li, Yang, Yang Liu, Guangxi Wang, Yuxiang Wang, et Limei Guo. 2018. « Cooperation of Indian Hedgehog and Vascular Endothelial Growth Factor in Tumor Angiogenesis and Growth in Human Hepatocellular Carcinomas, an Immunohistochemical Study ». *Applied immunohistochemistry & molecular morphology: AIMM*, avril. <https://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000654>.

Liao, James K. 2013. « Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation ». *The Journal of Clinical Investigation* 123 (2) : 540-41. <https://doi.org/10.1172/JCI66843>.

Liao, X., M. K. Siu, C. W. Au, E. S. Wong, H. Y. Chan, P. P. Ip, H. Y. Ngan, et A. N. Cheung. 2009. « Aberrant activation of hedgehog signaling pathway in ovarian cancers: effect on prognosis, cell invasion and differentiation ». *Carcinogenesis* 30 (1) : 131-40. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn230> bgn230 [pii].

Lin, Yuh-Charn, Chun-Yu Liu, Reiji Kannagi, et Ruey-Bing Yang. 2018. « Inhibition of Endothelial SCUBE2 (Signal Peptide-CUB-EGF Domain-Containing Protein 2), a Novel VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) Coreceptor, Suppresses Tumor Angiogenesis ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 38 (5) : 1202-15. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.310506>.

Lin, Zhiyong, Viswanath Natesan, Hong Shi, Fei Dong, Daiji Kawanami, Ganapati H. Mahabeleshwar, G. Brandon Atkins, et al. 2010. « Kruppel-like factor 2 regulates endothelial barrier function ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30 (10) : 1952-59. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.211474>.

Lindahl, P., M. Hellström, M. Kalén, et C. Betsholtz. 1998. « Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice ». *Current Opinion in Lipidology* 9 (5) : 407-11.

Long, F., X. M. Zhang, S. Karp, Y. Yang, et A. P. McMahon. 2001. « Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation ». *Development (Cambridge, England)* 128 (24) : 5099-5108.

Lotfi, Shamim, Ashish S. Patel, Katherine Mattock, Stuart Egginton, Alberto Smith, et Bijan Modarai. 2013. « Towards a more relevant hind limb model of muscle ischaemia ». *Atherosclerosis* 227 (1) : 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.10.060>.

- Lou, Emil, Andrew C. Nelson, et Marcel Kool. 2019. « Differential response of SHH-expressing adult medulloblastomas to the sonic hedgehog inhibitor vismodegib: whole-genome analysis ». *Cancer Biology & Therapy* 20 (11) : 1398-1402. <https://doi.org/10.1080/15384047.2019.1647057>.
- Lu, X.W., M.M. Idu, D.T. Ubbink, et D.A. Legemate. 2006. « Meta-analysis of the Clinical Effectiveness of Venous Arterialization for Salvage of Critically Ischaemic Limbs ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 31 (5) : 493-99. <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2005.12.017>.
- Lum, H., et A. B. Malik. 1996. « Mechanisms of increased endothelial permeability ». *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 74 (7) : 787-800.
- Lundberg, Jon O., Mark T. Gladwin, et Eddie Weitzberg. 2015. « Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease ». *Nature Reviews Drug Discovery* 14 (9) : 623-41. <https://doi.org/10.1038/nrd4623>.
- Mabilleau, G., N. L. Petrova, M. E. Edmonds, et A. Sabokbar. 2008. « Increased osteoclastic activity in acute Charcot's osteoarthropathy: the role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ». *Diabetologia* 51 (6) : 1035-40. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-0992-1>.
- Maisonpierre, P. C., C. Suri, P. F. Jones, S. Bartunkova, S. J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, et al. 1997. « Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 277 (5322) : 55-60. <https://doi.org/10.1126/science.277.5322.55>.
- Makanya, Andrew N., Ruslan Hlushchuk, et Valentin G. Djonov. 2009. « Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling ». *Angiogenesis* 12 (2) : 113-23. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9129-5>.
- Marigo, V., D. J. Roberts, S. M. Lee, O. Tsukurov, T. Levi, J. M. Gastier, D. J. Epstein, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, et C. E. Seidman. 1995. « Cloning, expression, and chromosomal location of SHH and IHH: two human homologues of the Drosophila segment polarity gene hedgehog ». *Genomics* 28 (1) : 44-51. <https://doi.org/10.1006/geno.1995.1104>.
- Marrachelli, Vannina González, Maria Letizia Mastronardi, Mamadou Sarr, Raffaella Soleti, Daniela Leonetti, María Carmen Martínez, et Ramarosan Andriantsitohaina. 2013. « Sonic hedgehog carried by microparticles corrects angiotensin II-induced hypertension and endothelial dysfunction in mice ». *PLoS One* 8 (8) : e72861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072861>.
- Marso, Steven P., Stephen C. Bain, Agostino Consoli, Freddy G. Eliaschewitz, Esteban Jódar, Lawrence A. Leiter, Ildiko Lingvay, et al. 2016. « Semaglutide and Cardiovascular Outcomes in Patients with Type 2 Diabetes ». *The New England Journal of Medicine* 375 (19) : 1834-44. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1607141>.
- Martinelli, David C., et Chen-Ming Fan. 2007. « The role of Gas1 in embryonic development and its implications for human disease ». *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 6 (21) : 2650-55. <https://doi.org/10.4161/cc.6.21.4877>.
- Martini, Romeo, Giuseppe Maria Androzzzi, Alessandra Deri, Rosamaria Cordova, Paolo Zulian, Ornella Scarpazza, et Fabiana Nalin. 2012. « Amputation rate and mortality in elderly patients with critical limb ischemia not suitable for revascularization ». *Aging Clinical and Experimental Research* 24 (3 Suppl) : 24-27.
- Mary, Aurélien, Agnes Hartemann, Sophie Liabeuf, Carole Elodie Aubert, Salim Kemel, Joe Elie Salem, Philippe Cluzel, et al. 2017. « Association between metformin use and below-the-knee arterial calcification score in type 2 diabetic patients ». *Cardiovascular Diabetology* 16 (1) : 24. <https://doi.org/10.1186/s12933-017-0509-7>.
- Matter, Karl, et Maria S. Balda. 2003. « Signalling to and from tight junctions ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 4 (3) : 225-36. <https://doi.org/10.1038/nrm1055>.

Maxwell, Patrick H., et Peter J. Ratcliffe. 2002. « Oxygen sensors and angiogenesis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 13 (1) : 29-37. <https://doi.org/10.1006/scdb.2001.0287>.

McClung, Joseph M., Timothy J. McCord, Kevin Southerland, Cameron A. Schmidt, Michael E. Padgett, Terence E. Ryan, et Christopher D. Kontos. 2016. « Subacute Limb Ischemia Induces Skeletal Muscle Injury in Genetically Susceptible Mice Independent of Vascular Density ». *Journal of vascular surgery* 64 (4) : 1101-1111.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2015.06.139>.

McDermott, Aileen, Marcus Gustafsson, Thomas Elsam, Chi-Chung Hui, Charles P. Emerson, et Anne-Gaëlle Borycki. 2005. « Gli2 and Gli3 have redundant and context-dependent function in skeletal muscle formation ». *Development (Cambridge, England)* 132 (2) : 345-57. <https://doi.org/10.1242/dev.01537>.

McKinney-Freeman, Shannon L., Kathyjo A. Jackson, Fernando D. Camargo, Giuliana Ferrari, Fulvio Mavilio, et Margaret A. Goodell. 2002. « Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (3) : 1341-46. <https://doi.org/10.1073/pnas.032438799>.

McLennan, I. S. 1996. « Degenerating and regenerating skeletal muscles contain several subpopulations of macrophages with distinct spatial and temporal distributions ». *Journal of Anatomy* 188 (Pt 1) (février) : 17-28.

Meiss, Frank, Hana Andrlová, et Robert Zeiser. 2018. « Vismodegib ». *Recent Results in Cancer Research. Fortschritte Der Krebsforschung. Progres Dans Les Recherches Sur Le Cancer* 211 : 125-39. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_9.

Merly, F., L. Lescaudron, T. Rouaud, F. Crossin, et M. F. Gardahaut. 1999. « Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation ». *Muscle & Nerve* 22 (6) : 724-32. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4598\(199906\)22:6<724::aid-mus9>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4598(199906)22:6<724::aid-mus9>3.0.co;2-o).

Meza, Cesar A., Justin D. La Favor, Do-Houn Kim, et Robert C. Hickner. 2019. « Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS? » *International Journal of Molecular Sciences* 20 (15). <https://doi.org/10.3390/ijms20153775>.

Michel, C. C., et F. E. Curry. 1999. « Microvascular permeability ». *Physiological Reviews* 79 (3) : 703-61.

Miller, Leigh-Anne D., Susan E. Wert, Jean C. Clark, Yan Xu, Anne-Karina T. Perl, et Jeffrey A. Whitsett. 2004. « Role of Sonic hedgehog in patterning of tracheal-bronchial cartilage and the peripheral lung ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 231 (1) : 57-71. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20105>.

Mitra, Sona, Tanu Goyal, et Jawahar L. Mehta. 2011. « Oxidized LDL, LOX-1 and atherosclerosis ». *Cardiovascular Drugs and Therapy / Sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy* 25 (5) : 419-29. <https://doi.org/10.1007/s10557-011-6341-5>.

Mo, R., A. M. Freer, D. L. Zinyk, M. A. Crackower, J. Michaud, H. H. Heng, K. W. Chik, et al. 1997. « Specific and redundant functions of Gli2 and Gli3 zinc finger genes in skeletal patterning and development ». *Development (Cambridge, England)* 124 (1) : 113-23.

Mohammedi, Kamel, Mark Woodward, Yoichiro Hirakawa, Sophia Zoungas, Bryan Williams, Liu Lisheng, Anthony Rodgers, et al. 2016. « Microvascular and Macrovascular Disease and Risk for Major Peripheral Arterial Disease in Patients With Type 2 Diabetes ». *Diabetes Care* 39 (10) : 1796-1803. <https://doi.org/10.2337/dc16-0588>.

Moncada, S., et E. A. Higgs. 1991. « Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance ». *European Journal of Clinical Investigation* 21 (4) : 361-74.

Mooney, C. J., R. Hakimjavadi, E. Fitzpatrick, E. Kennedy, D. Walls, D. Morrow, E. M. Redmond, et

P. A. Cahill. 2015. « Hedgehog and Resident Vascular Stem Cell Fate ». *Stem Cells Int* 2015 : 468428. <https://doi.org/10.1155/2015/468428>.

Moran, Carlos M., Candace T. Myers, Cristy M. Lewis, et Paul A. Krieg. 2012. « Hedgehog regulates angiogenesis of intersegmental vessels through the VEGF signaling pathway ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 241 (6) : 1034-42. <https://doi.org/10.1002/dvdy.23795>.

Moran, Carlos M., Matthew C. Salanga, et Paul A. Krieg. 2011. « Hedgehog signaling regulates size of the dorsal aortae and density of the plexus during avian vascular development ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 240 (6) : 1354-64. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22600>.

Moreau, N., W. Dieb, A. Mauborgne, S. Bourgoïn, L. Villanueva, M. Pohl, et Y. Boucher. 2017. « Hedgehog Pathway-Mediated Vascular Alterations Following Trigeminal Nerve Injury ». *Journal of Dental Research* 96 (4) : 450-57. <https://doi.org/10.1177/0022034516679395>.

Moreau, Nathan, Annie Mauborgne, Sylvie Bourgoïn, Pierre-Olivier Couraud, Ignacio A. Romero, Babette B. Weksler, Luis Villanueva, Michel Pohl, et Yves Boucher. 2016. « Early alterations of Hedgehog signaling pathway in vascular endothelial cells after peripheral nerve injury elicit blood-nerve barrier disruption, nerve inflammation, and neuropathic pain development ». *Pain* 157 (4) : 827-39. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000444>.

Morrow, D., J. P. Cullen, W. Liu, S. Guha, C. Sweeney, Y. A. Birney, N. Collins, D. Walls, E. M. Redmond, et P. A. Cahill. 2009. « Sonic Hedgehog induces Notch target gene expression in vascular smooth muscle cells via VEGF-A ». *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (7) : 1112-18. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.186890> [pii].

Morrow, D., C. Sweeney, Y. A. Birney, S. Guha, N. Collins, P. M. Cummins, R. Murphy, D. Walls, E. M. Redmond, et P. A. Cahill. 2007. « Biomechanical regulation of hedgehog signaling in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo ». *Am J Physiol Cell Physiol* 292 (1) : C488-96. <https://doi.org/00337.2005> [pii] 10.1152/ajpcell.00337.2005.

Moss, Joe We, et Dipak P. Ramji. 2015. « Interferon- γ : Promising therapeutic target in atherosclerosis ». *World Journal of Experimental Medicine* 5 (3) : 154-59. <https://doi.org/10.5493/wjem.v5.i3.154>.

Motoyama, J., J. Liu, R. Mo, Q. Ding, M. Post, et C. C. Hui. 1998. « Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus ». *Nature Genetics* 20 (1) : 54-57. <https://doi.org/10.1038/1711>.

Murphy, M.P., J.H. Lawson, B.M. Rapp, M.C. Dalsing, J. Klein, M.G. Wilson, G.D. Hutchins, et K.L. March. 2011. « Autologous bone marrow mononuclear cell therapy is safe and promotes amputation-free survival in patients with critical limb ischemia ». *Journal of Vascular Surgery* 53 (6) : 1565-1574.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2011.01.074>.

Mutirangura, Pramook, Chanean Ruangsetakit, Chumpol Wongwanit, Nuttawut Sermsathanasawadi, et Khamin Chinsakchai. 2011. « Pedal bypass with deep venous arterialization: the therapeutic option in critical limb ischemia and unreconstructable distal arteries ». *Vascular* 19 (6) : 313-19. <https://doi.org/10.1258/vasc.2010.0a0278>.

Muzumdar, Mandar Deepak, Bosiljka Tasic, Kazunari Miyamichi, Ling Li, et Liqun Luo. 2007. « A global double-fluorescent Cre reporter mouse ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 45 (9) : 593-605. <https://doi.org/10.1002/dvg.20335>.

Nachtergaele, Sigrid, Laurel K. Mydock, Kathiresan Krishnan, Jayan Rammohan, Paul H. Schlesinger, Douglas F. Covey, et Rajat Rohatgi. 2012. « Oxysterols are allosteric activators of the oncoprotein Smoothed ». *Nature Chemical Biology* 8 (2) : 211-20. <https://doi.org/10.1038/nchembio.765>.

- Nagase, Miki, Takashi Nagase, Isao Koshima, et Toshiro Fujita. 2006. « Critical time window of hedgehog-dependent angiogenesis in murine yolk sac ». *Microvascular Research* 71 (2) : 85-90. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2005.11.006>.
- Nagase, Takashi, Miki Nagase, Kotaro Yoshimura, Masafumi Machida, et Masaaki Yamagishi. 2006. « Defects in aortic fusion and craniofacial vasculature in the holoprosencephalic mouse embryo under inhibition of sonic hedgehog signaling ». *The Journal of Craniofacial Surgery* 17 (4) : 736-44. <https://doi.org/10.1097/00001665-200607000-00026>.
- Nakamura, Masafumi, Makoto Kubo, Kosuke Yanai, Yoshiko Mikami, Mio Ikebe, Shuntaro Nagai, Koji Yamaguchi, Masao Tanaka, et Mitsuo Katano. 2007. « Anti-patched-1 antibodies suppress hedgehog signaling pathway and pancreatic cancer proliferation ». *Anticancer Research* 27 (6A) : 3743-47.
- Nakayama, S., M. Arakawa, T. Uchida, T. Ogihara, R. Kanno, F. Ikeda, K. Azuma, et al. 2008. « Dose-dependent requirement of patched homologue 1 in mouse pancreatic beta cell mass ». *Diabetologia* 51 (10) : 1883-92. <https://doi.org/10.1007/s00125-008-1080-2>.
- Narkar, Vihang A., Weiwei Fan, Michael Downes, Ruth T. Yu, Johan W. Jonker, William A. Alaynick, Ester Banayo, Malith S. Karunasiri, Sabina Lorca, et Ronald M. Evans. 2011. « Exercise and PGC-1 α -independent synchronization of type I muscle metabolism and vasculature by ERR γ ». *Cell Metabolism* 13 (3) : 283-93. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.01.019>.
- Nativel, Mathilde, Louis Potier, Laure Alexandre, Laurence Baillet-Blanco, Eric Ducasse, Gilberto Velho, Michel Marre, Ronan Roussel, Vincent Rigalleau, et Kamel Mohammedi. 2018. « Lower extremity arterial disease in patients with diabetes: a contemporary narrative review ». *Cardiovascular Diabetology* 17 (1) : 138. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0781-1>.
- Neal, Bruce, Vlado Perkovic, Kenneth W. Mahaffey, Dick de Zeeuw, Greg Fulcher, Ngozi Erondu, Wayne Shaw, et al. 2017. « Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes ». *The New England Journal of Medicine* 377 (7) : 644-57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1611925>.
- Ni, Chih-Wen, Haiwei Qiu, Amir Rezvan, Kihwan Kwon, Douglas Nam, Dong Ju Son, Jane E. Visvader, et Hanjoong Jo. 2010. « Discovery of novel mechanosensitive genes in vivo using mouse carotid artery endothelium exposed to disturbed flow ». *Blood* 116 (15) : e66-73. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-278192>.
- Nicoli, S., C. Tobia, L. Gualandi, G. De Sena, et M. Presta. 2008. « Calcitonin receptor-like receptor guides arterial differentiation in zebrafish ». *Blood* 111 (10) : 4965-72.
- Nie, D. M., Q. L. Wu, P. Zheng, P. Chen, R. Zhang, B. B. Li, J. Fang, L. H. Xia, et M. Hong. 2016. « Endothelial microparticles carrying hedgehog-interacting protein induce continuous endothelial damage in the pathogenesis of acute graft-versus-host disease ». *Am J Physiol Cell Physiol* 310 (10) : C821-35. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00372.2015> [pii].
- Nielsen, C. M., et S. M. Dymecki. 2010. « Sonic hedgehog is required for vascular outgrowth in the hindbrain choroid plexus ». *Dev Biol* 340 (2) : 430-37. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.01.032> S0012-1606(10)00061-8 [pii].
- Nikol, Sigrid, Iris Baumgartner, Eric Van Belle, Curt Diehm, Adriana Visoná, Maurizio C Capogrossi, Nicole Ferreira-Maldent, et al. 2008. « Therapeutic Angiogenesis With Intramuscular NV1FGF Improves Amputation-free Survival in Patients With Critical Limb Ischemia ». *Molecular Therapy* 16 (5) : 972-78. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.33>.
- Norgren, L., W. R. Hiatt, J. A. Dormandy, M. R. Nehler, K. A. Harris, et F. G. R. Fowkes. 2007. « Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II) ». *Journal of Vascular Surgery* 45 (1) : S5-67. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2006.12.037>.
- Nusslein-Volhard, C., et E. Wieschaus. 1980. « Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila* ». *Nature* 287 (5785) : 795-801.

O'Brien, Phillippe D., Stacey A. Sakowski, et Eva L. Feldman. 2014. « Mouse models of diabetic neuropathy ». *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 54 (3) : 259-72. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilt052>.

Oh, Charles C., Jason D. Klein, Raymond Q. Migrino, et Kent L. Thornburg. 2011. « Growing collateral arteries on demand ». *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery* 6 (3) : 189-98.

Oka, Toru, Hiroshi Akazawa, Atsuhiko T. Naito, et Issei Komuro. 2014. « Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure ». *Circulation Research* 114 (3) : 565-71. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300507>.

Okabe, Seiichi, Tetsuzo Tauchi, Yuko Tanaka, Seiichiro Katagiri, et Kazuma Ohyashiki. 2012. « Effects of the hedgehog inhibitor GDC-0449, alone or in combination with dasatinib, on BCR-ABL-positive leukemia cells ». *Stem Cells and Development* 21 (16) : 2939-48. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0016>.

Olive, K. P., M. A. Jacobetz, C. J. Davidson, A. Gopinathan, D. McIntyre, D. Honess, B. Madhu, et al. 2009. « Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer ». *Science* 324 (5933) : 1457-61. <https://doi.org/10.1126/science.1171362> [pii].

Olive, Kenneth P., Michael A. Jacobetz, Christian J. Davidson, Aarthi Gopinathan, Dominick McIntyre, Davina Honess, Basetti Madhu, et al. 2009. « Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer ». *Science (New York, N.Y.)* 324 (5933) : 1457-61. <https://doi.org/10.1126/science.1171362>.

Olsen, C. L., P. P. Hsu, J. Glienke, G. M. Rubanyi, et A. R. Brooks. 2004. « Hedgehog-interacting protein is highly expressed in endothelial cells but down-regulated during angiogenesis and in several human tumors ». *BMC Cancer* 4 (août) : 43.

Onishi, Hideya, et Mitsuo Katano. 2011. « Hedgehog signaling pathway as a therapeutic target in various types of cancer ». *Cancer Science* 102 (10) : 1756-60. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02010.x>.

O'Reilly, M. S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W. S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, et J. Folkman. 1997. « Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth ». *Cell* 88 (2) : 277-85. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81848-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81848-6).

O'Reilly, M. S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R. A. Rosenthal, M. Moses, W. S. Lane, Y. Cao, E. H. Sage, et J. Folkman. 1994. « Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma ». *Cell* 79 (2) : 315-28. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90200-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90200-3).

Oses, Pierre, Marie-Ange Renault, Rémi Chauvel, Lionel Leroux, Cécile Allières, Benjamin Séguy, Jean-Marie Daniel Lamazière, Pascale Dufourcq, Thierry Couffinhal, et Cécile Duplâa. 2009. « Mapping 3-dimensional neovessel organization steps using micro-computed tomography in a murine model of hindlimb ischemia-brief report ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 29 (12) : 2090-92. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.192732>.

Padilla, Danielle J., Paul McDonough, Brad J. Behnke, Yutaka Kano, K. Sue Hageman, Timothy I. Musch, et David C. Poole. 2006. « Effects of Type II diabetes on capillary hemodynamics in skeletal muscle ». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 291 (5) : H2439-2444. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00290.2006>.

Palladino, M., I. Gatto, V. Neri, S. Straino, M. Silver, A. Tritarelli, A. Piccioni, et al. 2011. « Pleiotropic beneficial effects of sonic hedgehog gene therapy in an experimental model of peripheral limb ischemia ». *Mol Ther* 19 (4) : 658-66.

Papadimitriou, J. M., T. A. Robertson, C. A. Mitchell, et M. D. Grounds. 1990. « The process of new

plasmalemma formation in focally injured skeletal muscle fibers ». *Journal of Structural Biology* 103 (2) : 124-34.

Park, H. L., C. Bai, K. A. Platt, M. P. Matise, A. Beeghly, C. C. Hui, M. Nakashima, et A. L. Joyner. 2000. « Mouse Gli1 mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a Gli2 mutation ». *Development (Cambridge, England)* 127 (8) : 1593-1605.

Parmantier, E., B. Lynn, D. Lawson, M. Turmaine, S. S. Namini, L. Chakrabarti, A. P. McMahon, K. R. Jessen, et R. Mirsky. 1999a. « Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths ». *Neuron* 23 : 713-24.

———. 1999b. « Schwann cell-derived Desert hedgehog controls the development of peripheral nerve sheaths ». *Neuron* 23 (4) : 713-24.

Passman, J. N., X. R. Dong, S. P. Wu, C. T. Maguire, K. A. Hogan, V. L. Bautch, et M. W. Majesky. 2008. « A sonic hedgehog signaling domain in the arterial adventitia supports resident Sca1+ smooth muscle progenitor cells ». *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (27) : 9349-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711382105> [pii].

Pathi, S., S. Pagan-Westphal, D. P. Baker, E. A. Garber, P. Rayhorn, D. Bumcrot, C. J. Tabin, R. Blake Pepinsky, et K. P. Williams. 2001. « Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog ». *Mechanisms of Development* 106 (1-2) : 107-17.

Peichev, M., A. J. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W. J. Lane, M. Williams, M. C. Oz, et al. 2000. « Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors ». *Blood* 95 (3) : 952-58.

Pepicelli, C. V., P. M. Lewis, et A. P. McMahon. 1998. « Sonic hedgehog regulates branching morphogenesis in the mammalian lung ». *Curr Biol* 8 (19) : 1083-86.

Pepper, M. S. 1997. « Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity ». *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8 (1) : 21-43. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(96\)00048-2](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(96)00048-2).

Pérez-Cremades, Daniel, Henry S. Cheng, et Mark W. Feinberg. 2020. « Noncoding RNAs in Critical Limb Ischemia ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 40 (3) : 523-33. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312860>.

Petrova, Ralitsa, et Alexandra L. Joyner. 2014. « Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair ». *Development (Cambridge, England)* 141 (18) : 3445-57. <https://doi.org/10.1242/dev.083691>.

Pettigrew, C. A., E. Asp, et C. P. Emerson. 2013. « A new role for Hedgehogs in juxtacrine signaling ». *Mech Dev* 131 (février) : 137-49.

Piccioni, A., E. Gaetani, V. Neri, I. Gatto, M. Palladino, M. Silver, R. C. Smith, et al. 2013. « Sonic Hedgehog Therapy in a Mouse Model of Age-Associated Impairment of Skeletal Muscle Regeneration ». *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, juin.

Pipinos, Iraklis I., Andrew R. Judge, Joshua T. Selsby, Zhen Zhu, Stanley A. Swanson, Aikaterini A. Nella, et Stephen L. Dodd. 2007. « The myopathy of peripheral arterial occlusive disease: part 1. Functional and histomorphological changes and evidence for mitochondrial dysfunction ». *Vascular and Endovascular Surgery* 41 (6) : 481-89. <https://doi.org/10.1177/1538574407311106>.

Podjaski, Cornelia, Jorge I. Alvarez, Lyne Bourbonniere, Sandra Larouche, Simone Terouz, Jenea M. Bin, Marc-André Lécuyer, et al. 2015. « Netrin 1 regulates blood-brain barrier function and neuroinflammation ». *Brain* 138 (6) : 1598-1612. <https://doi.org/10.1093/brain/awv092>.

Pola, R., L. E. Ling, T. R. Aprahamian, E. Barban, M. Bosch-Marce, C. Curry, M. Corbley, M. Kearney,

- J. M. Isner, et D. W. Losordo. 2003. « Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia ». *Circulation* 108 (4) : 479-85.
- Pola, R., L. E. Ling, M. Silver, M. J. Corbley, M. Kearney, R. Blake Pepinsky, R. Shapiro, et al. 2001. « The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors ». *Nat Med* 7 (6) : 706-11.
- Pola, Roberto, Leona E. Ling, Tamar R. Aprahamian, Elena Barban, Marta Bosch-Marce, Cynthia Curry, Michael Corbley, Marianne Kearney, Jeffrey M. Isner, et Douglas W. Losordo. 2003. « Postnatal recapitulation of embryonic hedgehog pathway in response to skeletal muscle ischemia ». *Circulation* 108 (4) : 479-85. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000080338.60981.FA>.
- Polizio, A. H., P. Chinchilla, X. Chen, S. Kim, D. R. Manning, et N. A. Riobo. 2011. « Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration ». *J Biol Chem* 286 (22) : 19589-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.197111> [pii].
- Polizio, Ariel H., Pilar Chinchilla, Xiaolen Chen, David R. Manning, et Natalia A. Riobo. 2011. « Sonic Hedgehog activates the GTPases Rac1 and RhoA in a Gli-independent manner through coupling of smoothed to Gi proteins ». *Science Signaling* 4 (200) : pt7. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002396>.
- Potente, Michael, Holger Gerhardt, et Peter Carmeliet. 2011. « Basic and therapeutic aspects of angiogenesis ». *Cell* 146 (6) : 873-87. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>.
- Potier, Louis, Ronan Roussel, Gilberto Velho, Pierre-Jean Saulnier, Anisoara Bumbu, Odette Matar, Fabrice Schneider, et al. 2019. « Lower limb events in individuals with type 2 diabetes: evidence for an increased risk associated with diuretic use ». *Diabetologia* 62 (6) : 939-47. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4835-z>.
- Powell, Richard J., Phillip Goodney, Farrell O. Mendelsohn, Elaine K. Moen, et Brian H. Annex. 2010. « Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: Results of the HGF-0205 trial ». *Journal of Vascular Surgery* 52 (6) : 1525-30. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2010.07.044>.
- Powell, Richard J, William A Marston, Scott A Berceli, Raul Guzman, Timothy D Henry, Amy T Longcore, Theresa P Stern, Sharon Watling, et Ronnda L Bartel. 2012. « Cellular Therapy With Ixmyelocel-T to Treat Critical Limb Ischemia: The Randomized, Double-blind, Placebo-controlled RESTORE-CLI Trial ». *Molecular Therapy* 20 (6) : 1280-86. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.52>.
- Powell, R.J., M. Simons, F.O. Mendelsohn, G. Daniel, T.D. Henry, M. Koga, R. Morishita, et B.H. Annex. 2008. « Results of a double-blind, placebo-controlled study to assess the safety of intramuscular injection of hepatocyte growth factor plasmid to improve limb perfusion in patients with critical limb ischemia ». *Circulation* 118 (1) : 58-65. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.727347>.
- Pradhan, A. D., J. E. Manson, N. Rifai, J. E. Buring, et P. M. Ridker. 2001. « C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus ». *JAMA* 286 (3) : 327-34. <https://doi.org/10.1001/jama.286.3.327>.
- Price, Mary Ann. 2006. « CKI, there's more than one: casein kinase I family members in Wnt and Hedgehog signaling ». *Genes & Development* 20 (4) : 399-410. <https://doi.org/10.1101/gad.1394306>.
- Prior, Barry M., H. T. Yang, et Ronald L. Terjung. 2004. « What makes vessels grow with exercise training? ». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)* 97 (3) : 1119-28. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00035.2004>.
- Qin, Yuan, Yan-Huan He, Ning Hou, Gen-Shui Zhang, Yi Cai, Gui-Ping Zhang, Qing Xiao, et al. 2016. « Sonic hedgehog improves ischemia-induced neovascularization by enhancing endothelial progenitor cell function in type 1 diabetes ». *Molecular and Cellular Endocrinology* 423 (mars) : 30-39.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.01.005>.

Ramalho-Santos, M., D. A. Melton, et A. P. McMahon. 2000. « Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development ». *Development* 127 (12) : 2763-72.

Ramsbottom, Simon A., et Mary E. Pownall. 2016. « Regulation of Hedgehog Signalling Inside and Outside the Cell ». *Journal of Developmental Biology* 4 (3). <https://doi.org/10.3390/jdb4030023>.

Reece, Jane B, et Neil A Campbell. 2011. *Campbell biology*. Boston : Benjamin Cummings / Pearson. https://archive.org/details/isbn_9781256158769.

Ren, Y., R. G. Cowan, F. F. Migone, et S. M. Quirk. 2012. « Overactivation of hedgehog signaling alters development of the ovarian vasculature in mice ». *Biol Reprod* 86 (6) : 174. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099176> <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099176> [pii].

Renault, M. A., C. Chapouly, Q. Yao, F. Larrieu-Lahargue, S. Vandierdonck, A. Reynaud, M. Petit, et al. 2013. « Desert hedgehog promotes ischemia-induced angiogenesis by ensuring peripheral nerve survival ». *Circ Res* 112 (5) : 762-70.

Renault, M. A., F. Robbesyn, C. Chapouly, Q. Yao, S. Vandierdonck, A. Reynaud, I. Belloc, et al. 2013. « Hedgehog-dependent regulation of angiogenesis and myogenesis is impaired in aged mice ». *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33 (12) : 2858-66.

Renault, M. A., J. Roncalli, J. Tongers, S. Misener, T. Thorne, K. Jujo, A. Ito, et al. 2009. « The Hedgehog transcription factor Gli3 modulates angiogenesis ». *Circ Res* 105 (8) : 818-26.

Renault, M. A., J. Roncalli, J. Tongers, T. Thorne, E. Klyachko, S. Misener, O. V. Volpert, et al. 2010. « Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells ». *J Mol Cell Cardiol* 49 (3) : 490-98.

Renault, M. A., S. Vandierdonck, C. Chapouly, Y. Yu, G. Qin, A. Metras, T. Couffinhal, et al. 2013. « Gli3 regulation of myogenesis is necessary for ischemia-induced angiogenesis ». *Circ Res* 113 (10) : 1148-58.

Renault, Marie-Ange, Candice Chapouly, Qinyu Yao, Frédéric Larrieu-Lahargue, Soizic Vandierdonck, Annabel Reynaud, Myriam Petit, et al. 2013. « Desert hedgehog promotes ischemia-induced angiogenesis by ensuring peripheral nerve survival ». *Circulation Research* 112 (5) : 762-70. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300871>.

Renault, Marie-Ange, Fanny Robbesyn, Candice Chapouly, Qinyu Yao, Soizic Vandierdonck, Annabel Reynaud, Isabelle Belloc, et al. 2013. « Hedgehog-dependent regulation of angiogenesis and myogenesis is impaired in aged mice ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (12) : 2858-66. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.302494>.

Renault, Marie-Ange, Jérôme Roncalli, Jörn Tongers, Sol Misener, Tina Thorne, Kentaro Jujo, Aiko Ito, et al. 2009. « The Hedgehog transcription factor Gli3 modulates angiogenesis ». *Circulation Research* 105 (8) : 818-26. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206706>.

Renault, Marie-Ange, Jérôme Roncalli, Jörn Tongers, Tina Thorne, Ekaterina Klyachko, Sol Misener, Olga V. Volpert, et al. 2010. « Sonic hedgehog induces angiogenesis via Rho kinase-dependent signaling in endothelial cells ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 49 (3) : 490-98. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2010.05.003>.

Renault, Marie-Ange, Soizic Vandierdonck, Candice Chapouly, Yang Yu, Gangjian Qin, Alexandre Metras, Thierry Couffinhal, et al. 2013. « Gli3 regulation of myogenesis is necessary for ischemia-induced angiogenesis ». *Circulation Research* 113 (10) : 1148-58. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301546>.

Rhodes, John M., et Michael Simons. 2007. « The extracellular matrix and blood vessel formation: not

just a scaffold ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 11 (2) : 176-205. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00031.x>.

Riobo, Natalia A., et David R. Manning. 2007. « Pathways of signal transduction employed by vertebrate Hedgehogs ». *The Biochemical Journal* 403 (3) : 369-79. <https://doi.org/10.1042/BJ20061723>.

Ritchie, Stuart A., Christine F. Kohlhaas, Alasdair R. Boyd, Krishna C. Yalla, Kenneth Walsh, John M. C. Connell, et Ian P. Salt. 2010. « Insulin-stimulated phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine-615 contributes to nitric oxide synthesis ». *The Biochemical Journal* 426 (1) : 85-90. <https://doi.org/10.1042/BJ20091580>.

Robbins, D. J., D. L. Fei, et N. A. Riobo. 2012. « The Hedgehog signal transduction network ». *Sci Signal* 5 (246) : re6.

Robbins, David J., Dennis Liang Fei, et Natalia A. Riobo. 2012. « The Hedgehog Signal Transduction Network ». *Science signaling* 5 (246) : re6. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2002906>.

Robertson, R. Paul, Jamie Harmon, Phuong Oanh T. Tran, et Vincent Poitout. 2004. « Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes ». *Diabetes* 53 Suppl 1 (février) : S119-124. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2007.s119>.

Robertson, T. A., M. A. Maley, M. D. Grounds, et J. M. Papadimitriou. 1993. « The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis ». *Experimental Cell Research* 207 (2) : 321-31. <https://doi.org/10.1006/excr.1993.1199>.

Robinson, Giles W., Brent A. Orr, Gang Wu, Sridharan Gururangan, Tong Lin, Ibrahim Qaddoumi, Roger J. Packer, et al. 2015. « Vismodegib Exerts Targeted Efficacy Against Recurrent Sonic Hedgehog-Subgroup Medulloblastoma: Results From Phase II Pediatric Brain Tumor Consortium Studies PBTC-025B and PBTC-032 ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (24) : 2646-54. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.60.1591>.

Rohatgi, Rajat, Ljiljana Milenkovic, Ryan B. Corcoran, et Matthew P. Scott. 2009. « Hedgehog signal transduction by Smoothed: pharmacologic evidence for a 2-step activation process ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (9) : 3196-3201. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813373106>.

Roncalli, J., M. A. Renault, J. Tongers, S. Misener, T. Thorne, C. Kamide, K. Jujo, et al. 2011. « Sonic hedgehog-induced functional recovery after myocardial infarction is enhanced by AMD3100-mediated progenitor-cell mobilization ». *J Am Coll Cardiol* 57 (24) : 2444-52.

Roncalli, Jerome, Jörn Tongers, Marie-Ange Renault, et Douglas W. Losordo. 2008. « Biological approaches to ischemic tissue repair: gene- and cell-based strategies ». *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 6 (5) : 653-68. <https://doi.org/10.1586/14779072.6.5.653>.

Rooke, Thom W., Alan T. Hirsch, Sanjay Misra, Anton N. Sidawy, Joshua A. Beckman, Laura K. Findeiss, Jafar Golzarian, et al. 2011. « 2011 ACCF/AHA Focused Update of the Guideline for the Management of Patients With Peripheral Artery Disease (Updating the 2005 Guideline): A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines ». *Circulation* 124 (18) : 2020-45. <https://doi.org/10.1161/CIR.0b013e31822e80c3>.

Rowitch, D. H., S. Jacques B, S. M. Lee, J. D. Flax, E. Y. Snyder, et A. P. McMahon. 1999. « Sonic hedgehog regulates proliferation and inhibits differentiation of CNS precursor cells ». *J Neurosci* 19 (20) : 8954-65.

Roy Chaudhuri, T., N. L. Straubinger, R. F. Pitoniak, B. L. Hylander, E. A. Repasky, W. W. Ma, et R. M. Straubinger. 2016. « Tumor-Priming Smoothed Inhibitor Enhances Deposition and Efficacy of Cytotoxic Nanoparticles in a Pancreatic Cancer Model ». *Mol Cancer Ther* 15 (1) : 84-93. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0602> 1535-7163.MCT-15-0602 [pii].

Ruat, Martial, Lucile Hoch, Hélène Faure, et Didier Rognan. 2014. « Targeting of Smoothed for therapeutic gain ». *Trends in Pharmacological Sciences* 35 (5) : 237-46. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.03.002>.

Rudin, Charles M., Christine L. Hann, John Laterra, Robert L. Yauch, Christopher A. Callahan, Ling Fu, Thomas Holcomb, et al. 2009. « Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 ». *The New England Journal of Medicine* 361 (12) : 1173-78. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0902903>.

Saitoh, T., et M. Katoh. 2001. « Expression profiles of betaTRCP1 and betaTRCP2, and mutation analysis of betaTRCP2 in gastric cancer ». *International Journal of Oncology* 18 (5) : 959-64.

Salaun, Pierre, Ileana Desormais, François-Xavier Lapébie, Alessandra Bura Rivière, Victor Aboyns, Philippe Lacroix, Vincent Bataille, Joël Constans, et Carine Boulon. 2019. « Comparison of Ankle Pressure, Systolic Toe Pressure, and Transcutaneous Oxygen Pressure to Predict Major Amputation After 1 Year in the COPART Cohort ». *Angiology* 70 (3) : 229-36. <https://doi.org/10.1177/0003319718793566>.

Sandhiya, Selvarajan, George Melvin, Srinivasamurthy Suresh Kumar, et Steven Aibor Dkhar. 2013. « The dawn of hedgehog inhibitors: Vismodegib ». *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics* 4 (1) : 4-7. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.107628>.

Sandoval-Pinto, Elena, Jorge Ramon Padilla-Gutiérrez, Emmanuel Valdes-Alvarado, Ilian Janet García-González, Angelica Valdez-Haro, Jose Francisco Muñoz-Valle, Hector Enrique Flores-Salinas, Fernando Rivas, et Yeminia Valle. 2014. « Assessment of the E-selectin rs5361 (561A>C) polymorphism and soluble protein concentration in acute coronary syndrome: association with circulating levels ». *Mediators of Inflammation* 2014 : 158367. <https://doi.org/10.1155/2014/158367>.

Sangiorgi, S., A. Manelli, M. Reguzzoni, M. Ronga, M. Protasoni, et C. Dell'Orbo. 2010. « The Cutaneous Microvascular Architecture of Human Diabetic Toe Studied by Corrosion Casting and Scanning Electron Microscopy Analysis ». *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 293 (10) : 1639-45. <https://doi.org/10.1002/ar.21168>.

Scales, Suzie J., et Frederic J. de Sauvage. 2009. « Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy ». *Trends in Pharmacological Sciences* 30 (6) : 303-12. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2009.03.007>.

Schäfer, Andreas, et Johann Bauersachs. 2008. « Endothelial dysfunction, impaired endogenous platelet inhibition and platelet activation in diabetes and atherosclerosis ». *Current Vascular Pharmacology* 6 (1) : 52-60.

Schanzer, Andres, Nathanael Hevelone, Christopher D. Owens, Michael Belkin, Dennis F. Bandyk, Alexander W. Clowes, Gregory L. Moneta, et Michael S. Conte. 2007. « Technical factors affecting autogenous vein graft failure: Observations from a large multicenter trial ». *Journal of Vascular Surgery* 46 (6) : 1180-90. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2007.08.033>.

Scholz, Dimitri, Tibor Ziegelhoeffer, Armin Helisch, Shawn Wagner, Christian Friedrich, Thomas Podzuweit, et Wolfgang Schaper. 2002. « Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34 (7) : 775-87.

Schuler, Michael, Faisal Ali, Elisabeth Metzger, Pierre Chambon, et Daniel Metzger. 2005. « Temporally controlled targeted somatic mutagenesis in skeletal muscles of the mouse ». *Genesis (New York, N.Y.: 2000)* 41 (4) : 165-70. <https://doi.org/10.1002/gene.20107>.

Schulz, Alexander, Christian Walther, Helen Morrison, et Reinhard Bauer. 2014. « In vivo Electrophysiological Measurements on Mouse Sciatic Nerves ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 86 (avril). <https://doi.org/10.3791/51181>.

- Scirica, Benjamin M., Deepak L. Bhatt, Eugene Braunwald, P. Gabriel Steg, Jaime Davidson, Boaz Hirshberg, Peter Ohman, et al. 2013. « Saxagliptin and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus ». *The New England Journal of Medicine* 369 (14) : 1317-26. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1307684>.
- Seifert, Katrin, Anita Büttner, Stephan Rigol, Nicole Eilert, Elke Wandel, et Athanassios Giannis. 2012. « Potent small molecule Hedgehog agonists induce VEGF expression in vitro ». *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 20 (21) : 6465-81. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.08.026>.
- Selthofer-Relatić, K., I. Bošnjak, et A. Kibel. 2016. « Obesity Related Coronary Microvascular Dysfunction: From Basic to Clinical Practice ». *Cardiology Research and Practice* 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8173816>.
- Seo, Hyejin, Jinsun Kim, Gi-Hee Park, Yuri Kim, et Sung-Won Cho. 2016. « Long-range enhancers modulate Foxf1 transcription in blood vessels of pulmonary vascular network ». *Histochemistry and Cell Biology* 146 (3) : 289-300. <https://doi.org/10.1007/s00418-016-1445-4>.
- Setacci, C., G. de Donato, M. Teraa, F. L. Moll, J.-B. Ricco, F. Becker, H. Robert-Ebadi, et al. 2011. « Chapter IV: Treatment of critical limb ischaemia ». *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery: The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 42 Suppl 2 (décembre) : S43-59. [https://doi.org/10.1016/S1078-5884\(11\)60014-2](https://doi.org/10.1016/S1078-5884(11)60014-2).
- Shah, D. M., R. C. Darling, B. B. Chang, K. M. Fitzgerald, P. S. Paty, et R. P. Leather. 1995. « Long-term results of in situ saphenous vein bypass. Analysis of 2058 cases ». *Annals of Surgery* 222 (4) : 438-46; discussion 446-448.
- Shao, Shuai, Guang-Liang Wang, Cespuaglio Raymond, Xue-Hua Deng, Xiao-Lan Zhu, Di Wang, et Le-Peng Hong. 2017. « Activation of Sonic hedgehog signal by Purmorphamine, in a mouse model of Parkinson's disease, protects dopaminergic neurons and attenuates inflammatory response by mediating PI3K/Akt signaling pathway ». *Molecular Medicine Reports* 16 (2) : 1269-77. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6751>.
- Sharghi-Namini, Soheila, Mark Turmaine, Carola Meier, Vishal Sahni, Fujio Umehara, Kristjan R. Jessen, et Rhona Mirsky. 2006a. « The structural and functional integrity of peripheral nerves depends on the glial-derived signal desert hedgehog ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26 (23) : 6364-76. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0157-06.2006>.
- . 2006b. « The Structural and Functional Integrity of Peripheral Nerves Depends on the Glial-Derived Signal Desert Hedgehog ». *Journal of Neuroscience* 26 (23) : 6364-76. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0157-06.2006>.
- Sheller-Miller, Samantha, Kyungsun Choi, Chulhee Choi, et Ramkumar Menon. 2019. « Cyclic-recombinase-reporter mouse model to determine exosome communication and function during pregnancy ». *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 221 (5) : 502.e1-502.e12. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2019.06.010>.
- Shen, Y., C. Li, R. Y. Zhang, Q. Zhang, W. F. Shen, F. H. Ding, et L. Lu. 2017. « Association of increased serum CTRP5 levels with in-stent restenosis after coronary drug-eluting stent implantation: CTRP5 promoting inflammation, migration and proliferation in vascular smooth muscle cells ». *Int J Cardiol* 228 (février) : 129-36. [https://doi.org/S0167-5273\(16\)33481-7](https://doi.org/S0167-5273(16)33481-7) [pii] 10.1016/j.ijcard.2016.11.034.
- Shigematsu, H., K. Yasuda, T. Iwai, T. Sasajima, S. Ishimaru, Y. Ohashi, T. Yamaguchi, T. Ogihara, et R. Morishita. 2010. « Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of hepatocyte growth factor plasmid for critical limb ischemia ». *Gene Therapy* 17 (9) : 1152-61. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.51>.
- Sicklick, J. K., Y. X. Li, S. S. Choi, Y. Qi, W. Chen, M. Bustamante, J. Huang, et al. 2005. « Role for hedgehog signaling in hepatic stellate cell activation and viability ». *Lab Invest* 85 (11) : 1368-80. <https://doi.org/3700349> [pii] 10.1038/labinvest.3700349.

Siekman, Arndt F., et Nathan D. Lawson. 2007. « Notch signalling and the regulation of angiogenesis ». *Cell Adhesion & Migration* 1 (2) : 104-6. <https://doi.org/10.4161/cam.1.2.4488>.

Silvestre, J. S., et B. I. Lévy. 2006. « [Diabetes and peripheral arterial occlusive disease: therapeutic potential and pro-angiogenic strategies] ». *Annales De Cardiologie Et D'angéiologie* 55 (2) : 100-103. <https://doi.org/10.1016/j.ancard.2006.02.003>.

Singh, Brahma N., Junsheng Fu, Rakesh K. Srivastava, et Sharmila Shankar. 2011. « Hedgehog signaling antagonist GDC-0449 (Vismodegib) inhibits pancreatic cancer stem cell characteristics: molecular mechanisms ». *PloS One* 6 (11) : e27306. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027306>.

Singh, Vir B., Meera V. Singh, Santhi Gorantla, Larisa Y. Poluektova, et Sanjay B. Maggirwar. 2016a. « Smoothened Agonist Reduces Human Immunodeficiency Virus Type-1-Induced Blood-Brain Barrier Breakdown in Humanized Mice ». *Scientific Reports* 6 (mai) : 26876. <https://doi.org/10.1038/srep26876>.

———. 2016b. « Smoothened Agonist Reduces Human Immunodeficiency Virus Type-1-Induced Blood-Brain Barrier Breakdown in Humanized Mice ». *Scientific Reports* 6 (1). <https://doi.org/10.1038/srep26876>.

Singh, Vir B., Meera V. Singh, Dorota Piekna-Przybylska, Santhi Gorantla, Larisa Y. Poluektova, et Sanjay B. Maggirwar. 2017. « Sonic Hedgehog mimetic prevents leukocyte infiltration into the CNS during acute HIV infection ». *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10241-0>.

Sinha, Surajit, et James K. Chen. 2006. « Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothened ». *Nature Chemical Biology* 2 (1) : 29-30. <https://doi.org/10.1038/nchembio753>.

Sireesh, Dornadula, Umopathy Dhamodharan, Krishnamoorthy Ezhilarasi, Viswanathan Vijay, et Kunka Mohanram Ramkumar. 2018. « Association of NF-E2 Related Factor 2 (Nrf2) and inflammatory cytokines in recent onset Type 2 Diabetes Mellitus ». *Scientific Reports* 8 (1) : 5126. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22913-6>.

Snow, M. H. 1977. « Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. I. A fine structural study ». *The Anatomical Record* 188 (2) : 181-99. <https://doi.org/10.1002/ar.1091880205>.

Soga, Yoshimitsu, Osamu Iida, Mitsuyoshi Takahaera, Keisuke Hirano, Kenji Suzuki, Daizo Kawasaki, Yusuke Miyashita, et Taketsugu Tsuchiya. 2014. « Two-Year Life Expectancy in Patients With Critical Limb Ischemia ». *JACC: Cardiovascular Interventions* 7 (12) : 1444-49. <https://doi.org/10.1016/j.jcin.2014.06.018>.

Soleti, Raffaella, Tarek Benameur, Chiara Porro, Maria Antonietta Panaro, Ramarosan Andriantsitohaina, et Maria Carmen Martínez. 2009a. « Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors ». *Carcinogenesis* 30 (4) : 580-88. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp030>.

———. 2009b. « Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors ». *Carcinogenesis* 30 (4) : 580-88. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp030>.

Spranger, Joachim, Anja Kroke, Matthias Möhlig, Kurt Hoffmann, Manuela M. Bergmann, Michael Ristow, Heiner Boeing, et Andreas F. H. Pfeiffer. 2003. « Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study ». *Diabetes* 52 (3) : 812-17. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.812>.

Sprengers, Ralf W., Martin Teraa, Frans L. Moll, G. Ardine de Wit, Yolanda van der Graaf, Marianne C. Verhaar, JUVENTAS Study Group, et SMART Study Group. 2010. « Quality of life in patients with

no-option critical limb ischemia underlines the need for new effective treatment ». *Journal of Vascular Surgery* 52 (4) : 843-49, 849.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2010.04.057>.

Stanton, Benjamin Z., et Lee F. Peng. 2010. « Small-molecule modulators of the Sonic Hedgehog signaling pathway ». *Molecular bioSystems* 6 (1) : 44-54. <https://doi.org/10.1039/b910196a>.

Stanton, Benjamin Z., Lee F. Peng, Nicole Maloof, Kazuo Nakai, Xiang Wang, Jay L. Duffner, Kennedy M. Taveras, et al. 2009. « A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells ». *Nature Chemical Biology* 5 (3) : 154-56. <https://doi.org/10.1038/nchembio.142>.

St-Jacques, B., M. Hammerschmidt, et A. P. McMahon. 1999. « Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation ». *Genes Dev* 13 (16) : 2072-86.

Straface, G., T. Aprahamian, A. Flex, E. Gaetani, F. Biscetti, R. C. Smith, G. Pecorini, et al. 2009. « Sonic hedgehog regulates angiogenesis and myogenesis during post-natal skeletal muscle regeneration ». *J Cell Mol Med* 13 (8B) : 2424-35.

Stratton, I. M., A. I. Adler, H. A. Neil, D. R. Matthews, S. E. Manley, C. A. Cull, D. Hadden, R. C. Turner, et R. R. Holman. 2000. « Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study ». *BMJ (Clinical research ed.)* 321 (7258) : 405-12.

Stringer, S. E. 2006. « The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis ». *Biochemical Society Transactions* 34 (Pt 3) : 451-53. <https://doi.org/10.1042/BST0340451>.

Stuart, Charles A., William L. Stone, Mary E. A. Howell, Marianne F. Brannon, H. Kenton Hall, Andrew L. Gibson, et Michael H. Stone. 2016. « Myosin content of individual human muscle fibers isolated by laser capture microdissection ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 310 (5) : C381-389. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00317.2015>.

Surace, Enrico M., Kamaljit S. Balaggan, Alessandra Tessitore, Claudio Mussolino, Gabriella Cotugno, Ciro Bonetti, Aniello Vitale, Robin R. Ali, et Alberto Auricchio. 2006. « Inhibition of ocular neovascularization by hedgehog blockade ». *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 13 (3) : 573-79. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.10.010>.

Suri, C., J. McClain, G. Thurston, D. M. McDonald, H. Zhou, E. H. Oldmixon, T. N. Sato, et G. D. Yancopoulos. 1998. « Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1 ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5388) : 468-71. <https://doi.org/10.1126/science.282.5388.468>.

Swift, Matthew R., et Brant M. Weinstein. 2009. « Arterial-venous specification during development ». *Circulation Research* 104 (5) : 576-88. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.108.188805>.

Takahashi, T., C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J. M. Isner, et T. Asahara. 1999. « Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization ». *Nature Medicine* 5 (4) : 434-38. <https://doi.org/10.1038/7434>.

Takeshita, S., L. P. Zheng, E. Brogi, M. Kearney, L. Q. Pu, S. Bunting, N. Ferrara, J. F. Symes, et J. M. Isner. 1994. « Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model ». *The Journal of Clinical Investigation* 93 (2) : 662-70. <https://doi.org/10.1172/JCI117018>.

Tanaka, Kenichi A., Nigel S. Key, et Jerrold H. Levy. 2009. « Blood coagulation: hemostasis and thrombin regulation ». *Anesthesia and Analgesia* 108 (5) : 1433-46. <https://doi.org/10.1213/ane.0b013e31819bcc9c>.

Teraa, Martin, Ralf W. Sprengers, Roger E. G. Schutgens, Ineke C. M. Slaper-Cortenbach, Yolanda van der Graaf, Ale Algra, Ingeborg van der Tweel, et al. 2015. « Effect of repetitive intra-arterial infusion

of bone marrow mononuclear cells in patients with no-option limb ischemia: the randomized, double-blind, placebo-controlled Rejuvenating Endothelial Progenitor Cells via Transcutaneous Intra-arterial Supplementation (JUVENTAS) trial ». *Circulation* 131 (10) : 851-60. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.012913>.

Thomas, M. K., J. H. Lee, N. Rastalsky, et J. F. Habener. 2001. « Hedgehog signaling regulation of homeodomain protein islet duodenum homeobox-1 expression in pancreatic beta-cells ». *Endocrinology* 142 (3) : 1033-40. <https://doi.org/10.1210/endo.142.3.8007>.

Thomas, M. K., N. Rastalsky, J. H. Lee, et J. F. Habener. 2000. « Hedgehog signaling regulation of insulin production by pancreatic beta-cells ». *Diabetes* 49 (12) : 2039-47. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.12.2039>.

Thomas, Markus, et Hellmut G. Augustin. 2009. « The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis ». *Angiogenesis* 12 (2) : 125-37. <https://doi.org/10.1007/s10456-009-9147-3>.

Thurston, G., J. S. Rudge, E. Ioffe, H. Zhou, L. Ross, S. D. Croll, N. Glazer, J. Holash, D. M. McDonald, et G. D. Yancopoulos. 2000. « Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage ». *Nature Medicine* 6 (4) : 460-63. <https://doi.org/10.1038/74725>.

Tian, Fei, Josef Mysliwietz, Joachim Ellwart, Fernando Gamarra, Rudolf Maria Huber, et Albrecht Bergner. 2012. « Effects of the Hedgehog pathway inhibitor GDC-0449 on lung cancer cell lines are mediated by side populations ». *Clinical and Experimental Medicine* 12 (1) : 25-30. <https://doi.org/10.1007/s10238-011-0135-8>.

Tremblay, Martin R., Michael Nesler, Robin Weatherhead, et Alfredo C. Castro. 2009. « Recent patents for Hedgehog pathway inhibitors for the treatment of malignancy ». *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 19 (8) : 1039-56. <https://doi.org/10.1517/13543770903008551>.

Tronc, F., M. Wassef, B. Esposito, D. Henrion, S. Glagov, et A. Tedgui. 1996. « Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit common carotid artery ». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 16 (10) : 1256-62.

Tukachinsky, Hanna, Ryan P. Kuzmickas, Cindy Y. Jao, Jing Liu, et Adrian Salic. 2012. « Dispatched and scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand ». *Cell Reports* 2 (2) : 308-20. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.07.010>.

Tuyl, M. van, F. Groenman, J. Wang, M. Kuliszewski, J. Liu, D. Tibboel, et M. Post. 2007. « Angiogenic factors stimulate tubular branching morphogenesis of sonic hedgehog-deficient lungs ». *Dev Biol* 303 (2) : 514-26.

Vajanto, I., P. Korpisalo, J. Karjalainen, T. Hakala, K. Mäkinen, et S. Ylä-Herttua. 2009. « Antegrade flow and peripheral resistance determine the level of endogenous arteriogenesis in patients with superficial femoral artery occlusion ». *European Journal of Clinical Investigation* 39 (12) : 1048-54. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2009.02208.x>.

Valente, Enza Maria, Rasim O. Rosti, Elizabeth Gibbs, et Joseph G. Gleeson. 2014. « Primary cilia in neurodevelopmental disorders ». *Nature Reviews. Neurology* 10 (1) : 27-36. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2013.247>.

Valverde Lde, F., A. Pereira Tde, R. B. Dias, V. S. Guimaraes, E. A. Ramos, J. N. Santos, et C. A. Gurgel Rocha. 2016. « Macrophages and endothelial cells orchestrate tumor-associated angiogenesis in oral cancer via hedgehog pathway activation ». *Tumour Biol* 37 (7) : 9233-41. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4763-6> [10.1007/s13277-015-4763-6](https://doi.org/10.1007/s13277-015-4763-6) [pii].

Van Royen, N., J. J. Piek, W. Schaper, C. Bode, et I. Buschmann. 2001. « Arteriogenesis: mechanisms and modulation of collateral artery development ». *Journal of Nuclear Cardiology: Official Publication of the American Society of Nuclear Cardiology* 8 (6) : 687-93. <https://doi.org/10.1067/mnc.2001.118924>.

Vanlandewijck, Michael, Liqun He, Maarja Andaloussi Mäe, Johanna Andrae, Koji Ando, Francesca Del Gaudio, Khayrun Nahar, et al. 2018. « A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature ». *Nature* 554 (7693) : 475-80. <https://doi.org/10.1038/nature25739>.

Velcheti, Vamsidhar. 2007. « Hedgehog signaling is a potent regulator of angiogenesis in small cell lung cancer ». *Medical Hypotheses* 69 (4) : 948-49. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.02.021>.

Victor, Victor M., Milagros Rocha, Eva Solá, Celia Bañuls, Katherine Garcia-Malpartida, et Antonio Hernández-Mijares. 2009. « Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis ». *Current Pharmaceutical Design* 15 (26) : 2988-3002.

Vokes, S. A., T. A. Yatskievych, R. L. Heimark, J. McMahon, A. P. McMahon, P. B. Antin, et P. A. Krieg. 2004. « Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis ». *Development* 131 (17) : 4371-80.

Vokes, Steven A., Tatiana A. Yatskievych, Ronald L. Heimark, Jill McMahon, Andrew P. McMahon, Parker B. Antin, et Paul A. Krieg. 2004. « Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis ». *Development* 131 (17) : 4371-80. <https://doi.org/10.1242/dev.01304>.

Wagenseil, Jessica E., et Robert P. Mecham. 2009. « Vascular extracellular matrix and arterial mechanics ». *Physiological Reviews* 89 (3) : 957-89. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2008>.

Walshe, T. E., P. Connell, L. Cryan, G. Ferguson, T. Gardiner, D. Morrow, E. M. Redmond, C. O'Brien, et P. A. Cahill. 2011. « Microvascular retinal endothelial and pericyte cell apoptosis in vitro: role of hedgehog and Notch signaling ». *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52 (7) : 4472-83. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-7061> [pii].

Wang, Feng, Fang-Fang Chen, Yuan-Yuan Shang, Ya Li, Zhi-Hao Wang, Lu Han, Yi-Hui Li, et al. 2018. « Insulin resistance adipocyte-derived exosomes aggravate atherosclerosis by increasing vasa vasorum angiogenesis in diabetic ApoE^{-/-} mice ». *International Journal of Cardiology* 265 (août) : 181-87. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2018.04.028>.

Wang, G., Z. Zhang, Z. Xu, H. Yin, L. Bai, Z. Ma, M. A. Decoster, G. Qian, et G. Wu. 2010. « Activation of the sonic hedgehog signaling controls human pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation in response to hypoxia ». *Biochim Biophys Acta* 1803 (12) : 1359-67. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.09.002> S0167-4889(10)00243-0 [pii].

Wang, Jiangbo, Jiuyi Lu, Michael C. Bond, Minyong Chen, Xiu-Rong Ren, H. Kim Lyerly, Larry S. Barak, et Wei Chen. 2010. « Identification of select glucocorticoids as Smoothed agonists: potential utility for regenerative medicine ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (20) : 9323-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910712107>.

Wang, Ying, Joshua A. Dubland, Sima Allahverdian, Enyinnaya Asonye, Basak Sahin, Jen Erh Jaw, Don D. Sin, Michael A. Seidman, Nicholas J. Leeper, et Gordon A. Francis. 2019. « Smooth Muscle Cells Contribute the Majority of Foam Cells in Apolipoprotein E-Deficient Mouse Atherosclerosis ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 39 (5) : 876-87. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.312434>.

Wang, Yu, Lance Davidow, Anthony C. Arvanites, Joel Blanchard, Kelvin Lam, Ke Xu, Vatsal Oza, et al. 2012. « Glucocorticoid compounds modify smoothed localization and hedgehog pathway activity ». *Chemistry & Biology* 19 (8) : 972-82. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.06.012>.

Wang, Yu, Andrew P. McMahon, et Benjamin L. Allen. 2007. « Shifting paradigms in Hedgehog signaling ». *Current Opinion in Cell Biology* 19 (2) : 159-65. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.005>.

Wang, Yue, Shijie Jin, Yoshifumi Sonobe, Yi Cheng, Hiroshi Horiuchi, Bijay Parajuli, Jun Kawanokuchi, Tetsuya Mizuno, Hideyuki Takeuchi, et Akio Suzumura. 2014. « Interleukin-1 β Induces Blood-Brain

Barrier Disruption by Downregulating Sonic Hedgehog in Astrocytes ». Sous la direction de Jun-ichi Kira. *PLoS ONE* 9 (10) : e110024. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110024>.

White, A. C., K. J. Lavine, et D. M. Ornitz. 2007. « FGF9 and SHH regulate mesenchymal Vegfa expression and development of the pulmonary capillary network ». *Development* 134 (20) : 3743-52.

White, Andrew C., Kory J. Lavine, et David M. Ornitz. 2007. « FGF9 and SHH regulate mesenchymal Vegfa expression and development of the pulmonary capillary network ». *Development (Cambridge, England)* 134 (20) : 3743-52. <https://doi.org/10.1242/dev.004879>.

White, William B., Christopher P. Cannon, Simon R. Heller, Steven E. Nissen, Richard M. Bergenstal, George L. Bakris, Alfonso T. Perez, et al. 2013. « Alogliptin after acute coronary syndrome in patients with type 2 diabetes ». *The New England Journal of Medicine* 369 (14) : 1327-35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1305889>.

WHO. 2020. « Diabetes ». 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.

Wigle, J. T., et G. Oliver. 1999. « Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system ». *Cell* 98 (6) : 769-78.

Wilkinson, D. G. 2000. « Eph receptors and ephrins: regulators of guidance and assembly ». *International Review of Cytology* 196 : 177-244. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(00\)96005-4](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(00)96005-4).

Williams, Charles, Seok-Hyung Kim, Terri T. Ni, Lauren Mitchell, Hyunju Ro, John S. Penn, Scott H. Baldwin, Lila Solnica-Krezel, et Tao P. Zhong. 2010a. « Hedgehog signaling induces arterial endothelial cell formation by repressing venous cell fate ». *Developmental Biology* 341 (1) : 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.02.028>.

———. 2010b. « Hedgehog signaling induces arterial endothelial cell formation by repressing venous cell fate ». *Developmental Biology* 341 (1) : 196-204. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.02.028>.

Wiviott, Stephen D., Itamar Raz, Marc P. Bonaca, Ofri Mosenzon, Eri T. Kato, Avivit Cahn, Michael G. Silverman, et al. 2019. « Dapagliflozin and Cardiovascular Outcomes in Type 2 Diabetes ». *The New England Journal of Medicine* 380 (4) : 347-57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1812389>.

Wu, Fujia, Yu Zhang, Bo Sun, Andrew P. McMahon, et Yu Wang. 2017. « Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy ». *Cell Chemical Biology* 24 (3) : 252-80. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.02.010>.

Wu, Xu, Sheng Ding, Qiang Ding, Nathanael S. Gray, et Peter G. Schultz. 2002. « A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells ». *Journal of the American Chemical Society* 124 (49) : 14520-21. <https://doi.org/10.1021/ja0283908>.

Wu, Xu, John Walker, Jie Zhang, Sheng Ding, et Peter G. Schultz. 2004. « Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway ». *Chemistry & Biology* 11 (9) : 1229-38. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.06.010>.

Xia, Yuan-peng, Quan-wei He, Ya-nan Li, Sheng-cai Chen, Ming Huang, Yong Wang, Yuan Gao, et al. 2013a. « Recombinant human sonic hedgehog protein regulates the expression of ZO-1 and occludin by activating angiopoietin-1 in stroke damage ». *PloS One* 8 (7) : e68891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068891>.

———. 2013b. « Recombinant Human Sonic Hedgehog Protein Regulates the Expression of ZO-1 and Occludin by Activating Angiopoietin-1 in Stroke Damage ». Sous la direction de Renping Zhou. *PLoS ONE* 8 (7) : e68891. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068891>.

Xie, Guanhua, Steve S. Choi, Wing-Kin Syn, Gregory A. Michelotti, Marzena Swiderska, Gamze Karaca, Isaac S. Chan, Yuping Chen, et Anna Mae Diehl. 2013. « Hedgehog signalling regulates liver sinusoidal endothelial cell capillarisation ». *Gut* 62 (2) : 299-309. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2011-301494>.

- Xiong, Yuquan, et Timothy Hla. 2014. « S1P control of endothelial integrity ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 378 : 85-105. https://doi.org/10.1007/978-3-319-05879-5_4.
- Yamazaki, M., K. Nakamura, Y. Mizukami, M. Ii, J. Sasajima, Y. Sugiyama, T. Nishikawa, et al. 2008. « Sonic hedgehog derived from human pancreatic cancer cells augments angiogenic function of endothelial progenitor cells ». *Cancer Sci* 99 (6) : 1131-38. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00795.x> CAS795 [pii].
- Yan, G. N., L. Yang, Y. F. Lv, Y. Shi, L. L. Shen, X. H. Yao, Q. N. Guo, et al. 2014. « Endothelial cells promote stem-like phenotype of glioma cells through activating the Hedgehog pathway ». *J Pathol* 234 (1) : 11-22. <https://doi.org/10.1002/path.4349>.
- Yang, Hong, Xiaoyan Xiong, Lie Zhang, Chunhui Wu, et Yiyao Liu. 2011. « Adhesion of bio-functionalized ultrasound microbubbles to endothelial cells by targeting to vascular cell adhesion molecule-1 under shear flow ». *International Journal of Nanomedicine* 6 : 2043-51. <https://doi.org/10.2147/IJN.S24808>.
- Yang, Hongbo, Jing Xiang, Nengdong Wang, Yun Zhao, Joel Hyman, Song Li, Jin Jiang, James K. Chen, Zhen Yang, et Shuo Lin. 2009. « Converse conformational control of smoothed activity by structurally related small molecules ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (31) : 20876-84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807648200>.
- Yao, Q., M. A. Renault, C. Chapouly, S. Vandierdonck, I. Belloc, B. Jaspard-Vinassa, J. M. Daniel-Lamaziere, et al. 2014. « Sonic hedgehog mediates a novel pathway of PDGF-BB-dependent vessel maturation ». *Blood* 123 (15) : 2429-37.
- Yao, Qinyu, Marie-Ange Renault, Candice Chapouly, Soizic Vandierdonck, Isabelle Belloc, Béatrice Jaspard-Vinassa, Jean-Marie Daniel-Lamazière, et al. 2014. « Sonic hedgehog mediates a novel pathway of PDGF-BB-dependent vessel maturation ». *Blood* 123 (15) : 2429-37. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-508689>.
- Yauch, Robert L., Gerrit J. P. Dijkgraaf, Bruno Alicke, Thomas Januario, Christina P. Ahn, Thomas Holcomb, Kanan Pujara, et al. 2009. « Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5952) : 572-74. <https://doi.org/10.1126/science.1179386>.
- Yi, Jun, Yan Zhu, Yin Jia, Hongdie Jiang, Xin Zheng, Dejing Liu, Shunxiang Gao, et al. 2016. « The Annexin a2 Promotes Development in Arthritis through Neovascularization by Amplification Hedgehog Pathway ». *PLoS One* 11 (3) : e0150363. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150363>.
- Young, M., A. Paul, J. Rodda, M. Duxson, et P. Sheard. 2000. « Examination of intrafascicular muscle fiber terminations: implications for tension delivery in series-fibered muscles ». *Journal of Morphology* 245 (2) : 130-45. [https://doi.org/10.1002/1097-4687\(200008\)245:2<130::AID-JMOR4>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/1097-4687(200008)245:2<130::AID-JMOR4>3.0.CO;2-R).
- Zeng, Q., B. Wei, Y. Zhao, X. Wang, Q. Fu, H. Liu, et F. Li. 2016. « Shh mediates PDGF-induced contractile-to-synthetic phenotypic modulation in vascular smooth muscle cells through regulation of KLF4 ». *Exp Cell Res* 345 (1) : 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.05.014> S0014-4827(16)30124-0 [pii].
- Zhang, C. 2008. « The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction ». *Basic research in cardiology* 103 (5) : 398-406. <https://doi.org/10.1007/s00395-008-0733-0>.
- Zhao, Hu, Jifan Feng, Kerstin Seidel, Songtao Shi, Ophir Klein, Paul Sharpe, et Yang Chai. 2014. « Secretion of shh by a neurovascular bundle niche supports mesenchymal stem cell homeostasis in the adult mouse incisor ». *Cell Stem Cell* 14 (2) : 160-73. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.013>.
- Zhen, Hong, Lize Zhao, Zhangjun Ling, Li Kuo, Xiarui Xue, et Jiaxiu Feng. 2018. « Wip1 regulates

blood-brain barrier function and neuro-inflammation induced by lipopolysaccharide via the sonic hedgehog signaling pathway ». *Molecular Immunology* 93 (janvier) : 31-37. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.09.020>.

Zhou, M., R. L. Sutliff, R. J. Paul, J. N. Lorenz, J. B. Hoying, C. C. Haudenschild, M. Yin, et al. 1998. « Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone ». *Nature Medicine* 4 (2) : 201-7. <https://doi.org/10.1038/nm0298-201>.

Zhu, H., R. L. Carpenter, W. Han, et H. W. Lo. 2014. « The GLI1 splice variant TGLI1 promotes glioblastoma angiogenesis and growth ». *Cancer Lett* 343 (1) : 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.09.014> S0304-3835(13)00668-X [pii].

Ziegler, Dan, Wolfgang Rathmann, Thorsten Dickhaus, Christa Meisinger, Andreas Mielck, et KORA Study Group. 2008. « Prevalence of polyneuropathy in pre-diabetes and diabetes is associated with abdominal obesity and macroangiopathy: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3 ». *Diabetes Care* 31 (3) : 464-69. <https://doi.org/10.2337/dc07-1796>.

Zinman, Bernard, Christoph Wanner, John M. Lachin, David Fitchett, Erich Bluhmki, Stefan Hantel, Michaela Mattheus, et al. 2015. « Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes ». *The New England Journal of Medicine* 373 (22) : 2117-28. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504720>.

Zochodne, Douglas W. 2002. « Nerve and ganglion blood flow in diabetes: an appraisal ». *International Review of Neurobiology* 50 : 161-202. [https://doi.org/10.1016/s0074-7742\(02\)50077-5](https://doi.org/10.1016/s0074-7742(02)50077-5).

RESUME

ROLE DE LA VOIE HEDGEHOG DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE L'ISCHEMIE CRITIQUE DE MEMBRE INFERIEUR ET LE MAINTIEN DE L'INTEGRITE ENDOTHELIALE

La prévalence du diabète et de l'ischémie critique chronique (ICC) est en constante augmentation. Ces pathologies demeurent incurables et souvent intriquées. Des résultats suggèrent que la signalisation Hedgehog (Hh) participe au maintien de l'intégrité des microvaisseaux, et une régulation négative de Desert Hh (Dhh) est associée aux facteurs de risque cardiovasculaires, tels que l'âge, le diabète et l'obésité.

L'objectif principal de cette thèse était d'explorer les mécanismes physiopathologiques conduisant à l'ICC avec pour hypothèse que la protéine Dhh dérivée de l'endothélium est essentielle au maintien de l'intégrité vasculaire.

Nous avons démontré que Sonic Hh (Shh) endogène ne favorise pas l'angiogenèse post-ischémie et que l'absence de Shh conduit à une inflammation tissulaire ischémique aberrante et à une angiogenèse transitoire accrue. Chez l'homme, l'ICC était associée à des capillaires dysfonctionnels plutôt qu'à une diminution de la densité capillaire et Dhh était exprimé dans les cellules endothéliales (CE). Chez la souris, une carence en Dhh induisait une activation des CE et une fuite capillaire en raison d'une altération des jonctions adhérentes. L'agoniste de la signalisation Dhh améliorait significativement la fonction des CE sans favoriser l'angiogenèse, ce qui améliorait par la suite la perfusion musculaire.

Ainsi, la restauration de la fonction des CE conduit à une récupération significative de la perfusion et de la réparation musculaire dans un contexte d'ICC de membre. La voie Hh, et plus particulièrement Dhh, semble être une cible thérapeutique prometteuse pour prévenir le dysfonctionnement endothélial impliqué dans les pathologies vasculaires ischémiques.

Mots-clés : Signalisation Hedgehog ; vaisseaux ; cellules endothéliales ; Ischémie critique de membre ; Dysfonction endothéliale ; Diabète

ROLE OF THE HEDGEHOG SIGNALLING PATHWAY IN THE PHYSIOPATHOLOGY OF CRITICAL LIMB ISCHEMIA AND THE MAINTENANCE OF ENDOTHELIAL INTEGRITY

The prevalence of diabetes and critical limb ischemia (CLI) is steadily increasing. These pathologies remain incurable and often intertwined. Results suggest that Hedgehog (Hh) signaling is involved in maintaining microvessel integrity, and downregulation of Desert Hh (Dhh) is associated with cardiovascular risk factors, such as age, diabetes, and obesity.

The main objective of this thesis was to explore the pathophysiological mechanisms leading to CLI with the hypothesis that endothelial Dhh is essential for the maintenance of vascular integrity.

We have shown that endogenous Sonic Hh (Shh) does not promote post-ischemic angiogenesis and that the absence of Shh leads to aberrant ischemic tissue inflammation and increased transient angiogenesis. In humans, CLI was associated with dysfunctional capillaries rather than a decrease in capillary density, and Dhh was expressed in endothelial cells (EC). In mice, Dhh knockdown was associated with EC activation and capillary leakage secondary to the alteration of adherent junctions. Dhh's agonist significantly improved EC function without promoting angiogenesis, which subsequently improved muscle perfusion.

Thus, restoration of EC function leads to a significant recovery of perfusion and muscle repair in the context of CLI. The Hh signaling pathway, and more particularly Dhh, appears to be a promising therapeutic target for preventing the endothelial dysfunction involved in ischemic vascular pathologies.

Keywords : Hedgehog signaling ; blood vessels ; endothelial cells ; Critical limb ischemia ; Endothelial dysfunction ; Diabetes

INSERM U1034, « biology of cardiovascular diseases”
1 avenue de Magellan, 33600 Pessac, France