



HAL
open science

La signalisation Hedgehog dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique et la physiopathologie des troubles neurodégénératifs

Pierre-Louis Hollier

► To cite this version:

Pierre-Louis Hollier. La signalisation Hedgehog dans le maintien de la barrière hémato-encéphalique et la physiopathologie des troubles neurodégénératifs. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0223 . tel-03232786

HAL Id: tel-03232786

<https://theses.hal.science/tel-03232786>

Submitted on 22 May 2021

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.

THESE

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bordeaux

Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Ecole doctorale n°154 : Sciences de la Vie et de la Santé

**La signalisation Hedgehog dans le maintien
de la barrière hémato-encéphalique et la
physiopathologie des troubles
neurodégénératifs**

Présentée et soutenue publiquement le 26 Novembre 2020 par

Pierre-Louis HOLLIER

Travail réalisé au sein de l'unité de recherche INSERM U1034
Biologie des maladies cardiovasculaires

Sous la supervision du Dr. Alain-Pierre GADEAU

Membres du Jury :

Mme Muriel LAFFARGUE, Directeur de recherche DR2 INSERM	Rapporteur et président du jury
Mme Elizabeth TRAIFFORT, Directeur de recherche DR2 INSERM	Rapporteur
M. Jérôme EZAN, Chargé de recherche CR INSERM	Examineur
M. Alain-Pierre GADEAU, Directeur de recherche DR2 INSERM	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier le Pr Thierry Couffignal pour m'avoir permis de réaliser ma thèse au sein de l'INSERM U1034, où j'ai pu évoluer et m'épanouir dans un environnement de travail sain.

Je remercie l'équipe Gadeau pour ces trois années, j'ai été ravi de faire partie de cette équipe, je n'aurais pas pu mieux tomber. Je partirai avec beaucoup de bons souvenirs.

A Alain-Pierre Gadeau, mon directeur de thèse : merci de m'avoir accepté comme thésard, de tes conseils avisés et ton aide pendant ces trois ans. Je te remercie aussi pour ces super congrès de la NSFA (tant pis pour 2020), ç'aura été une expérience non seulement constructive mais aussi agréable et amusante !

A Marie-Ange : merci pour toute ton aide pendant ces trois ans (et demi, avec le stage de M2), pour m'avoir supervisé, formé, aidé, pour la patience dont tu as pu faire preuve... et pour avoir su me mettre un peu de pression quand cela s'avérait nécessaire ! C'était un plaisir de travailler avec toi.

A Candice : encore félicitations, même beaucoup plus tard, pour ta titularisation, et merci pour l'expertise que tu as apporté au labo, et toute l'aide que tu as pu m'apporter, et toutes nos discussions.

A tous mes camarades thésards (ou désormais docteurs), Sarah, Pierre, Lauriane, Caroline, Florian, Alice, Pauline, Sébastien, Laura : Merci pour tous les moments, les conseils, les rires, les peines et les drames (ou drama) que nous avons pu partager, la pression que tout cela a permis d'évacuer, et d'une façon générale pour avoir fait une expérience agréable, ou « chic » de ces trois ans.

Je te remercie Annabel, pour tout le travail que tu as réalisé et l'aide que cela m'a apporté dans la réalisation de ces travaux.

Sylvain, Maxime, Christelle, merci pour le travail que vous fournissez tous les jours pour toute l'unité, et pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble.

A tous les membres (ou anciens membres) de l'unité que j'ai côtoyés, Cécile, Pascale, Marie-Lise, Jean-Paul, Etienne, Béatrice, Chloé, Philippe, Olivier, Carole, Omar, Virginie et Virginie, Sylvie et Sylvie, Jérôme, Jérémie Harmonie, Clélia, Ninon, Soizic, pour tous les conseils que nous avons pu échanger et les bons moments passés.

A Carole : merci de m'avoir supporté, dans les deux sens du terme, tous les jours pendant ces trois ans, ton soutien a été essentiel pour tenir bon.

Je remercie ma famille pour tout le soutien qui m'a été apporté depuis toujours et mes parents pour m'avoir permis de faire ces études ; ça y est, le petit dernier devient docteur lui aussi !

Je finirai en remerciant les Dr Muriel Laffargue et Elisabeth Traiffort d'avoir accepté de rapporter mon travail de thèse, et le Dr Jérôme Ezan d'être examinateur de ma thèse.

Liste des abréviations

A β : peptide β -amyloïde
AVC : accident vasculaire cérébral
BHE : barrière hémato-encéphalique
BMEC : *brain microvascular endothelial cell*
CE : cellule endothéliale
Dhh : Desert Hedgehog
DM : démence mixte
DV : démence vasculaire
Hh : Hedgehog
Ihh : Indian Hedgehog
IRM : imagerie par résonance magnétique
LCR : liquide céphalorachidien
LVD : *large vessel disease*
MA : maladie d'Alzheimer
Ptch : Patched
SEP : sclérose en plaques
Smo : Smoothened
SNC : système nerveux central
SVD : *small vessel disease*
UNV : unité neuro-vasculaire
VCD : *vascular cognitive disorder*

Table des matières

Table des matières

Remerciements	3
Liste des abréviations	4
Table des matières	5
I/ Introduction	9
1) Barrière hémato-encéphalique et unité neurovasculaire	9
A) L'unité neuro-vasculaire : les CE	11
a) Le transit paracellulaire	11
1 - Les jonctions serrées.....	12
2 - Les jonctions adhérentes.....	13
b) le transit trans-cellulaire	14
1 - Diffusion passive	14
2 - Diffusion facilitée	14
3 - Transport enzymatique	15
4 - Transcytose.....	16
c) Régulation de la perméabilité de la BHE	16
B) L'unité neuro-vasculaire : les péricytes	18
D) L'unité neuro-vasculaire : la membrane basale	19
E) L'unité neuro-vasculaire : les astrocytes	20
F) L'unité neuro-vasculaire : Les neurones	21
2) Démence	22
A) La démence, généralités	22
B) La maladie d'Alzheimer	22
a) Signes cliniques et diagnostic	22
1 - Symptômes comportementaux et psychologiques	23
2 - Marqueurs physiopathologiques	23
3 - La neuropathie	24
C) Le peptide β -amyloïde, acteur moléculaire de la MA	25
a) Voie non amyloïdogène.....	26
b) Voie amyloïdogène	27
c) Clairance de l'A β	27
D) Les hypothèses de la MA	28
a) L'hypothèse amyloïde	28
b) Facteurs de risque	29
c) L'hypothèse vasculaire	30
E) Interaction entre BHE et pathologie amyloïde	31
a) Dégénérescence péricytaire.....	32
b) Action des astrocytes dans la pathologie amyloïde	32
F) Démence vasculaire, trouble cognitif vasculaire.....	33
a) Critères diagnostic	34
b) Physiopathologie.....	34
1 - Maladie des grands vaisseaux.....	34
2 - Maladie des petits vaisseaux.....	35
G) Démence mixte	39
3) La BHE dans des conditions pathologiques	40
A) Dysfonction endothéliale, généralité	40
a) Dérégulation du tonus vasculaire	40

b) Phénotype pro-inflammatoire	41
c) Phénotype pro-thrombotique	42
d) Rupture de la barrière endothéliale	42
B) Preuves expérimentales d'une dysfonction vasculaire comme facteur initiateur de la démence.....	43
a) Hypoperfusion	43
b) La perméabilité comme origine d'une démence ?	43
C) Dysfonction vasculaire et autres maladies neurodégénératives.....	44
a) BHE et sclérose en plaques	44
1 - Généralités	44
2 – Ouverture de la BHE dans la SEP	44
b) BHE et AVC	45
1 – Généralités	45
2 – Ouverture de la BHE dans l'AVC	45
6) Voie Hedgehog et système vasculaire	46
A) Description des agents de la voie Hedgehog.....	46
a) Généralités.....	46
b) Structure et modifications post-traductionnelles des ligands.....	47
c) Patched.....	48
d) Smoothened.....	48
B) Signalisation	49
a) Voie canonique	50
1 - Les facteurs Gli.....	50
2 - L'inhibition de Smoothened par Patched-1	51
b) Voie non canonique de type I	52
c) Voie non canonique de type II	53
d) Une signalisation autonome indépendante de Ptch-1	53
e) Efficacité respective des ligands	53
C) La voie Hh dans le développement	54
a) Organisation spatiale de l'embryon	55
b) Différenciation, migration, prolifération cellulaires.....	55
c) Développement vasculaire	55
D) La voie Hh et l'angiogenèse chez l'adulte.....	56
a) Angiogenèse ischémique	56
b) Angiogenèse tumorale	57
E) La voie de signalisation Hh et la BHE	57
a) La voie Hh stabilise la BHE	57
b) Hh et pathologie de la BHE	58
c) La voie Hh déstabilise la BHE	59
F) Signalisation Hh dans les CE.....	60
G) Les approches thérapeutiques de la voie Hh.....	60
III/ Raisonnement et Objectif	62
III/ Matériel et méthodes	65
A) Animaux	65
a) Souris C57BL/6J	65
b) Souris Dhh-CEKO ou Cadh5-Cre ^{ER/T2} ; Dhh ^{flox/flox}	65
c) Souris Smo-CEKO ou Cadh5-Cre ^{ER/T2} ; Smo ^{flox/flox}	66
d) Souris APPSwe/PSEN1de9 (APP/PS1)	67
e) Hébergement	67
B) EAE et neuroinflammation comme modèle d'ouverture de la BHE.	67
C) Procédures chirurgicales et manipulations animales invasives.....	68
a) Injection de tamoxifène	68
b) Mesure du flux sanguin cérébral cortical par laser doppler trans-crânial.....	68

c) Test de néovascularisation cornéenne	68
1 - Préparation des pellets	68
2 - Procédure chirurgicale	69
d) Micro-injection stéréotaxique	69
e) Encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)	71
D) Test de comportement : test d'alternance spontanée	71
a) Habituation	71
b) Alternance spontanée	71
E) Culture cellulaire	72
a) Brain Microvascular Endothelial Cells (BMEC) : isolement et culture	72
F) Test de migration cellulaire	73
G) Analyses statistiques	73
H) Matériel supplémentaire	74
Manuscrits - Article I :	75
Manuscrits - Article II :	103
IV/ Résultats & interprétation	134
1) Dhh endothélial participe au maintien de la BHE	134
A) Dhh endothélial est nécessaire au maintien de la BHE	134
B) Dhh endothélial agit sous sa forme full-length	135
C) Les souris Dhh-CEKO développent, à long terme, des troubles cognitifs	135
a) L'ouverture de la BHE persiste jusqu'à 1 an chez les souris Dhh-CEKO	136
b) La délétion de Dhh n'affecte pas la perfusion du cerveau ni la couverture péricytaire des CE	137
c) Une activation astrocytaire plus importante est retrouvée dans le cortex des souris Dhh-CEKO	139
d) Une activation microgliale modérée existe chez les souris Dhh-CEKO à 1 an	140
e) Les souris Dhh-CEKO présentent des signes de troubles cognitifs à partir de 8 mois	140
f) Les souris Dhh-CEKO présentent des signes de mort neuronale	142
D) Conclusion	143
2) Les ligands Hh participent à l'ouverture de la BHE dans les pathologies neurodégénératives	143
A) L'expression des ligands Hh est modulée dans l'UNV dans les pathologies neurodégénératives	143
a) La pathologie amyloïde réprime l'expression endothéliale de Dhh	143
b) L'expression des Ligands Hh est modulée dans l'UNV dans la SEP	144
B) Impact de la délétion de Dhh dans la pathologie de la MA	145
a) La délétion endothéliale de Dhh accélère l'apparition de troubles cognitifs dans la MA	145
b) La déposition de peptide β -amyloïde n'est pas affectée à 1 an par la délétion de Dhh dans les CE	147
c) L'activation astrocytaire est similaire entre les groupes APPD-Ctrl et APPD-KO à 1 an	148
d) Conclusion	148
C) Shh astrocytaire déstabilise la BHE dans la neuroinflammation	149
3) N-Shh inhibe Dhh endothélial et déstabilise la BHE	150
A) N-Shh déstabilise la BHE <i>in vivo</i>	150
B) N-Shh recombinant déstabilise l'intégrité jonctionnelle endothéliale <i>in vitro</i>	150
C) N-Shh et FL-Dhh sont en compétition pour leur récepteur Ptc	151
D) Conclusion	151

<u>VI/ Conclusion, Perspectives.....</u>	<u>152</u>
1) Effet des ligands Hh sur la BHE	152
2) Signalisation Hh et CE.....	152
3) Ouverture de la BHE et démence	153
4) Perspectives thérapeutiques	154
<u>VI/ Bibliographie</u>	<u>155</u>
<u>Résumé.....</u>	<u>168</u>

I/ Introduction

1) Barrière hémato-encéphalique et unité neurovasculaire

La barrière hémato-encéphalique (BHE) existe au niveau des vaisseaux cérébraux et participe au maintien de l'homéostasie du système nerveux central en contrôlant les échanges de solutés et de cellules entre le compartiment sanguin et le parenchyme cérébral.

La notion de BHE est née suite aux travaux de Paul Erlich et Edwin Goldmann. Le premier constata qu'après injection d'un colorant dans le péritoine d'une souris, tous les organes sont colorés à l'exception du cerveau. S'il en déduit un manque d'affinité du colorant pour le tissu cérébral, Edwin Goldmann constatera plus tard que le bleu Trypan, administré par voie intraveineuse, ne colore pas le cerveau non plus, mais que son injection dans le liquide céphalo-rachidien provoque la coloration du cerveau mais d'aucun autre organe (Goldmann, 1913). Ces expériences prouvèrent l'existence d'une barrière limitant le passage de molécules du sang au parenchyme cérébral.

Il existe différents compartiments liquidiens cérébraux et différentes barrières séparant ces compartiments. On distingue en effet 4 compartiments liquidiens qui sont :

- Le sang
- Le liquide céphalo-rachidien (LCR)
- Le liquide interstitiel
- Le milieu intracellulaire

Les barrières qui existent pour séparer ces compartiments sont

- La barrière hémato-méningée, séparant le sang du liquide cérébro-spinal située au niveau de l'épithélium des plexus choroïdiens.
- La barrière méningo-encéphalique, moins sélective, séparant le LCR du parenchyme cérébral, et constituée de l'épithélium arachnoïde.
- La BHE, séparant le sang du parenchyme cérébral et formée par les cellules endothéliales (CE).

Cette dernière est la plus importante en termes de surface.

Si seules les CE ont été initialement identifiées comme formant la BHE, sa compréhension a gagné en complexité quand l'importance d'autres types cellulaires dans sa fonction a été découverte. En effet, les CE, cellules périvasculaires et cellules du parenchyme interagissent et forment une unité fonctionnelle baptisée unité neuro-vasculaire (UNV) (ou glio-vasculaire, ou neuro-glio-vasculaire). Elle comprend les CE, les péricytes, la matrice périvasculaire, les astrocytes et des neurones (Figure 1, (Gorelick Philip B. et al., 2017)) .

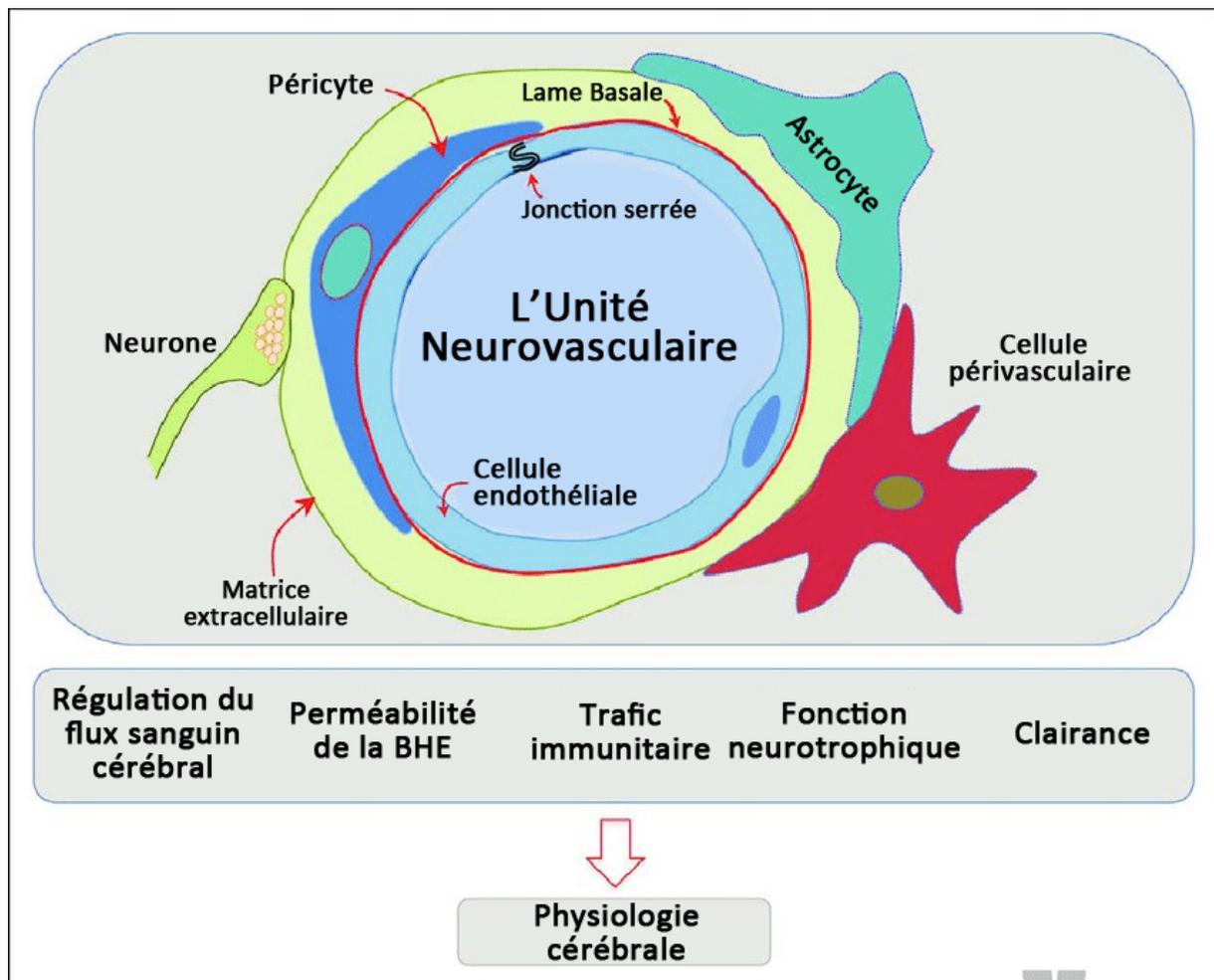


Figure 1 : L'unité neurovasculaire, d'après (Gorelick et al., 2017).

A) L'unité neuro-vasculaire : les CE

Les CE tapissent la face interne des vaisseaux sanguins et forment une barrière plus ou moins sélective entre le sang et les tissus dans l'ensemble de l'organisme. Cette barrière permet une régulation fine du transit transendothélial aussi bien des nutriments et de l'oxygène vers le parenchyme que des déchets tissulaires vers le compartiment sanguin. Les CE ont également un rôle important dans l'inhibition de la thrombose hors contexte pathologique.

Les CE ont cependant des propriétés particulières au niveau du cerveau. La BHE est en effet plus restrictive que la barrière endothéliale dans les autres organes, comme évoqué précédemment. Les capillaires cérébraux sont caractérisés par une absence de fenestration (capillaires continus) (Fenstermacher et al., 1988). Les CE microvasculaires cérébrales (BMEC) se distinguent d'autres types de CE par leur richesse en jonctions serrées (Reese and Karnovsky, 1967), nécessaires au contrôle du passage des cellules et des solutés plasmatiques entre les cellules, et leur richesse en mitochondries (Oldendorf et al., 1977) qui soutiennent une activité métabolique importante. Le transit transcellulaire semble également finement régulé, et la densité de vésicules endocytotiques et pinocytotiques est réduite. Le contrôle de ces transports sang-cerveau est également soutenu par une polarisation apico-basale : les membranes plasmiques luminale et abluminale présentent des compositions enzymatiques distinctes régulant le transit transendothélial (Betz and Goldstein, 1978).

a) Le transit paracellulaire

Le transit paracellulaire, c'est-à-dire la diffusion passive de solutés à travers l'espace liquidien intercellulaire, dépend des jonctions inter-cellules endothéliales, qui forment des ceintures d'étanchéité entre les CE. La disposition des jonctions est polarisée dans les CE : les jonctions serrées sont concentrées du côté luminal ou apical, et les jonctions adhérentes du côté abluminal ou baso-latéral. En plus du transit paracellulaire, elles limitent également la diffusion des lipides et protéines dans la membrane plasmique et maintiennent l'asymétrie membranaire des CE. Elles interviennent aussi dans la communication intracellulaire par leur connexion au cytosquelette (Figure 2).

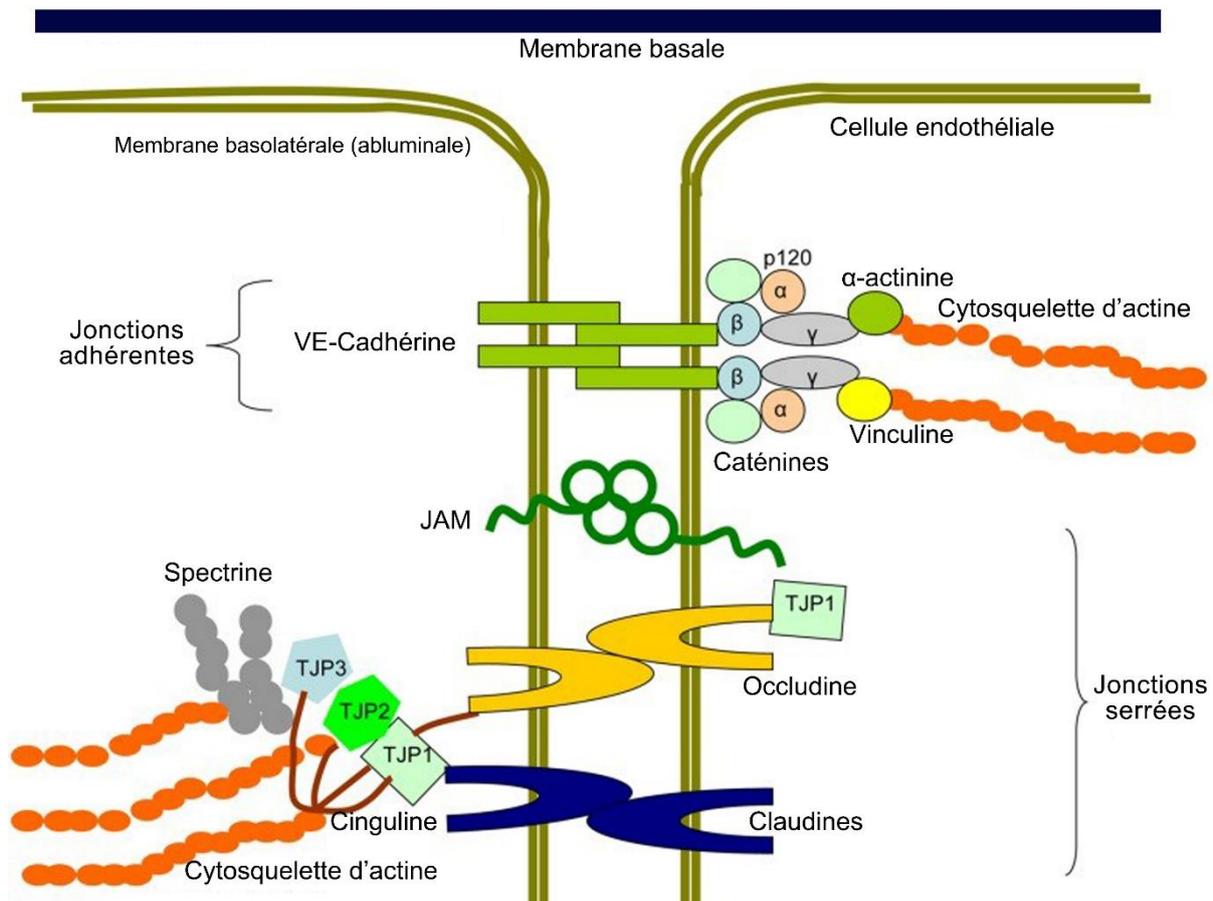


Figure 2 : Structure protéique des jonctions intercellulaires endothéliales, d'après (Chistiakov et al., 2015).

1 - Les jonctions serrées

Les jonctions serrées sont des complexes protéiques composés de protéines membranaires et cytosoliques. On retrouve parmi les protéines membranaires les claudines, l'occludine et les JAM (jonction adhesion molecule). Les protéines cytoplasmiques que sont les Zonula Occludens-1 à 3 (ZO-1,2,3 ou tight junction protein-1,2,3) relient l'extrémité cytoplasmique des protéines membranaires au cytosquelette d'actine (Furuse, 2010).

Les claudines sont une famille de 24 protéines de 21 à 24 kDa. Elles possèdent 4 domaines transmembranaires et une queue carboxy-terminale cytoplasmique capable de lier les protéines ZO. Les claudines forment des jonctions d'une cellule à

l'autre, et sont organisées en bandes qui assurent l'étanchéité entre deux cellules. Parmi les différentes claudines, certaines sont exprimées dans de très nombreux types cellulaires, tandis que d'autres sont spécifiques à certaines cellules. Les CE expriment les claudines 1, 5, 12 et 15. Les claudines 1 et 5 sont les plus importantes dans la régulation de la taille des éléments pouvant passer la BHE. La claudin-5 est spécifique aux cellules endothéliales et est celle qui est majoritairement exprimée (Chistiakov et al., 2015).

L'occludine fut la première protéine membranaire identifiées parmi les protéines de jonctions serrées. D'environ 65 kDa, elle possède également 4 domaines transmembranaires mais ne possède aucune homologie avec les claudines (Furuse, 2010). La queue carboxy-terminale, en plus du site de liaison aux ZO, possède de multiples résidus sérine et thréonine, et le degré de leur phosphorylation influe sur la position de l'occludine : les molécules les plus phosphorylées sont localisées au niveau des jonctions serrées (Sakakibara et al., 1997).

Les JAM-A,B,C appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, et à la sous-famille des Cortical thymocyte marker of *Xenopus* (CTX). Ils possèdent deux domaines immunoglobuliniques, et un seul domaine transmembranaire (Ebnet, 2017). Dans les CE, JAM-A et ZO-1 agissent chacun sur la localisation jonctionnelle de l'autre et sont donc impliqués dans la mise en place des jonctions serrées. JAM-C en outre possède un rôle de régulation de la barrière endothéliale en modulant l'interaction homotypique de la VE-cadhérine (Orlova et al., 2006).

2 - Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont plutôt localisées au niveau basal/abluminal des espaces inter-endothéliaux et forment une ceinture d'adhésion autour de la cellule. La VE-cadhérine (Vascular endothelium cadherin, Cadherin 5, Cdh5) est la protéine membranaire de jonctions adhérentes majoritaires des CE, et spécifique à l'endothélium. Les caténines constituent l'autre type de protéines intervenant dans les jonctions adhérentes et permettant la connexion au cytosquelette d'actine. En plus de son rôle de jonction et dans l'imperméabilité intercellulaire, la VE-cadhérine est un élément régulateur de certaines fonctions cellulaires comme la migration cellulaire ou l'inhibition de contact (Cardoso et al., 2010). Elle fait aussi partie d'un

complexe protéique intervenant dans la réponse des CE au flux (Conway and Schwartz, 2014).

b) le transit trans-cellulaire

Le transit des molécules entre le sang et le parenchyme ne se limite pas à la voie paracellulaire, puisque de nombreux éléments traversent les CE elles-mêmes pour gagner le parenchyme cérébral.

1 - Diffusion passive

On distingue diffusion passive et diffusion facilitée. La diffusion passive concerne les molécules qui peuvent librement passer la BHE en fonction de leur gradient de concentration. Les molécules concernées sont les molécules lipophiles ainsi que les molécules de taille suffisamment petite (comme le dioxygène). Si les substances lipophiles peuvent traverser la BHE de façon passive, la plupart sont recapturées par les pompes vers le sang.

2 - Diffusion facilitée

La diffusion facilitée désigne le passage de molécule à travers des structures spécialisées (transporteurs, canaux) mais dont le transport ne nécessite pas de substrat énergétique. Ce transport se fait en fonction du gradient électrochimique. C'est par cette voie que les nutriments apportés par le sang accèdent au parenchyme cérébral. Sont en effet concernés les acides aminés, le glucose, les acides carboxyliques métaboliques (lactate, pyruvate) ou encore les vitamines.

Le transporteur GLUT-1 (transporteur de glucose de classe I) revêt une importance particulière : le glucose est la source principale d'énergie du cerveau qui ne possède pas de réserve et en consomme une part importante. C'est le transporteur de glucose majoritaire au niveau de la BHE, exprimé uniquement par les cellules endothéliales et les érythrocytes (Uldry and Thorens, 2004). Il peut aussi transporter le mannose.

Il existe différents types de transporteurs des acides aminés, en fonction de leur nature (acide aminé neutre, cationique, acide), et du mode de fonctionnement du transporteur. En effet, sur la face luminale de l'endothélium, les transporteurs sont passifs et les molécules passent uniquement en fonction de leur gradient. En revanche, sur la face abluminale, les transporteurs sont des échangeurs qui utilisent le gradient sodique pour faire passer les acides aminés (Hawkins et al., 2006).

Il existe enfin des transporteurs et canaux ioniques dont la nature diffère entre les faces luminale et abluminale de l'endothélium. On retrouve des échangeurs ioniques comme l'échangeur Na^+/H^+ , qui joue également un rôle dans la régulation du pH, mais aussi un transporteur énergétique qu'est la pompe Na^+/K^+ ATPase. Cette dernière, située sur la face basale des CE, permet de garder un gradient sodique, utile d'une part pour le fonctionnement d'échangeurs d'acides aminés, mais aussi pour réguler finement la concentration potassique dans le parenchyme cérébral, qui module les influx nerveux.

3 - Transport enzymatique

Il existe plusieurs familles de transporteurs qui contribuent à l'efflux de nombreuses molécules et permettent notamment d'éliminer ou d'empêcher l'entrée dans le parenchyme d'éléments potentiellement toxiques. La plus importante de ces familles est celle des transporteurs ABC (ATP-binding cassette).

Les transporteurs ABC comptent 7 sous-familles (ABCA à ABCG) classées en fonction de leurs domaines et homologies. Ils utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des molécules contre leur gradient électrochimique. Les domaines transmembranaires de ces transporteurs assurent la sélectivité de la molécule transportée (Vasiliou et al., 2009). Les molécules transportées sont de natures variables, elles peuvent être des sucres, des hormones, des ions mais aussi des substances potentiellement toxiques comme les métaux lourds ou les médicaments. Ces transporteurs participent à la difficulté à atteindre le SNC pour certaines molécules thérapeutiques. Plusieurs transporteurs ABC appartenant à différentes classes sont trouvés au niveau de la BHE.

Le transporteur ABC le plus étudié au niveau de la BHE est la protéine P-gp de type I ou MDR1 (multiple drug resistance-1). C'est un membre de la sous-famille ABCB

codé par le gène *ABCB1*. Il s'agit d'un transporteur d'efflux qui est en partie responsable de la résistance aux médicaments. Sa mise en place est notamment dépendante de l'environnement puisqu'*in vitro*, il est nécessaire aux CE d'être co-cultivées avec des cellules gliales afin qu'elles expriment MDR1 (Berezowski et al., 2004). Cette protéine est aussi exprimée dans une moindre mesure par les péricytes et les astrocytes.

4 - Transcytose

La transcytose désigne un mode de transport à travers les cellules endothéliales, mettant en jeu la formation de vésicules d'endocytose puis son transport jusqu'à la membrane opposée où a lieu l'exocytose. Ce mode de transport permet aux macromolécules de traverser la BHE.

Différents modes de transcytose existent au niveau de la BHE. L'un de ces modes est la transcytose dépendante de récepteurs : la liaison du ligand au récepteur provoque l'internalisation endocytotique du complexe ligand-récepteur. Un autre mode, la transcytose par adsorption, concerne des molécules cationiques, capable de s'adsorber au glycocalix endothélial, chargé négativement. Par conséquent, ce type de transport n'est pas spécifique, par opposition à la transcytose dépendante de récepteurs. Il existe aussi des modes de transcytose dépendant des puits couverts de clathrine et des cavéoles (Preston et al., 2014).

c) Régulation de la perméabilité de la BHE

La BHE n'est pas une structure statique mais dynamique susceptible d'être modulée rapidement et avec précision. Des mécanismes de régulations peuvent donc affecter l'expression et l'organisation des protéines de jonctions endothéliales, ou encore les processus de transport transendothélial.

De nombreuses voies de signalisation participent à la régulation de l'intégrité de la BHE. La voie Wnt a été largement étudiée pour son rôle sur la BHE. Elle est indispensable à l'angiogenèse embryonnaire du SNC participe à la mise en place initiale de la BHE dans l'embryon de souris, et induit des caractéristiques de BHE sur des CE *in vitro* (Liebner et al., 2008). Des souris déficientes pour *Wnt7b* meurent

durant le développement à la suite d'importants saignements cérébraux (Daneman et al., 2009). La perte du récepteur Frizzled-4 dans les CE augmente la perméabilité vasculaire cérébrale de l'embryon de souris (Ye et al., 2009). La délétion d'autres agonistes de la voie Wnt tels que la Norrin ou Grp124 entraînent également des défauts de la BHE (Wang et al., 2012; Zhou and Nathans, 2014). La β -caténine est au cœur de la signalisation canonique Wnt : l'activation des récepteurs Frizzled (Fzd) inhibe la kinase GSK-3 β et prévient la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine et donc son accumulation dans le cytoplasme, lui permettant d'être transloquée au noyau et d'activer des cibles transcriptionnelles avec les facteurs TCF/LEF. Chez la souris adulte, l'élimination de la β -caténine dans les CE provoque une déstabilisation de la BHE, avec une réduction d'expression de la claudin-1, et une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans le cerveau (Tran et al., 2016). La VE-cadhérine interagit avec β -caténine, la retient à la membrane plasmique, et prévient ainsi la répression de l'expression de la claudin-5 par le couple FoxO1/ β -caténine. Ce mécanisme réprime la phosphorylation de FoxO1. La voie Wnt pourrait réprimer l'activité de FoxO1 par compétition en associant la β -caténine à TCF (Gavard and Gutkind, 2008).

La voie de signalisation Hedgehog (Hh) est également connue pour réguler la BHE : la délétion de Sonic Hedgehog (Shh), par ailleurs létale, empêche la formation de la BHE chez l'embryon de souris. L'utilisation d'un antagoniste de la voie de signalisation Hh chez l'adulte provoque également une perturbation de la BHE (Alvarez et al., 2011). Le rôle de la voie Hh en particulier sera développé dans une autre partie.

Différentes formes de PKC (Protein Kinase C) sont connues pour réguler l'ouverture de la BHE. Par exemple, une part de l'effet inhibiteur de la thrombine sur les jonctions adhérentes passe par les PKC, qui modifient l'état de phosphorylation de protéines telles que la VE-cadhérine ou p120 (Konstantoulaki et al., 2003). La VE-cadhérine possède différents sites de phosphorylation. La phosphorylation de certains résidus est connue pour réduire l'adhésion des CE entre elles (Andriopoulou et al., 1999; Esser et al., 1998) et provoquer l'endocytose du complexe protéique dont fait partie la VE-cadhérine (Gavard and Gutkind, 2006).

La réception de certains stimuli passe par l'activation de tyrosine kinase (TK) ou de récepteur à activité tyrosine kinase (RTK). A titre d'exemple, l'un des récepteurs au

VEGF, flt-1 (ou VEGFR1) est un RTK, dont l'action va ensuite passer par les voies phosphatidylinositol 3-phosphate/Akt (PI3K/Akt), Nitric Oxyde Synthase (NOS) ou de la protéine kinase G (PKG) et amène à l'augmentation de la perméabilité vasculaire cérébrale et à l'œdème (Vogel et al., 2007).

Le rôle de l'autophagie a aussi été exploré *in vitro*. Dans un modèle d'hypoperfusion, la potentialisation de l'autophagie réduit la perméabilité vasculaire. Ce modèle a été transposé *in vitro* par déprivation en oxygène et glucose puis réoxygénation de cellules endothéliales cérébrales. La stimulation de l'autophagie dans ce contexte atténue la réduction d'expression de ZO-1 (Li et al., 2014). Une autre étude rapporte cependant que l'inhibition de l'autophagie dans un modèle de déprivation en oxygène et glucose de cellules endothéliales cérébrales réduit la dégradation de l'occludine, un résultat similaire étant retrouvé dans un modèle d'accident vasculaire cérébral (AVC) *in vivo* (Kim et al., 2020). Les deux modèles diffèrent, et il semble que le rôle de l'autophagie dans le maintien de la BHE dépend de l'état d'oxygénation et de l'apport local en nutriments, et s'inscrit donc dans un mécanisme complexe de régulation de la BHE.

B) L'unité neuro-vasculaire : les péricytes

Les péricytes sont des cellules murales qui recouvrent la surface basale de l'endothélium et partagent la membrane basale des CE. Les capillaires cérébraux ont un taux de couverture important avec un ratio variant d'entre une et trois CE pour un péricyte. Les péricytes cérébraux ont par ailleurs la particularité de dériver des crêtes neurales et non pas du mésoderme. Le recrutement des péricytes autour des vaisseaux est dépendant d'une signalisation PDGF-b/PDGFR-b (platelet-derived growth factor beta et son récepteur). Ils sont impliqués dans la régulation de la vasoconstriction, l'angiogenèse, le dépôt de matrice extracellulaire, l'infiltration immunitaire (Armulik et al., 2011).

En effet les péricytes jouent un rôle central dans la régulation du flux sanguin au niveau des petits vaisseaux : ils possèdent des propriétés contractiles leur permettant de modifier le calibre des capillaires et donc le flux sanguin local.

De plus, ils assurent un rôle de soutien important pour l'intégrité vasculaire. Des souris mutées de façon hétérozygote pour la voie PDGF-b/PDGFR-b présentent des anomalies de morphologie des capillaires, avec notamment une augmentation du diamètre vasculaire et une distribution différentes des protéines de jonctions inter-endothéliales (Hellström et al., 2001). Il en résulte également une perméabilité vasculaire accrue. De même il a été montré qu'ils participent à l'intégrité de la BHE, et une réduction de la couverture péricytaire a pour conséquence une désorganisation de l'aquaporine-4 qui, normalement concentrée au niveau des pieds astrocytaires, devient localisée sur le reste de la surface de l'astrocyte, ce qui indique un autre niveau d'interaction entre éléments de l'UNV (Armulik et al., 2010).

Une étude menée sur des souris présentant une déficience péricytaire non létale indique l'importance des péricytes dans le maintien de la BHE. Ces souris présentent une réduction de la couverture des vaisseaux par les péricytes, associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Notamment, les traceurs de la perméabilité utilisés sont retrouvés accumulés à l'intérieur des CE et à la lame basale vasculaire, mais pas au niveau des jonctions inter-CE. Ceci indique qu'en absence des péricytes, l'augmentation de la perméabilité de la BHE est en partie liée à une augmentation du transport transcytotique (Armulik et al., 2010).

D) L'unité neuro-vasculaire : la membrane basale

La membrane basale sert de support mécanique d'ancrage aux CE et aux péricytes, et permet une connexion avec les autres types cellulaires environnants. Elle est produite par les CE, les péricytes et les astrocytes, et est composée de 3 couches ou laminae dont la composition diffère. Ce sont différents types de protéines de la MEC qui la composent (Cardoso et al., 2010):

- Protéines structurales : collagènes, élastine
- Protéines spécialisées : fibronectine, laminine
- Protéoglycans : entactine, perlécan
- Récepteurs d'adhésion aux cellules (cell adhesion molecules – CAM)

L'intégrité de la membrane basale et l'adhésion des CE à celle-ci est nécessaire au maintien de la BHE. La dégradation de la MEC par des métalloprotéases matricielles

réduit l'ancrage des CE à la MEC et a pour conséquence la déstabilisation de l'intégrité des jonctions serrées (Carvey et al., 2009).

E) L'unité neuro-vasculaire : les astrocytes

Les astrocytes sont des cellules gliales dont les prolongements cytoplasmiques recouvrent la quasi-totalité de la surface vasculaire cérébrale et forment donc un manchon autour des vaisseaux sanguins et capillaires cérébraux. On qualifie ces prolongements de pieds astrocytaires, et ils se caractérisent entre autres par l'expression de protéines permettant l'adhésion du cytosquelette à la membrane basale ainsi que de l'aquaporine-4. Les astrocytes sécrètent des éléments solubles permettant aux CE d'acquérir des propriétés de la BHE (Neuhaus et al., 1991). Par ailleurs, mis à part au niveau des capillaires, les astrocytes délimitent un espace liquidien périvasculaire, ou espace de virchow-robin, en continuité avec le compartiment cérébrospinal. Ils peuvent former une barrière, la *glia limitans*, qui, bien que peu restrictive en conditions physiologiques, sépare l'espace périvasculaire du parenchyme cérébral. Ils peuvent en effet exprimer les claudines 1 et 4 mais ces protéines sont principalement exprimées dans un contexte neuro-inflammatoire, vraisemblablement en réaction à l'ouverture de la BHE (Horng et al., 2017). Les astrocytes sont également capables de réguler l'état de contraction des vaisseaux sanguins cérébraux (Gordon et al., 2011) notamment en réponse à l'activité neuronale environnante afin d'adapter le débit sanguin et l'apport en nutriment, on parle de couplage neuro-vasculaire. Ils participent aussi au transit liquidien entre le comportement interstitiel et les espaces périvasculaires, en particulier grâce à l'aquaporine-4 (AQP4). Celle-ci est exprimée au niveau des pieds astrocytaires, et le mouvement d'eau est régi par les conditions osmotiques environnantes (Wolburg et al., 2011).

Les astrocytes sécrètent différents facteurs qui régulent l'intégrité de la BHE. Ils sécrètent la protéine Shh, et cette voie de signalisation joue un rôle dans la mise en place initiale de la BHE ainsi que dans son maintien (Alvarez et al., 2011; Azzi et al., 2015). L'effet de la voie Hh sur la BHE sera développé plus loin. Les astrocytes produisent du VEGF, qui est un stimulateur majeur de l'angiogenèse, mais qui déstabilise également la barrière endothéliale, notamment dans des conditions

inflammatoires. Un autre facteur sécrété par les astrocytes est l'enzyme de conversion ACE-1 (angiotensin converting enzyme-1), qui convertit l'angiotensine I en angiotensine II, qui active les récepteurs AT1 endothéliaux. Ceci module l'état de phosphorylation de l'occludine et stabilise les jonctions serrées et donc la BHE (Wosik et al., 2007).

Les astrocytes jouent par ailleurs un rôle crucial dans la protection du SNC. Ils sont en effet « activés » par les lésions du SNC (hypoxie, inflammation...), ce qui se traduit par un ensemble de changements moléculaires, cellulaires et fonctionnels (on parle aussi d'astrocytes réactifs). Ce phénomène est l'activation astrocytaire ou astrogliose. L'astrocyte peut être activé par des substances neurotoxiques, par l'hypoxie, par des lésions neuronales. Selon la nature de l'affection, la réponse de l'astrocyte diffère et évolue avec le temps. Ce phénomène est d'autant plus complexe que le rôle de l'astrocyte est versatile, par exemple dans le cas de l'hypoxie. Il a été montré que dans l'hypoxie, les astrocytes sécrètent du VEGF, qui est un facteur neuroprotecteur mais responsable d'une ouverture de la BHE et participe à l'œdème cérébral. Ils vont participer à la neuroprotection par production d'érythropoïétine, mais aussi produire des facteurs tels que le monoxyde d'azote qui est neurotoxique (Vangeison and Rempe, 2009). Selon leur état ils vont également participer à l'installation ou à la résolution de l'inflammation. Un outil généralement utilisé pour l'identification des astrocytes activés est la protéine GFAP (glial fibrillary acidic protein), dont l'expression est fortement augmentée dans les astrocytes activés.

F) L'unité neuro-vasculaire : Les neurones

Le rôle des neurones dans la BHE a été moins exploré. Ils interviennent vraisemblablement dans sa mise en place précoce. En effet, chez l'embryon, les jonctions serrées se mettent en place plusieurs jours avant la gliogenèse. Il a été proposé qu'avant la mise en place des astrocytes et des neurones, des cellules progénitrices des neurones induisent la mise en place des jonctions serrées endothéliales. Cette hypothèse est soutenue par un certain nombre de données. Il a par exemple été montré que des CE microvasculaires primaires de rat ont une perméabilité réduite et une résistance transendothéliale plus importante si elles sont

cultivées en présence de progéniteurs neuronaux, ce qui indique leur capacité à induire les propriétés de la BHE (Weidenfeller et al., 2007). Ils participent vraisemblablement directement au couplage neurovasculaire et la régulation de la BHE, par des terminaisons nerveuses qu'ils émettent au niveau des CE et des pieds astrocytaires.

2) Démence

A) La démence, généralités

La démence est un syndrome, généralement chronique, dans lequel on observe une altération de la fonction cognitive plus intense que celle qu'on pourrait attendre avec un vieillissement normal. Elle affecte la mémoire, le raisonnement, l'orientation, la compréhension, le calcul, l'orientation, l'apprentissage, le langage et le jugement. Elle touche essentiellement les personnes âgées, mais des patients sont touchés avant 65 ans. La démence peut être liée à un certain nombre de pathologies cérébrales, les deux pathologies majoritaires étant la maladie d'Alzheimer (MA) et la démence vasculaire (DV). Il a été estimé en 2015 que 46,8 millions de personnes sont atteintes de démence dans le monde, et ce nombre a été estimé à 131,5 millions pour l'année 2050. (Prince, 2015).

B) La maladie d'Alzheimer

a) Signes cliniques et diagnostic

La première description de la maladie est faite en 1901 chez une patiente de 51 ans, Auguste Deter, examinée par le Dr. Aloïs Alzheimer. En raison de troubles de la mémoire et du langage et d'hallucinations, Aloïs Alzheimer diagnostique une démence présénile. Après le décès de la patiente quelques années plus tard, le médecin observe d'abord une atrophie cérébrale à l'autopsie, puis la présence de deux dépôts anormaux : des plaques amyloïdes à l'extérieur des neurones et des dégénérescences neurofibrillaires à l'intérieur. Si ces dépôts ne sont pas inconnus à

l'époque, ils sont toutefois anormaux chez une personne de cet âge. Le nom de Maladie d'Alzheimer sera proposé quelques années plus tard et un intérêt croissant se développera pour la maladie.

1 - Symptômes comportementaux et psychologiques

Le diagnostic d'un trouble neuropsychologique, avant de faire une distinction entre les différents types de pathologies pouvant l'expliquer, se fera par une l'évaluation des facultés cognitives d'un individu et le constat d'un déclin par rapport à un état précédent. On retrouve parmi ces troubles :

- Perte de mémoire à court ou long terme ;
- Difficulté ou défaut de raisonnement (résolution de problème, évaluation d'un risque, prise de décision, planification ;
- Désorientation ;
- Déficit visuo-spatial (difficulté à reconnaître visages et objets) ;
- Difficulté à l'expression orale ou écrite ;
- Changement d'humeur ou de personnalité, apathie.

2 - Marqueurs physiopathologiques

Jusqu'en 2007, outre le diagnostic clinique des troubles cognitifs, seul un examen *post mortem* permettait de diagnostiquer avec certitude la maladie d'Alzheimer. Des chercheurs et cliniciens proposèrent ensuite d'intégrer à la démarche diagnostique l'étude de biomarqueurs identifiés chez les patients atteints de la MA (Dubois et al., 2007). L'imagerie par résonance magnétique (IRM) sera utilisée pour évaluer certains marqueurs comme l'atrophie du lobe temporal médial qui est plus fréquente dans un contexte de démence que dans le cas d'un vieillissement normal. L'analyse du LCR permet également de supporter la démarche diagnostique (Fagan et al., 2007) : il a été en effet rapporté qu'on retrouve des taux plus élevés du peptide β -amyloïde ($A\beta$), ainsi que des protéines Tau totale et phosphorylée par rapport aux sujets sains. A l'inverse, les variations de ces taux sont différentes pour d'autres types de démences. Par exemple, la concentration d'une forme de l' $A\beta$, l' $A\beta_{1-42}$ est réduite chez les patients atteints de DV. La combinaison de ces différents marqueurs permet un diagnostic efficace de la pathologie.

3 - La neuropathie

La neuropathie de la MA contient un certain nombre de lésions cérébrales. Les deux lésions les plus caractéristiques de la MA sont les plaques séniles et les enchevêtrements neurofibrillaires. On retrouve également la perte neuronale et une altération morphologique du cerveau.

i. Plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes (ou plaques séniles) désignent un spectre de lésions sphériques contenant des peptides amyloïdes extracellulaires (Dickson, 1997). La forme de peptide amyloïde la plus commune dans le cerveau est l'A β , un peptide de 4 kDa. Selon la présence et la morphologie des peptides amyloïdes, ainsi que la présence et la nature d'éléments neuraux, une classification des plaques séniles a été établie. La nature des composants de ces plaques est un autre facteur permettant de discriminer entre vieillissement normal et MA, on prête notamment attention au ratio des différentes formes de peptide β -amyloïde (voir section I/2C)) dans ces plaques et à la présence de cellules telles que les astrocytes. Ces plaques ont un effet neurotoxique, elles contiennent des axones et dendrites en dégénérescence, qui présentent une morphologie anormale en histologie. Il existe également une association importante de la microglie avec l'A β des plaques. Cette microglie est activée par le peptide amyloïde de la plaque et va mettre en jeu une réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines telles qu'IL-1 β , TNF α , IL-6 (Interleukine 1 beta, Tumor necrosis factor alpha, interleukine 6). Les astrocytes aussi présentent une activation importante dans le cortex cérébral en étroite association avec les plaques amyloïdes. Eux aussi participent à la réponse inflammatoire.

En plus des plaques amyloïdes, l'angiopathie amyloïde cérébrale, décrite plus loin, est également présente dans la MA.

ii. Enchevêtrements neurofibrillaires

Les enchevêtrements neurofibrillaires (ou dégénérescence neurofibrillaire) sont des lésions neuronales cytoplasmiques, donc intracellulaires. Ils consistent en des amas non membranaires de filaments appariés en hélice (paired, helically wound filaments - PHF). Ces enchevêtrements sont très présents dans le cerveau atteint de MA. La protéine au cœur de la formation des PHF est une protéine associée aux microtubules : Tau. L'agrégation de cette protéine insoluble et hyperphosphorylée aboutit à la formation des PHF. Ces lésions sont surtout présentes dans le cortex entorhinal, l'hippocampe, l'amygdale et les zones corticales associées des lobes frontaux, pariétaux, temporaux. La dégénérescence neurofibrillaire n'est pas spécifique de la MA et est retrouvée dans d'autres types de troubles neurodégénératifs.

iii. Perte neuronale et atrophie cérébrale

Les patients atteints de MA présentent une atrophie importante du cerveau. L'organe perd en effet environ un tiers de sa masse. Cette atrophie est due à une perte neuronale massive, qui aboutit à un élargissement des ventricules et des sillons du cortex. Les zones les plus touchées sont celles associées à la mémoire et au langage. La cause principale de cette perte neuronale est toujours controversée, quant à la responsabilité de l'A β neurotoxique ou de la dégénérescence neurofibrillaire.

C) Le peptide β -amyloïde, acteur moléculaire de la MA

Nous avons évoqué les plaques amyloïdes qui sont au cœur de la pathologie de la MA. L'élément responsable de la formation de ces plaques est l'A β .

L'A β est produite à partir d'un précurseur, l'APP (amyloid precursor protein). L'APP est une glycoprotéine avec un domaine transmembranaire, un grand domaine extracellulaire et un petit domaine cytoplasmique. C'est son clivage qui mène à la formation de l'A β , et de nombreuses mutations du gène APP ont été identifiées dans les formes familiales de MA

Il existe deux voies de métabolisme de l'APP. La voie non-amyloïdogène est normalement majoritaire et considérée comme bénéfique, puisque comme son nom l'indique elle ne produit pas d'A β . L'autre voie est minoritaire et dite amyloïdogène (Figure 3, (Bernabeu-Zornoza et al., 2019)) .

a) Voie non amyloïdogène

Dans la voie non-amyloïdogène, l'APP est clivée à l'intérieur du domaine A β par des enzymes de la familles ADAM (a disintegrin and metalloproteases) : la α -sécrétase,

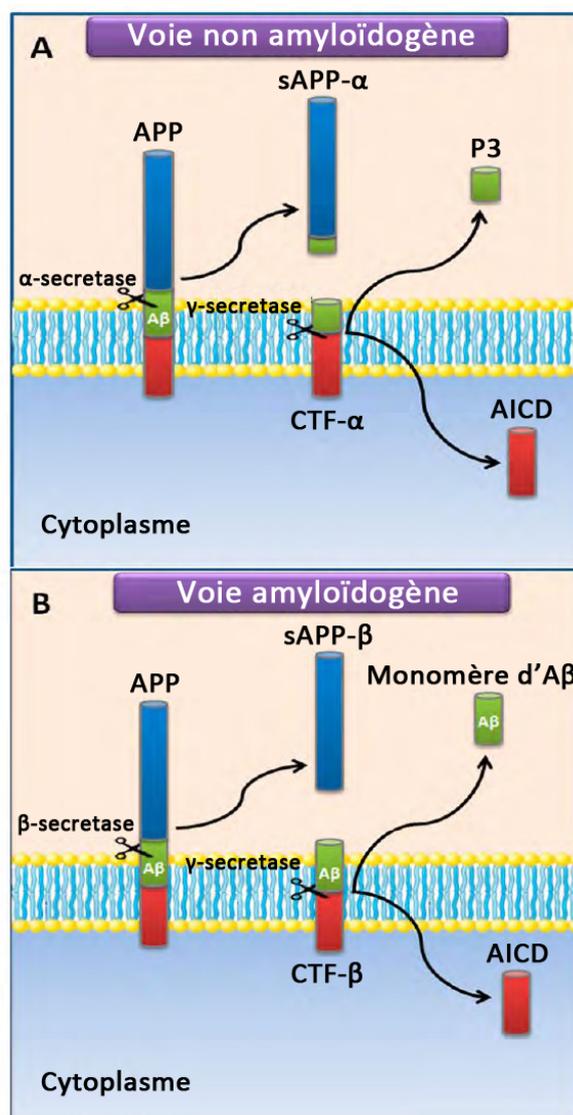


Figure 3 : Schéma descriptif des voies amyloïdogène et non amyloïdogène du métabolisme de l'APP (Bernabeu et al, 2019)

ADAM10 ou ADAM17. Ce clivage a pour effet d'aboutir à deux peptides : le sAPP α (soluble Alpha-Amyloid Precursor Protein) et le CTF α (C-Terminal Fragment Alpha). Le domaine CTF α est par la suite clivé par la γ -sécrétase, qui produit alors le peptide p3 et le domaine intracellulaire de l'APP (App intracellular domain, AICD). Cette voie est majoritaire dans de nombreux types cellulaires.

b) Voie amyloïdogène

Dans la voie amyloïdogène, l'APP est clivée par la β -sécrétase (ou BACE-1 pour β -site APP cleaving enzyme). Il en résulte un peptide sAPP β et un fragment transmembranaire CTF β . Un second clivage du CTF β par la γ -sécrétase va alors provoquer la libération du domaine AICD et de l'A β , tous deux de taille variable : l'A β existe majoritairement sous sa forme courte A β ₁₋₄₀ (ou A β 40 ou A β 1-40), mais il en existe environ 10% sous la forme longue A β ₁₋₄₂, (ou A β 42 ou A β 1-42). Il est important de noter que la forme A β 42 est plus prône à l'agrégation en fibrilles et est le composant majoritaire des plaques amyloïdes (Checler, 1995; Selkoe, 2001). Ainsi le ratio A β 1-42/A β 1-40 est un facteur pronostic de la sévérité de la MA, un ratio élevé étant par ailleurs associé à un développement plus précoce de la maladie. La balance des deux voies métaboliques de l'APP est donc un facteur important dans le développement de la MA. On note par ailleurs que deux sous-unités de la γ -sécrétase, les présénilines 1 et 2 (PSEN1, PSEN2) sont souvent mutées dans les formes familiales de la MA.

c) Clairance de l'A β

Une surproduction d'A β n'est pas le seul facteur à l'origine de la formation des plaques amyloïdes. En effet, il existe des mécanismes de clairance de l'A β dont la déficience peut expliquer le développement de la MA. Les niveaux de production et de clairance sont mesurés dans le LCR et sont estimés respectivement à 7,6% et 8,3% par heure (Bateman et al., 2006). L'accumulation et agrégation d'A β est donc peu probable chez l'adulte sain. Il existe plusieurs voies de clairance de l'A β , mettant ou non en jeu des mécanismes enzymatiques. La clairance enzymatique fait intervenir différents types de protéases. Parmi les systèmes non enzymatiques, on distingue :

- le flux liquidien permettant le drainage des fluides interstitiels dans le LCR, notamment par le biais des espaces périvasculaires ;
- la recapture et la dégradation par les cellules gliales (microglie et astrocytes) ;
- le transport via le flux sanguin à l'aide de transporteurs tels que LRP1.

Des dysfonctions de ces différents mécanismes, parfois dues à une cause génétique, sont retrouvées dans la MA.

D) Les hypothèses de la MA

a) L'hypothèse amyloïde

L'origine de la neurodégénérescence caractéristique de la MA est débattue. Dans les années 90 a été proposée l'hypothèse selon laquelle l'apparition des plaques amyloïdes était à l'origine de la maladie. L'A β 1-42, composant majeur de ces plaques, serait donc l'élément initial de la pathogénèse. L'apparition des autres lésions telles que la dégénérescence neurofibrillaire serait secondaire à cette accumulation d'A β (Hardy and Selkoe, 2002).

Plus tard est apparue l'hypothèse amyloïde, selon laquelle la maladie a pour origine un déséquilibre entre les systèmes de production et de clairance de l'A β qui résulte en une augmentation de la concentration en A β 1-42 extracellulaire et intraneuronale. Cette élévation d'A β 1-42 provoque son oligomérisation et organisation en fibrilles, qui forment ensuite les plaques amyloïdes. Cette plaque est responsable d'abord d'une dégénérescence neuritique locale, mais aussi d'une activation de la microglie et des astrocytes environnants, et donc d'une réaction inflammatoire locale. Cet état inflammatoire provoque un stress oxydatif dans les neurones et le tissu environnants. S'ensuit un déséquilibre de l'activité des kinases et phosphatases neuronales qui provoque la formation des PHF et contribue à la dysfonction neuronale, jusqu'à la mort du neurone.

Il existe différents éléments en faveur de cette deuxième hypothèse. Les formes familiales de la MA supportent fortement cette hypothèse : en effet, les mutations des gènes APP, PSEN1, PSEN2 responsables d'un déséquilibre de la production d'A β 1-

42/40 sont les causes des cas familiaux de MA, tandis que des mutations de tau sont à l'origine de syndromes neurodégénératifs mais ne provoquent pas l'apparition des plaques amyloïdes (Hardy et al., 1998). De plus, on trouve plus de dégénérescence neurofibrillaire chez les souris double-mutantes pour APP et tau par rapport aux souris uniquement mutées pour tau, tandis que ces dernières ne montrent pas de plaques amyloïdes. Il semble donc que la tauopathie, bien qu'elle contribue à la pathogénèse et au déclin cognitif, n'est pas un élément initiateur de la MA, et que la pathologie amyloïde potentialise la tauopathie.

b) Facteurs de risque

La cause de la MA reste inconnue, mais plusieurs facteurs ont été identifiés comme ayant une influence sur l'apparition ou le développement de la maladie. L'hérédité est un facteur important, et de nombreuses mutations ont été identifiées, aboutissant à la notion de MA dite familiale. Avec l'hérédité, l'âge constitue un facteur de risque majeur. En effet, après 65 ans, la prévalence de la MA double pour chaque 5 années d'âge (Prince et al., 2009). Les autres facteurs de risques peuvent être classés en facteurs cérébraux, cardio-vasculaire, périphériques, comme suit (Torre, 2004) :

Facteurs de risque cardiovasculaires :

- Insuffisance cardiaque
- Arythmie
- Hypertension
- Hypotension
- Thrombose
- Homocystéinémie élevée
- Allèle Apoε4
- Athérosclérose

Facteurs de risques cérébraux ou cérébrovasculaires :

- AVC
- Traumatismes crâniens
- Ménopause
- Migraine

- Niveau d'éducation
- Anomalies hémodynamiques
- Dépression

Facteurs de risques périphériques ou comportementaux :

- Tabagisme
- Alcoolisme
- Diabète
- Cholestérol et consommation d'acides gras saturés

c) L'hypothèse vasculaire

L'hypothèse d'une origine vasculaire à la pathogénèse de la MA a émergé dans les années 90. Deux études cliniques dans les années à suivre renforcent cette hypothèse, indiquant que l'athérosclérose carotidienne et l'hypertension artérielle chronique sont associées à la MA (Hofman et al., 1997; Skoog et al., 1996). Nous avons par ailleurs évoqué précédemment l'étroite association des facteurs de risques vasculaires avec la MA. L'hypothèse formée en 2000 propose que chez des patients présentant un terrain sensible à la MA, une réduction du flux sanguin cérébral se retrouve aggravée par des facteurs de risques, jusqu'à atteindre un seuil critique théorique. Ce seuil correspondrait au palier au-delà duquel le flux sanguin devient insuffisant et incapable de remplir les besoins des neurones et donc d'assurer leur fonctionnement et leur survie (de la Torre, 2000). L'hypoxie qui en résulte participerait alors à la formation d'A β . En effet, il a été montré que HIF-1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha), un régulateur transcriptionnel stimulé par l'hypoxie, active les enzymes β et γ sécrétase, responsables la production d'A β (Ogunshola and Antoniou, 2009).

Enfin, l'hypothèse du « two-hit » a été proposée (Figure 4) : des facteurs de risques vasculaires ou génétiques amènent à des dommages cérébrovasculaires qui forment la lésion initiale, le premier « hit ». Ceci provoque d'une part une dysfonction de la BHE et donc le passage dans le parenchyme d'éléments du sang toxiques pour le cerveau et d'autre part une réduction du flux sanguin cérébral. L'hypoperfusion et la dysfonction de la barrière interviennent dans le métabolisme de l'A β respectivement en stimulant l'expression ainsi que la maturation de l'APP notamment grâce à HIF-1 α

et en réduisant la clairance de l'A β formée. Ces facteurs initient alors l'accumulation d'A β dans le parenchyme cérébral, ce qui constitue le second « hit » dans la pathogénèse de la maladie. Les deux voies convergent ensuite et provoquent des lésions neurodégénérative et perte neuronale indépendamment ou en synergie, amenant finalement à la démence (Nelson et al., 2016).

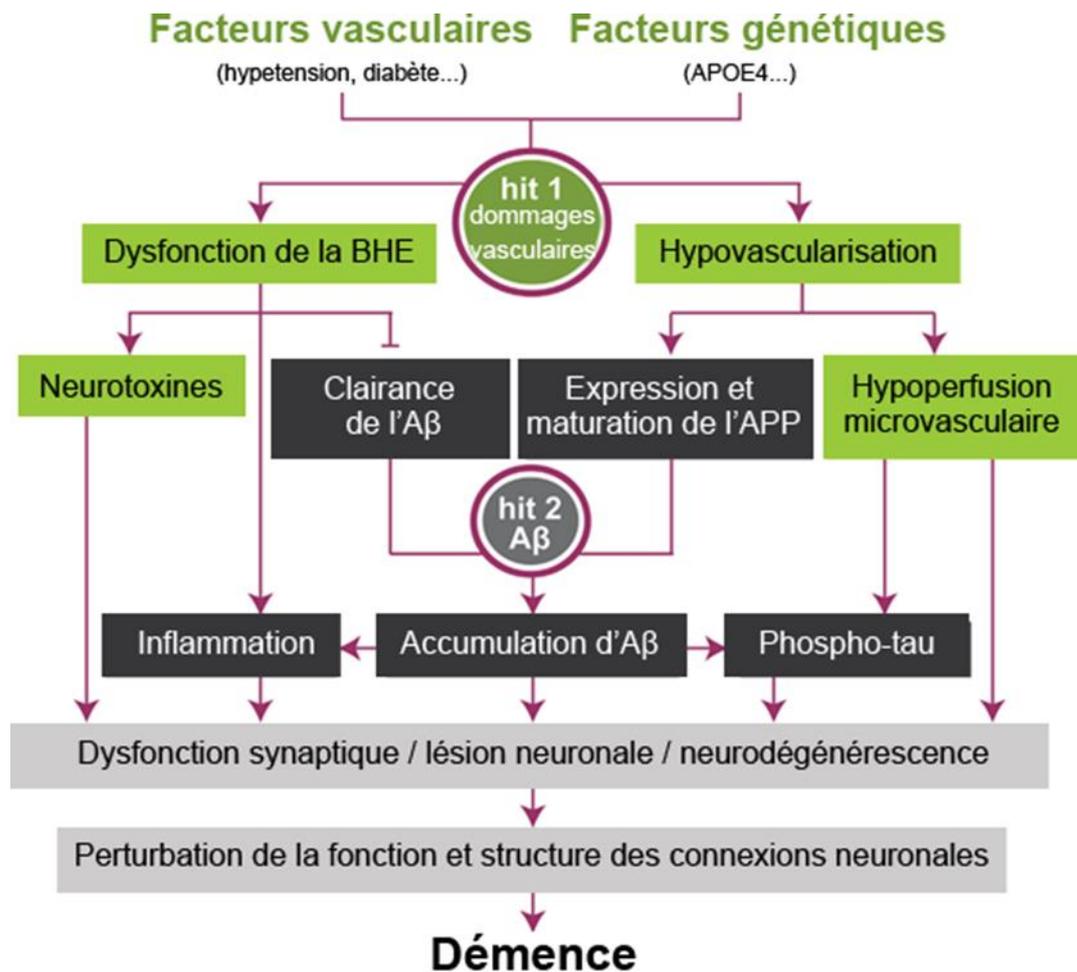


Figure 4 : Schéma de l'hypothèse du « two-hit », d'après (Nelson et al., 2016)

E) Interaction entre BHE et pathologie amyloïde

L'accumulation vasculaire d'A β provoque un effet pro-inflammatoire et cytotoxique qui aggrave l'état de la BHE dans la MA (Carrano et al., 2011). On retrouve une dégénérescence des péricytes, des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et des CE. A l'inverse, Une atteinte de la BHE peut aggraver la pathologie amyloïde. Il a effectivement été démontré que l'A β présente dans le parenchyme cérébral est

éliminée à travers la BHE via la protéine LRP-1 (low-density lipoprotein receptor-related protein-1) (Shibata et al., 2000). Or, il a aussi été démontré que l'expression vasculaire de LRP-1 est réduite dans la MA. De cela a émergé l'hypothèse que la réduction de l'expression vasculaire de LRP-1 dans la MA a pour effet de perturber l'efflux de l'A β et donc en renforcer l'accumulation dans le parenchyme cérébral, et donc d'aggraver le développement de la MA. Il a été confirmé que l'inhibition de LRP-1 au niveau de la BHE provoque l'accumulation d'A β même chez des souris sauvages, ne surexprimant pas l'A β (Jaeger et al., 2009).

a) Dégénérescence péricytaire

Les patients atteints de MA présentent également des marqueurs de dommages péricyitaires dans le liquide cébrospinal (Montagne et al., 2015). On retrouve en effet dans la MA, une réduction de la couverture des capillaires par les péricytes, dans le cortex et l'hippocampe, soit une déstabilisation de la BHE (Sengillo et al., 2013). En effet, l'A β est toxique pour les péricytes *in vitro*, mais les facteurs de risques cardiovasculaires associés à la MA sont également associés à une dégénérescence péricytaire, la cause primaire de cette dégénérescence dans la MA n'est donc pas clairement établie.

b) Action des astrocytes dans la pathologie amyloïde

Les astrocytes, par le biais de l'AQP4, sont responsables d'un mouvement liquidien polarisé allant de l'espace périvasculaire artériel vers le compartiment interstitiel, puis du compartiment interstitiel vers l'espace périvasculaire veineux. Les fluides périvasculaires au niveau veineux sont ultimement drainés dans le système lymphatique. Ce mouvement liquidien appelé « bulk flow » intervient dans le drainage de solutés interstitiels, et notamment de l'A β . Par ailleurs, il a été rapporté que dans un modèle murin d'AD, la localisation d'AQP4 est perturbée : au lieu d'être concentrée au niveau des pieds astrocytaires, son territoire d'expression remonte vers le corps cellulaire de l'astrocyte. De même, l'exposition à une forte concentration d'A β 42 réprime l'expression d'AQP4. Il résulte de cela une perturbation de ce « bulk flow » qui a pour conséquence un défaut de clairance de l'A β (Rasmussen et al., 2018).

Le rôle des astrocytes dans la MA ne se limite cependant pas aux mouvements convectifs des fluides cérébraux. Comme cela a été dit plus haut, les astrocytes sont nécessaires à l'acquisition de certaines caractéristiques de la BHE par les CE. Ils favorisent par exemple l'expression par les CE de transporteurs tels que MDR1 (Berezowski et al., 2004), impliqué dans la clairance de l'A β (Kuhnke et al., 2007), et sont de façon plus générale des stabilisateurs de la BHE. Ils sont aussi capables par eux-mêmes d'internaliser et dégrader l'A β . Cependant cette capacité à éliminer l'A β semble réduite dans les astrocytes de sujets AD. Ceci provoque l'accumulation d'A β à l'intérieur même des astrocytes ce qui provoque l'astrogliose et un stress oxydant, et impacte donc la survie neuronale (Jones et al., 2013).

En somme, on dispose de données épidémiologiques et expérimentales soutenant l'importance de la BHE dans la pathologie de la démence. Dans l'hypothèse du « two-hit » évoquée précédemment, une dysfonction de la BHE fait même partie du premier hit d'origine vasculaire. Dans certains modèles d'AVC, il a été montré que restaurer la fonction de la BHE améliore la réparation du cerveau et le phénotype de l'animal. Cependant, la question d'une dysfonction seule de la BHE ou de l'UNV comme facteur initiant l'apparition d'une démence se pose. En l'absence d'AVC, et sans pathologie amyloïde, quel rôle peut revêtir la BHE dans l'étiologie de la démence ?

F) Démence vasculaire, trouble cognitif vasculaire.

La DV est la seconde forme la plus commune de démence après la MA. Elle est la cause de 20% des démences. C'est cependant un concept qui a évolué au cours des dernières années. La DV consiste en l'apparition de signes d'une démence imputable à la pathologie des vaisseaux sanguins cérébraux, et le diagnostic se faisait alors par l'évaluation ou la détection de ces deux paramètres. La pathologie était désignée comme s'aggravant par palier, rythmée par des AVC ischémiques ou hémorragiques, valant à la DV son nom alternatif de démence multi-infarctus. Cependant, c'est un concept qui a évolué au cours des dernières années. Il fut d'abord jugé trop limité, du fait de l'existence de troubles cognitifs liés à des pathologies vasculaires sans AVC, comme l'hypoperfusion, mais aussi du fait que la plupart des patients atteints de démence présentent à la fois des symptômes

neurodégénératifs et vasculaires. De plus, il apparut que des troubles vasculaires pouvaient conduire à l'apparition de troubles cognitifs, sans nécessairement de perte de mémoire, et pas assez sévères pour entrer dans les critères de la démence. Ceci amena à l'utilisation préférentielle de trouble cognitif vasculaire (VCD – vascular cognitive disorder), un terme plus large qui englobe un groupe hétérogène de pathologies (dont la DV) dont la caractéristique principale est la présence de troubles cognitifs imputables à une pathologie cérébrovasculaire.

a) Critères diagnostic

Le diagnostic du VCD est en évolution et fait de façon très hétérogène. En effet, les critères pris en compte varient en termes de perte de capacités cognitives, de lésions neurologiques et d'imagerie neurovasculaire, ce qui aboutit à la publication de taux de prévalence variables. En conséquence, l'International Society for Vascular Behavioral and Cognitive Disorders (VASCOG) a établi des recommandations définissant les critères diagnostics du VCD en 2014. Ces critères mettent notamment en lumière que le VCD est multifactoriel, et distinct de la MA. Le trouble cognitif repose sur un spectre allant de capacités cognitives normales à la démence, en passant par le trouble cognitif léger. En ce qui concerne la composante vasculaire, on recherche soit une association temporelle de l'apparition des troubles cognitifs avec un ou plusieurs événements cérébrovasculaires (AVC), soit, dans le cas d'une absence d'AVC dans l'historique du patient, la présence de lésions neurovasculaires documentées par imagerie par résonance magnétique (IRM) ou tomographie assistée par ordinateur (CT-Scan).

b) Physiopathologie

1 - Maladie des grands vaisseaux

La maladie des grands vaisseaux (LVD – Large Vessel Disease) est par excellence, dans les troubles cognitifs, la démence après AVC. En effet, une démence survient chez 30% des sujets, dans les 3 mois suivant un AVC. Une étude a montré que le taux de démence est doublé chez les patients avec des antécédents d'AVC par rapport à ceux qui n'en ont pas (Ivan et al., 2004). L'athérosclérose est un facteur évidemment important dans la pathologie des grands vaisseaux. Elle peut provoquer,

aussi bien dans les vaisseaux extra-crâniens qu'intra-crâniens, une ischémie soit par thromboembolie (thrombose occlusive du vaisseau), soit par réduction du flux sanguin. Cependant, seulement 15% des AVC ischémiques sont attribués à l'athérosclérose des grands vaisseaux, tandis que 30% sont dit cardioemboliques (en raison de l'origine du thrombus dans le cerveau qui provient du cœur ou de l'aorte proximale), et 25% sont dus à l'occlusion de petites artères (Kolominsky-Rabas et al., 2001). Il faut aussi noter que la LVD n'est que rarement retrouvée seule, tant la maladie des petits vaisseaux est presque omniprésente chez les sujets âgés.

2 - Maladie des petits vaisseaux

Le terme de maladie des petits vaisseaux (SVD – Small Vessel Disease) réfère à un ensemble de processus pathologiques d'étiologies différentes qui affectent les petites artères, les artérioles, les veinules, et les capillaires de plusieurs organes et régions du corps, bien que dans certains cas, le cerveau puissent en être la principale victime (Pantoni, 2010). On se focalisera logiquement ici sur la SVD du cerveau. Il faut noter toutefois que la définition d'un petit vaisseau n'est pas consensuelle au sein de la communauté scientifique. La SVD est un phénomène qui apparaît communément avec le vieillissement. Etant donné que les petits vaisseaux ne sont pas observables *in vivo*, on choisit d'utiliser les lésions du parenchyme cérébral supposément causées par un phénotype vasculaire comme marqueurs de la SVD. Je vais couvrir d'abord les différents processus pathologiques de la SVD, avant de parler des marqueurs recherchés en neuroimagerie.

i. Artériosclérose

L'artériosclérose est le facteur le plus fréquent dans la SVD. Elle est caractérisée par une perte de cellules musculaires lisses au niveau de la tunica media, une dégradation de la lame élastique interne, un dépôt fibrohyalin et collagénique, la formation de microathérome, une prolifération de fibroblastes, tout ceci menant à une rigidité vasculaire et un rétrécissement du lumen. Cette forme de la SVD est fortement associée au vieillissement ainsi qu'à des facteurs de risques vasculaires comme le diabète et surtout l'hypertension (on parle aussi de SVD hypertensive). Cette SVD provoque une occlusion du lumen ou une distension des vaisseaux

distaux. Le défaut de régulation du petit vaisseau atteint mène à une réduction du flux sanguin cérébral, et donc une hypoperfusion, tandis que l'occlusion provoque une ischémie. Ces événements pourront être visualisés en neuroimagerie (hyperintensités de la substance blanche et infarctus lacunaires)

ii. Angiopathie amyloïde cérébrale (CAA – Cerebral Amyloid Angiopathy)

La CAA est caractérisée par une accumulation progressive de protéines amyloïdes congophiles et immunoréactives dans la paroi des petites et moyennes artères et artérioles du cortex et des méninges, et dans une moindre mesure, des capillaires et des veines. Cette accumulation altère l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et augmente la perméabilité vasculaire. La fuite de composés plasmatiques toxiques participe à la formation de lésion du parenchyme. La CAA provoque également la formation d'anévrisme ou d'occlusion de la lumière vasculaire. Elle est également responsable d'une dissection de la lamina élastique, d'où l'observation de vaisseaux qui semblent présenter deux lumières concentriques (« double-barrel lumen »). La CAA est par ailleurs une lésion presque systématiquement retrouvée dans la MA. Cependant, on la retrouve également dans d'autres syndromes sans perte de fonction cognitive, tel que le syndrome de Down. La fréquence de CAA augmente également avec l'âge. En termes d'imagerie, la CAA est associée à la présence d'hyperintensités de la substance blanche, de micro-infarctus et de micro-saignements.

iii. SVD génétiques ou héréditaires

En plus d'une forme héréditaire de CAA, on distingue aussi un groupe de SVD héréditaires ou résultant de mutations génétiques connues. La SVD génétique par excellence et une des plus communes est le CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy). Cette maladie est provoquée par une mutation du gène *NOTCH3* sur le chromosome 19q12 (Joutel et al., 1996). Les symptômes cliniques sont des AVC répétitifs, des migraines, des syndromes psychiatriques et un déclin cognitif progressif. Les AVC sont fréquents et retrouvés chez 71% des patients de 30 à 66 ans (Dichgans et al., 1998). Les migraines semblent être le symptôme le plus précoces puisqu'elles

peuvent se déclarer quand les patients sont âgés d'une vingtaine d'années et concerner jusqu'à 90% des patients de 40 ans. A partir de 65 ans, environ deux tiers des patients montrent des signes de déclin cognitif. A l'IRM, les patients présentent des hyperintensités de la substance blanche, des micro-infarctus et des micro-saignements.

Parmi les SVD d'origine génétique connu, on trouve également le CARASIL, beaucoup moins fréquent, les SVD dépendants d'une mutation du gène COL4A1, la maladie de Fabry.

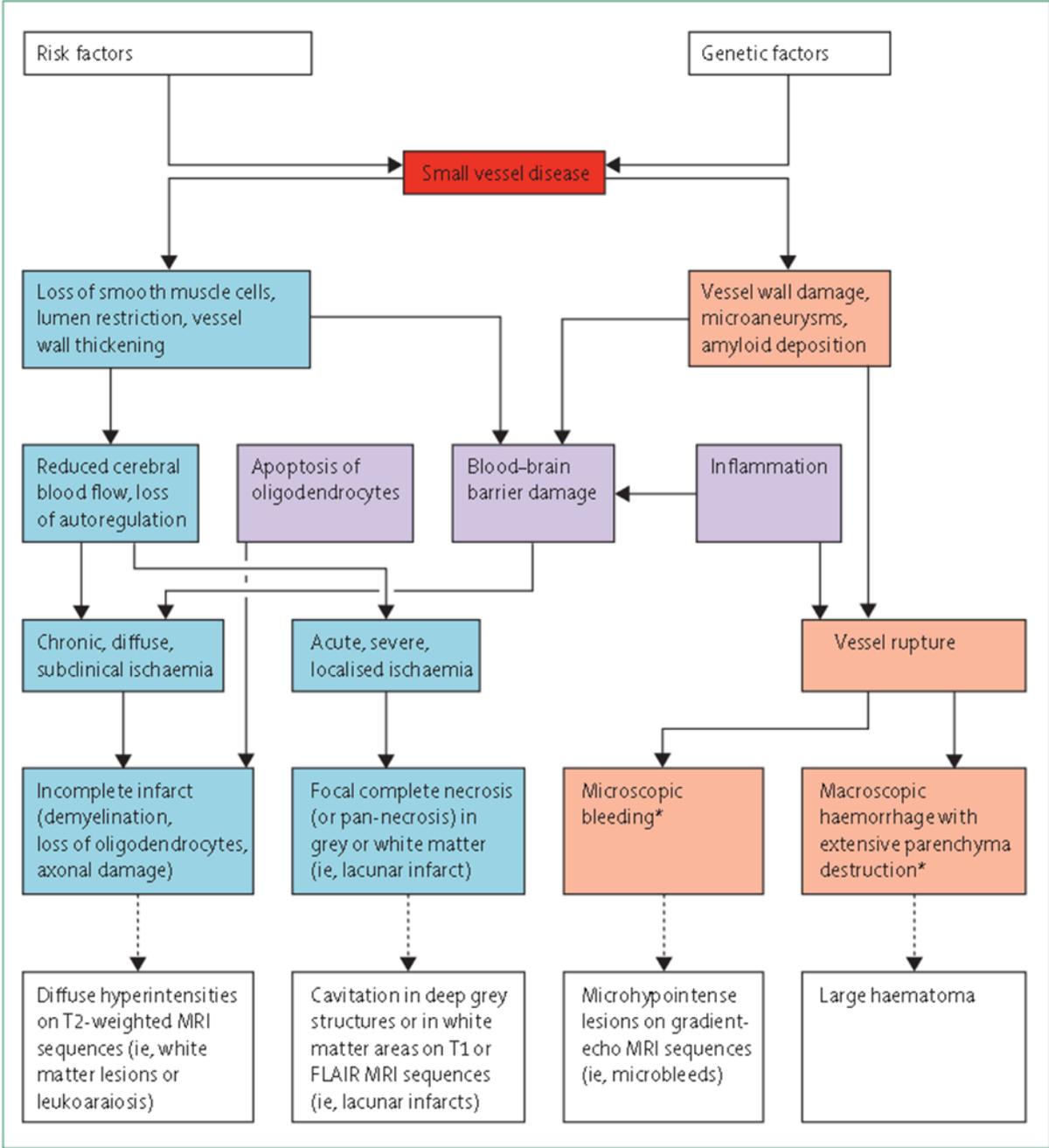


Figure 5 : Pathogénèse des lésions cérébrales conséquentes aux SVD (Pantoni et al., 2010), 37

iv. Hyperintensités de la matière blanche (WMH – White Matter Hyperintensities)

Les WMH d'origine vasculaire sont des lésions diffuses de la substance blanche qui présentent un signal anormal en neuroimagerie : elles sont hyperintenses en IRM pondérée T2. Il s'agit d'un marqueur très fréquent dans le vieillissement puisqu'on le retrouve chez 92% des sujets âgés de 60 à 90 ans (de Leeuw et al., 2001), et il apparaît déjà chez 50% des quarantenaires (Wen et al., 2009). Les caractéristiques pathologiques qui accompagnent les WMH sont la perte neuronale, l'élargissement des espaces périvasculaires, la gliose, la démyélinisation et l'activation microgliale (Wardlaw et al., 2015). Ces WMH présentent une association forte avec l'AVC, le déclin cognitif, et la mort, et constituent donc un marqueur diagnostique très important (Debette and Markus, 2010).

v. Autres marqueurs de SVD

Les micro-infarctus sont une caractéristique commune dans le cerveau des personnes âgées, et plus fréquente encore chez ceux atteints de démence vasculaire. Les zones infarctées ont une taille estimée entre 50 µm et 5 mm et sont visibles en IRM 3T (Hilal et al., 2016).

Un autre marqueur étudié est la dilatation des espaces péri-vasculaires ou espaces de Virchow-Robin, qui sont des espaces liquidiens entourant les vaisseaux sanguins cérébraux, délimités par les astrocytes. Ils sont visibles en IRM à haute résolution, et sont extrêmement fréquents, presque ubiquitaires, chez les personnes âgées. S'il tend à y avoir des éléments montrant une association entre ces dilatations et le déclin cognitif, leur pertinence reste controversée.

Les microsaignements sont un autre type de lésion. De forme arrondie et hypointense à l'IRM T2, ils correspondent à des dépôts d'hémosidérine, conséquence d'hémorragies microscopiques antérieures. Leur prévalence augmente avec l'âge et est particulièrement élevée dans la DV. L'étiologie des microsaignements varie en fonction de leur localisation dans le cerveau.

G) Démence mixte

Ce concept est intrinsèquement lié à l'hypothèse vasculaire de la MA. Cela a été évoqué précédemment, mais des études montrent que les lésions dégénératives et amyloïdes (de la MA) et les lésions neurovasculaires (des VCD) sont fréquemment associées, en particulier chez les personnes âgées. Delay et Brion (1962) ont été les premiers à donner de l'importance à l'association des lésions vasculaires et dégénératives à l'origine de la « démence sénile mixte ». Les opinions divergeaient alors quant à la possibilité d'une démence mixte (DM) et il fut choisi de parler de MA avec DV, et donc plutôt de l'existence chez un même patient de deux pathologies distinctes. Par ailleurs, le terme même de démence mixte (DM), dans un premier temps, réfèra par la suite simplement à la coexistence des deux maladies. Des études épidémiologiques ont permis de montrer que l'existence d'une maladie cérébrovasculaire diminue les performances cognitives dans un contexte d'Alzheimer, au moins au stade le plus précoce (Esiri et al., 1999). Une autre étude indique qu'à niveau de sévérité égal de la démence, les patients DM montrent moins de plaques séniles et de dégénérescence neurofibrillaires que les patients MA pure, tandis que ces patients DM montrent également un volume d'infarctus cérébraux moins important que les patients DV pure, ce qui indique un effet cumulatif, sinon synergique, des deux types de processus pathologique.

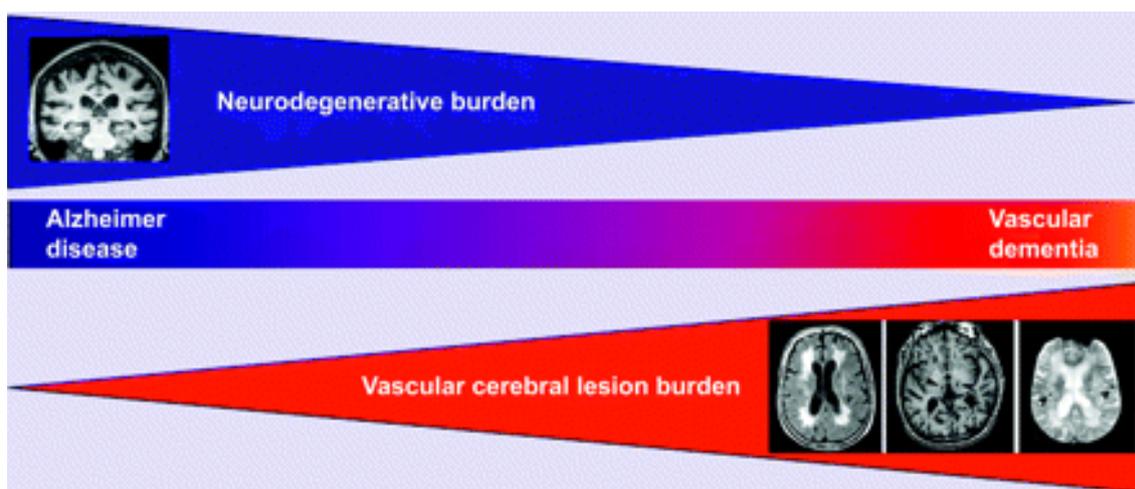


Figure 6 : Schéma d'une nouvelle conception de la classification de la démence, d'après (Broderick and Wszolek, 2009)

A l'autopsie, on trouve des signes de pathologies cérébrovasculaires chez un tiers des patients Alzheimer. Le diagnostic discriminant la MA et la DV a de fait évolué ; les caractéristiques des lésions de la MA et de la DV forment en réalité un

continuum allant de la MA pure à la DV pure (Figure 6). Le terme de DM est finalement attribué à ces formes intermédiaires de démences. D'autres paramètres ont participé à consolider cette théorie, comme les facteurs de risques communs aux deux maladies, tels que l'hypertension, l'allèle apoE ainsi que les facteurs comportementaux.

3) La BHE dans des conditions pathologiques

Comme suggéré dans les paragraphes précédents, des dérèglements de la BHE, notamment de l'endothélium cérébral sont présents dans de nombreux troubles neurologiques, mais les mécanismes impliqués peuvent être différents et mettre en jeu différentes voies de signalisation.

A) Dysfonction endothéliale, généralité

La fonction endothéliale désigne les mécanismes mis en jeu par les cellules endothéliales pour préserver l'homéostasie vasculaire. La dysfonction endothéliale correspond à une perturbation de ces fonctions et se traduit par une régulation aberrante du tonus vasculaire, une activation pro-inflammatoire et pro-thrombotique anormale de l'endothélium, une réduction de la survie endothéliale, une augmentation de la perméabilité vasculaire.

a) Dérégulation du tonus vasculaire

Un des aspects le plus étudié de la dysfonction endothéliale s'intéresse à la dérégulation du tonus vasculaire, résultant d'un déséquilibre entre des facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs.

Un des médiateurs endothéliaux les plus importants de la vasodilatation est l'oxyde nitrique (NO).

Avant son identification, il fut démontré que la vasodilatation en réponse à l'acétylcholine était dépendante de l'endothélium ; celui-ci sécrète un facteur vasodilateur après stimulation par l'acétylcholine (Furchgott and Zawadzki, 1980). Ce facteur fut dans un premier temps baptisé facteur relaxant dérivé de l'endothélium

(ERDF). Il agit sur les CMLV en stimulant la guanylate cyclase et accroît ainsi le taux de GMP cyclique (GMPc) dans la cellule (Rapoport and Murad, 1983), responsable de la relaxation des CMLV. L'ERDF fut plus tard identifié comme étant le NO, synthétisé par la nitric oxide synthase endothéliale (NOS3 ou eNOS) à partir de L-arginine. La biodisponibilité du NO est dépendante de l'état d'oxydoréduction de la cellule, du stress oxydant, de la quantité et des modifications post-traductionnelles des co-facteurs de la eNOS (Palmer et al., 1988). L'activité de la eNOS est dépendante de différents stimuli tels qu'une activation cholinergique, une modification du débit sanguin ou du flux. Les facteurs de risques cardiovasculaires tels que le diabète, l'âge, l'hypertension artérielle se caractérisent notamment par une réduction de la biodisponibilité du NO.

D'autres facteurs vont jouer un rôle dans la perturbation du tonus vasculaire contribuant à la dysfonction endothéliale. La prostacycline (ou prostaglandine I₂, PGI₂) fait partie de la famille des eicosanoïdes et est produite par les CE en réponse à un stimulus pro-inflammatoire tels que l'interleukine 1. A l'instar du NO, PGI₂ a un effet anti-inflammatoire et est un médiateur de la vasodilatation. En conséquence de la production de prostacycline par les CE, le niveau d'AMP cyclique diminue dans la CMLV et cela aboutit à la vasodilatation.

Les endothélines (ET) sont une famille de 3 facteurs vasoconstricteurs ; l'endothéline-1 (ET-1) est produite par l'endothélium et a un rôle majeur dans l'homéostasie de la vasomotricité vasculaire. Elle est produite par l'enzyme de conversion en endothéline-1 présente à la surface des CE. L'ET-1 agit sur deux récepteurs couplés aux protéines G : ET-A et ET-B. ET-A est présent sur les CMLV et va stimuler la contraction en induisant la libération de calcium dans le cytoplasme. ET-B, en revanche, est présent au niveau des CE et son activation mène à la production de NO (Kedzierski and Yanagisawa, 2001).

b) Phénotype pro-inflammatoire

Les CE jouent un rôle primordial dans l'initiation d'une réponse immunitaire dans un territoire donné. En effet, en réponse à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α ou l'IL-6, les CE sont activées, c'est-à-dire qu'elles expriment à leur surface des molécules d'adhésion aux cellules immunitaires circulantes, telles

que VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), ou E-sélectine. Les facteurs de risques cardiovasculaires à l'origine d'une dysfonction endothéliale sont également associés à une activation excessive des CE, c'est-à-dire l'expression excessive de ces molécules d'adhésion dans des malgré l'absence de pathogène, amenant à une réaction inflammatoire potentiellement délétère pour le pour le vaisseau et le tissu environnant. Le défaut de biodisponibilité du NO propre à la dysfonction endothéliale semble suffire à induire une activation endothéliale excessive (Liao, 2013).

c) Phénotype pro-thrombotique

L'endothélium a un rôle essentiel dans l'activation du système de coagulation en cas de dommage vasculaire. Cependant une dysfonction endothéliale peut aussi mener à une activation pro-thrombotique accrue, comme c'est le cas dans le diabète, le tabagisme ou en présence d'un taux de cholestérol élevé. Cet effet est étroitement lié à l'activation inflammatoire des CE. En effet les cytokines pro-inflammatoires stimulent la production de facteur tissulaire et de facteur von Willebrand, qui sont pro-thrombotiques.

d) Rupture de la barrière endothéliale

Dans tout l'organisme, les fonctions de la barrière sont assurées par l'établissement de jonctions intercellulaires spécialisées parmi lesquelles, des jonctions adhérentes, des jonctions serrées, des jonctions communicantes (Vestweber, 2012). Les pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, se caractérisent entre autres par une modification de la perméabilité de l'endothélium jusqu'à une rupture de la barrière endothéliale, qui facilite le passage de cellules immunitaires à travers l'endothélium. Dans un modèle d'hypoxie-réoxygénation, on constate une augmentation de la perméabilité vasculaire due entre autres à une relocalisation de la VE-cadhérine. Cet effet peut néanmoins être supprimé si les CE surexpriment eNOS (Ozaki et al., 2002). *In vitro*, l'induction d'un stress oxydant par traitement au peroxyde d'hydrogène est suffisante pour déstabiliser la barrière endothéliale.

B) Preuves expérimentales d'une dysfonction vasculaire comme facteur initiateur de la démence.

Cela a largement été évoqué jusqu'ici, les éléments vasculaires sont étroitement associés au développement de la démence. Il reste cependant à démontrer si dans un contexte non ischémique, une dysfonction de vasculaire (hors AVC) peut amener à l'apparition de troubles cognitifs.

a) Hypoperfusion

Hormis l'AVC en lui-même, l'anomalie neurovasculaire la plus communément regardée comme facteur vasculaire à l'origine d'une démence est l'hypoperfusion. Cela a été renforcé par la création de modèles de démence vasculaire basée sur l'hypoperfusion cérébrale modérée (Hattori et al., 2016).

b) La perméabilité comme origine d'une démence ?

La présence de dégâts péricyaires, et d'une réduction de la couverture des vaisseaux par les péricytes dans la MA a été évoquée. Des chercheurs ont étudié le rôle des péricytes à l'aide de souris PDGFR-B^{+/-}, mutée pour un récepteur dont la voie de signalisation est cruciale au maintien des péricytes. Avec l'âge, la densité vasculaire, de même que la couverture péricytaire des vaisseaux diminue beaucoup plus chez ces souris, et cette perte des péricytes entraîne une perméabilité vasculaire accrue chez ces souris. Ces paramètres s'accompagnent d'une neurodégénérescence et l'apparition de troubles cognitifs. Par ailleurs, il fut également montré qu'un autre modèle de souris affecté d'une réduction vasculaire similaire mais sans perméabilité vasculaire présente une perte neuronale moindre que les souris PDGFR-B^{-/-}, suggérant une synergie entre la disruption de la BHE et l'hypoperfusion dans le développement de la démence (Bell et al., 2010).

D'autres chercheurs ont étudié la BHE et les capacités cognitives de souris rendues diabétiques (insulino-résistantes) par un régime riche en graisses et en fructose. Après quelques semaines sous ce régime, une perméabilité vasculaire apparaît déjà

dans le cerveau, accompagnée d'une activation pro-inflammatoire des CE, tandis qu'un déclin cognitif n'a été détecté qu'au bout de quelques mois (Takechi et al., 2017).

Dernièrement il a aussi été mis en évidence dans notre laboratoire que la perméabilité vasculaire aggrave la pathogénèse de la démence dans un modèle de sténose graduelle de l'artère carotide (GCAS). Les souris mutées pour la protéine Pdzn3 dans les CE présentent une BHE plus résistante aux stimuli ouvrant normalement la barrière et augmentant la perméabilité vasculaire. Dans un modèle de GCAS, l'apparition de troubles cognitifs est retardée chez ces souris mutées, en association avec une disruption moindre de la BHE (travaux non publiés).

C) Dysfonction vasculaire et autres maladies neurodégénératives

a) BHE et sclérose en plaques

1 - Généralités

La sclérose en plaque (SEP) est une maladie auto-immune chronique du système nerveux central dans laquelle l'individu malade génère des anticorps dirigés contre la myéline ce qui provoque une démyélinisation progressive importante. Plusieurs fonctions peuvent être affectées par ces lésions : troubles moteurs, de la vision, de la sensibilité, de l'humeur, de l'ouïe, paralysie faciale, fatigue. La SEP crée donc un contexte de neuroinflammation chronique dans lequel la barrière hémato-encéphalique est altérée de façon importante. L'expression et l'organisation des jonctions inter-endothéliales sont affectées, mais aussi celles des transporteurs ABC. Par ailleurs, l'expression de Shh est augmentée dans les astrocytes qui sont activés dans un contexte neuroinflammatoire (Alvarez et al., 2011).

2 – Ouverture de la BHE dans la SEP

L'ouverture de la BHE fait aussi partie du processus pathogénique de la sclérose en plaque (SEP), ou plus largement de la neuroinflammation. Dans un modèle expérimental de SEP, les astrocytes sont activés avant même apparition des symptômes. Ces astrocytes activés sécrètent du VEGFA, mais réduisent aussi leur expression de facteurs stabilisant la BHE, comme l'angiotensine (Wosik et al., 2007).

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sont des endopeptidases caractérisées par la présence d'un ion Zn⁺ proche de leur site catalytique, de la superfamille metzincine, et impliquées dans la modification de la matrice extra-cellulaire. Elles sont d'abord produites sous la forme de zymogène avec un pro-domaine dont le clivage active la protéine et permet sa liaison à ses substrats. Elles jouent un rôle important dans la physiopathologie du SNC, notamment dans la neuroinflammation par divers mécanismes, comme la libération du TNF α (Black et al., 1997). Les MMP produites par les cellules immunitaires en particulier MMP-2 et -9) dégradent le β -dystroglycane, responsable de l'ancrage des pieds astrocytaires (Agrawal et al., 2006), ce qui facilite localement le passage de ces cellules hors des vaisseaux. Les neurones peuvent aussi produire MMP-3 qui active la microglie et provoque l'expression de cytokines pro-inflammatoire (Kim et al., 2007). D'autres travaux rapportent une ouverture de la BHE et une altération de l'expression des protéines de jonctions dans la SEP.

b) BHE et AVC

1 – Généralités

L'AVC est la seconde cause de mortalité dans le monde. C'est une pathologie où une perturbation de l'apport sanguin aux cellules du cerveau provoque une mort cellulaire. L'occlusion d'un vaisseau sanguin (AVC ischémique) constitue 85% des AVC, le reste étant dû à un saignement intracérébral (AVC hémorragique). L'ischémie correspond à une réduction du flux sanguin suffisante pour induire une dysfonction cellulaire. Le cerveau est très sensible à ce phénomène, et un épisode ischémique même bref suffit à aboutir à une mort cellulaire dans le parenchyme cérébral. Plusieurs phénomènes interdépendants sont en cause dans la pathologie de l'AVC ischémique : apport insuffisant d'énergie, perturbation de la balance ionique, ouverture de la BHE, activation des cellules gliales, infiltration des leucocytes (Woodruff et al., 2011).

2 – Ouverture de la BHE dans l'AVC

Dans l'AVC, l'ouverture de la BHE aggrave la pathologie et augmente les risques d'hémorragie. Cette ouverture apparaît très rapidement après l'AVC. On retrouve en

effet après l'AVC une perturbation importante des jonctions endothéliales, en termes de localisation, de modification post-traductionnelle et de dégradation. Une première conséquence de l'ouverture de cette barrière va être l'apparition d'un œdème cérébral. Ceci va aussi permettre une fuite d'éléments neurotoxiques hors des vaisseaux sanguins (Jiang et al., 2018).

Plusieurs processus vont participer à la déstabilisation de la BHE dans l'AVC. L'infiltration de cellules immunitaires dans le parenchyme cérébral conséquent à l'AVC participe à cet effet, notamment par la libération de cytokines pro-inflammatoires. Le niveau de MMP-9 sérique augmente et est corrélé avec la sévérité de l'AVC (Montaner et al., 2003). Dans un modèle murin d'AVC, l'expression de MMP-2 et MMP-9 est augmentée et cela entraîne une disruption des jonctions serrées (Yang et al., 2007). L'hypoxie entraîne la production de VEGF, qui augmente la perméabilité (Schoch et al., 2002), mais aussi une augmentation de la production endothélial d'oxyde nitrique (NO) et l'inhibition de la NO synthase réduit la perméabilité induite par l'hypoxie *in vitro*. L'AVC ischémique entraîne aussi une production élevée de glutamate par les neurones, en partie responsable de l'ouverture de barrière, notamment via les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (Sharp et al., 2003).

6) Voie Hedgehog et système vasculaire

A) Description des agents de la voie Hedgehog

a) Généralités

Le morphogène Hh a été découvert en 1978 par Nusslein-Volhard et Wieschaus, chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*). Sa mutation affecte l'organisation et la polarité des segments de la drosophile, aboutissant à un animal dont la cuticule est couverte de spicules, d'où le nom du gène. Depuis, 3 homologues ont été identifiés chez les mammifères : Sonic Hedgehog, Indian Hedgehog, Desert Hedgehog (Shh, Ihh, Dhh). Ces trois protéines sont connues avant tout pour leur rôle durant le développement embryonnaire. Leur rôle chez l'adulte fut étudié par la suite dans d'autres contextes tels que le cancer ou la vascularisation. Ces ligands ont pour

récepteurs la protéine Patched (Ptch). La voie de signalisation Hh est étroitement associée au cil primaire, qui est souvent décrit comme la localisation de la machinerie cellulaire nécessaire au fonctionnement de la voie de signalisation. Cependant, il a été rapporté que cette voie de signalisation peut être modulée indépendamment du cil primaire (Chen et al., 2009).

b) Structure et modifications post-traductionnelles des ligands

Chacun des 3 ligands est initialement produit sous la forme d'une pré-pro-protéine composée d'un peptide signal amino-terminal, suivi d'un domaine de signalisation, puis d'un domaine autocatalytique carboxy-terminal. Après élimination du peptide signal, on obtient la protéine sous sa forme longue (« full-length », FL), non clivée. Les modifications post-traductionnelles subies par Shh sont les mieux décrites. Le domaine carboxy-terminal de Shh provoque son propre clivage et de façon concomitante, l'addition d'une molécule de cholestérol à sa place (Porter et al., 1996). La molécule obtenue sera ensuite palmitoylée sur une cystéine aminotermine par la Hedgehog acyl-transferase (HhAT) (Pepinsky et al., 1998). Cette forme courte, estérifiée et palmitoylée, ou forme N-Hh correspond à la molécule Shh active et sécrétée (Figure 7).

Les domaines N-Hh des trois ligands présentent une forte homologie. Shh a respectivement 91% et 76% d'identité avec Ihh et Dhh, et Ihh et Dhh ont une identité de 80% (Pathi et al., 2001). Cependant, une analyse bioinformatique rapide des séquences protéiques des trois protéines avant maturation révèle une homologie moins importante, avec une identité de 59% entre Shh et Ihh, 56% entre Shh et Dhh, 60% entre Ihh et Dhh, et que l'essentiel de la divergence entre ces protéines est concentré au niveau des domaines carboxy-terminaux. Ceci suggère donc une variabilité plus importante entre les domaines C-terminaux des trois ligands.

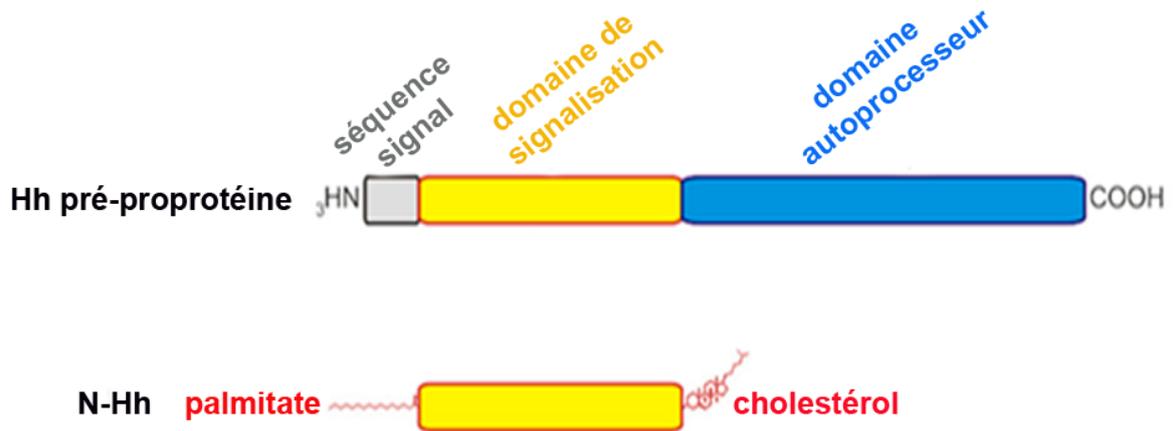


Figure 7 : La maturation post-transcriptionnelle des ligands Hh

c) Patched

Patched est le récepteur de la protéine Hh chez la drosophile. Il existe 2 homologues de Patched chez les mammifères : Ptch-1 et Ptch-2. Ce sont des récepteurs à 12 segments transmembranaires. Les 2 gènes présentent 73% d'homologie, leurs différences se concentrant essentiellement dans les domaines transmembranaires 6 et 7. Ptch-1 est nécessaire au développement embryonnaire de la souris et une déficience en Ptch-1 est létale tandis que Ptch-2 n'est pas indispensable au développement, sa perte amenant cependant à des anomalies cutanées.

Lors de la réception du ligand, la signalisation Hh est induite (signalisation décrite plus loin) et le complexe ligand-récepteur est internalisé puis recyclé. Cette internalisation n'est pas indispensable à la transduction du signal mais participe à la création du gradient de morphogène en réduisant localement la concentration en ligand Hh (Torroja et al., 2004).

d) Smoothened

Smoothened (Smo) est une protéine transmembranaire. Son organisation structurale est celle d'un récepteur couplé aux protéines G (RCPG) à 7 domaines transmembranaires. Elle transduit le signal induit par la fixation du ligand Hh sur son récepteur (Voir paragraphe suivant). Elle présente des homologies importantes avec les récepteurs Frizzled (FZD), transducteurs des ligands Wnt, beaucoup moins avec les autres types de RCPG. Le 7^{ème} domaine transmembranaire de Smo porte le site

de liaison à la cycloamine, un alcaloïde stéroïde issu d'une plante, le premier inhibiteur de smo et de la voie Hh en général découvert (Chen et al., 2002; Incardona et al., 1998; Sharpe et al., 2015). Les chercheurs se sont donc intéressés en particulier à ce domaine, et d'autres régulateurs agissant sur ce domaine ont été identifiés : des agonistes, comme le SAG (Smoothed AGonist) ou la purmorphamine, ou bien des inhibiteurs tels que Vismodegib (GDC-0449) utilisé chez l'homme comme agent thérapeutique contre le cancer basocellulaire (Apalla et al., 2017) ou les molécules SANT-1 à SANT-4. Les sites de fixations de ces différents inhibiteurs sont variables et offrent autant d'outils pour étudier la signalisation Hh dans un type cellulaire ou les mécanismes d'activation de Smo (Sharpe et al., 2015).

Plusieurs études ont démontré que l'exposition à certains oxystérols, en particulier ceux présents au niveau du cil primaire tels que le 7-keto-cholestérol peut induire l'activation de la signalisation Hh même en absence de ligands Hh (Raleigh et al., 2018). Cette activation est associée à une localisation membranaire de Smo. Tout comme les récepteurs FZD, Smo possède sur sa partie amino-terminale et extracellulaire un domaine riche en cystéines (Cystein-rich domain, CRD). Le CRD fut identifié comme le site de liaison de ces oxystérols, nécessaire à l'activation de la signalisation par ces molécules, mais aussi responsable de la signalisation induite par Shh. Plusieurs inhibiteurs agissant sur ce domaine CRD ont été produits (comme le 20-keto-yne) en se calquant sur la structure des oxystérols activateurs de Smo et offrent d'autres outils pharmacologiques pour moduler la voie de signalisation Hh (Nachtergaele et al., 2013).

B) Signalisation

On distingue classiquement trois modes de signalisation Hh (Figure 8, Figure 9) :

- La voie canonique, dépendante de Ptch-1, de Smo et des facteurs de transcription Gli
- La voie non canonique de Type I, dépendante de Ptch-1, mais indépendante de Smo et de Gli.

- La voie non canonique de type II, dépendante de Ptch-1 et Smo, mais indépendante de Gli.

a) Voie canonique

La voie canonique est connue depuis le plus longtemps et la mieux décrite. Elle est dépendante de la liaison d'un ligand Hh à Ptch-1. En absence de ligand, le récepteur transmembranaire Ptch-1 réprime la protéine transmembranaire Smo et la maintient séquestrée dans le cytosol, par un mécanisme encore inconnu (seuls des modèles hypothétiques existent actuellement). Dans cette configuration, l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription Gli est réprimée par le complexe protéique Sufu (Suppressor of Fused), bien que le mécanisme ne soit pas encore très bien connu. Lors de la liaison d'un ligand à Ptch-1, la répression est levée et Smoothed est transloqué à la membrane plasmique, et va à son tour lever l'action de Sufu. Les facteurs Gli peuvent alors activer leurs cibles transcriptionnelles, parmi lesquelles on retrouve notamment Ptch-1 et Gli1 (Briscoe and Thérond, 2013).

1 - Les facteurs Gli

Ils sont au nombre de 3 : Gli1, Gli2, Gli3. Ce sont des facteurs de transcription à doigt de zinc. En absence de ligand, les facteurs Gli sont phosphorylés par diverses kinases puis ubiquitinylés, avant d'être dirigés vers le protéasome. Gli1 est totalement dégradé, mais Gli2 et Gli3 ne vont être que partiellement dégradés et leur domaine amino-terminal est libéré, lequel est un répresseur transcriptionnel.

En présence de ligands, Smo active la kinase STK36 ; celle-ci phosphoryle SuFu, ce qui provoque sa dissociation des facteurs Gli et leur translocation dans le noyau où ils peuvent alors activer leurs cibles transcriptionnelles.

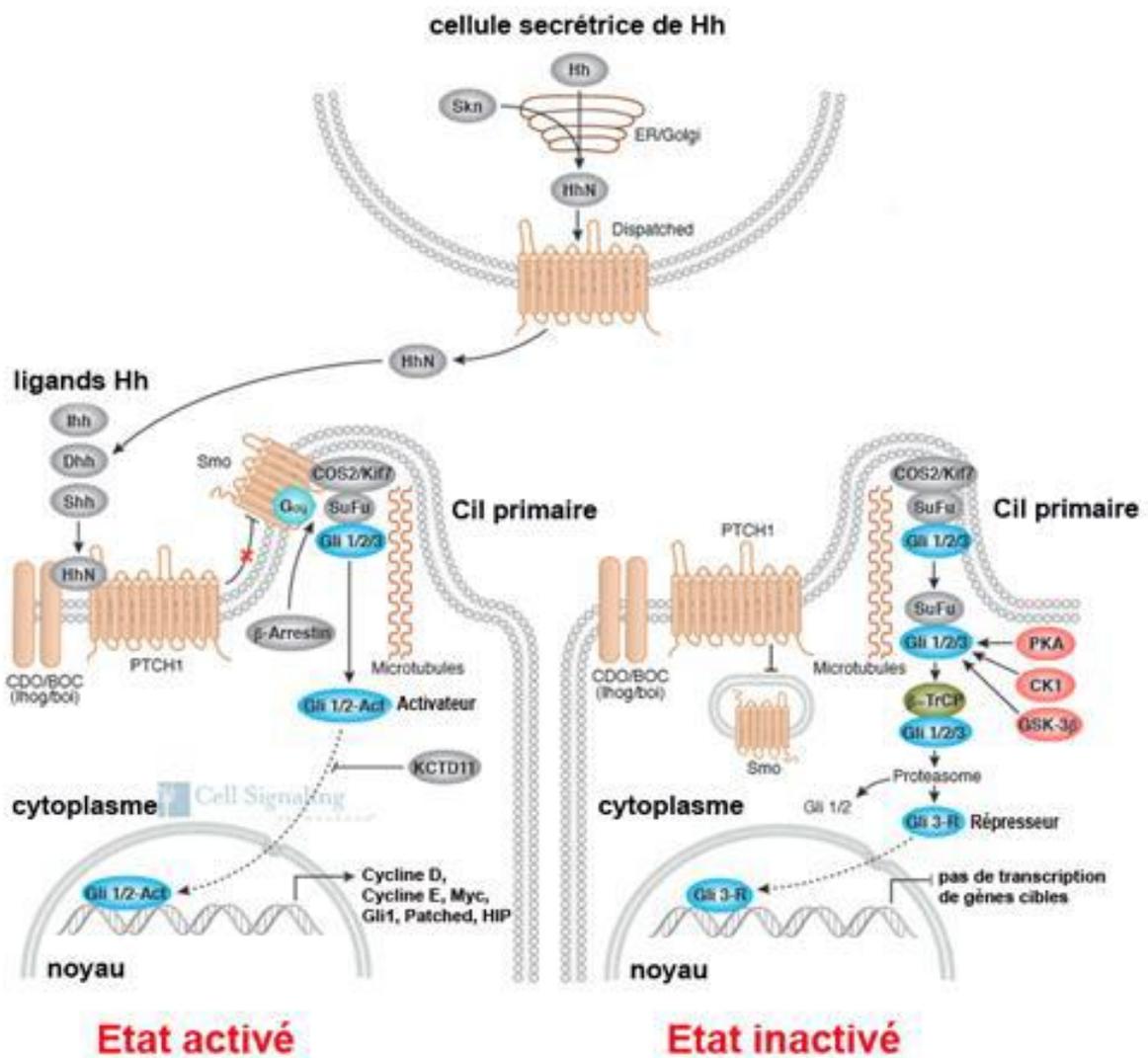


Figure 8: La signalisation Hh, d'après (cellsignal.com).

2 - L'inhibition de Smoothened par Patched-1

On ne sait pas encore par quel mécanisme Ptch-1 réprime la localisation et l'activité de Smoothened. Cependant, plusieurs modèles théoriques, qui ne sont pas nécessairement exclusifs, ont été proposés :

- Ptch-1 réprime Smo par une activité catalytique ;
- Ptch-1 médie le transfert d'un messenger extracellulaire dans la cellule, ou l'inverse, pour inhiber Smo ;
- Ptch-1 provoque la modification de la composition lipidique locale de la membrane plasmique afin de prévenir la translocation membranaire de Smo.

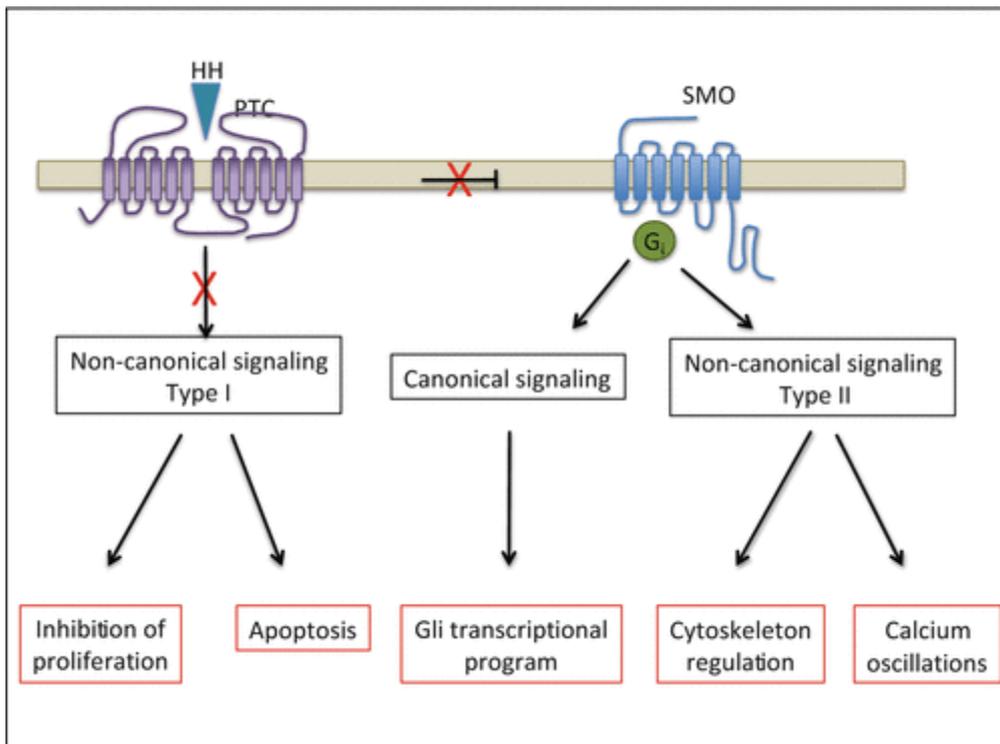


Figure 9 : Les voies Hh canoniques et non canoniques (Riobo, 2015)

b) Voie non canonique de type I

La voie non canonique de type I est indépendante de Smo et va plutôt faire intervenir des partenaires de Ptch-1. En effet, plusieurs études ont amené à identifier Ptch-1 comme un régulateur de l'apoptose. En effet, Ptch-1 porte sur son extrémité carboxyterminale un site substrat au clivage par les caspases, notamment la caspase-3, (Thibert et al., 2003). Et il fut ultérieurement démontré que l'exposition de ce site est suffisante pour induire l'apoptose. Ptch-1 peut en effet recruter un complexe protéique d'apoptose DRAL/Caspase-9/TUCAN-1 (Mille et al., 2009). Un autre partenaire de Ptch-1 est la cycline B1 phosphorylée (Barnes et al., 2001). Par cette interaction, Ptch-1 régule le cycle cellulaire en prévenant la localisation nucléaire de la cycline B1. Cet effet du récepteur est dépendant de la phosphorylation de la cycline B1 (Barnes et al., 2005) (Figure 8).

c) Voie non canonique de type II

La voie non canonique de type II est dépendante de la levée de l'inhibition de Smo par Ptch-1 et fait appel à l'activation d'autres voies par Smoothened, notamment à l'activation d'une protéine G. La protéine Gi associée à Smo peut mener à l'activation de petites GTPases, comme RhoA, ce qui stimule la migration des fibroblastes *in vitro*. Par ailleurs, cet effet n'est pas inhibé par Gli-3R, indiquant qu'il est indépendant de la voie canonique (Polizio et al., 2011). Le mécanisme par lequel Smo active RhoA n'est cependant pas tout à fait connu. Comme d'autres RCPG, Smo engage des voies de signalisations dépendantes du calcium (PKC), notamment par la production d'inositol triphosphate (Belgacem and Borodinsky, 2011) (Figure 8).

d) Une signalisation autonome indépendante de Ptch-1

Le modèle classique de la signalisation Hh implique une cellule émettrice sécrétant ou portant à sa surface les ligands Hh et une cellule réceptrice portant les récepteurs Ptch-1 ou Ptch-2. Cependant, des fibroblastes déficients pour Ptch-1 et Ptch-2 mais exprimant Smo montrent une activité transcriptionnelle Gli s'ils sont transfectés pour surexprimer un ligand Hh. Ces cellules répondent donc aux ligands qu'elles produisent, de façon indépendante des récepteurs Ptch-1 et 2. De plus il apparaît que la forme FL des ligands soit suffisante pour induire cette signalisation, suggérant qu'une sécrétion des ligands n'est peut-être pas indispensable. Les auteurs de ces expériences montrent également que Smo et notamment son domaine CRD sont nécessaires à la signalisation (Casillas and Roelink, 2018).

e) Efficacité respective des ligands

Il est généralement considéré que les 3 ligands induisent les mêmes effets, et que la différence dans leurs rôles respectif dépend essentiellement de leur territoire d'expression. En effet, de nombreuses études soulignent une redondance entre les effets des différents ligands.

Les trois ligands Hh, sous leur forme N-Hh, ont une affinité similaire pour leur récepteur Ptch-1. Cependant, N-Shh, N-Ihh et N-Dhh n'ont pas la même capacité d'activation de la voie Hh dans la cellule cible. En effet, *in vitro*, pour induire la

signalisation canonique dans une lignée de cellules mésenchymateuse, N-Shh est le ligand qui active le plus fortement la voie, N-Ihh a un effet moins important, et N-Dhh quant à lui a un potentiel encore inférieur aux deux autres ligands ; Shh, Ihh, Dhh présentent une EC_{50} de respectivement 80 nM, 500 nM et 5 μ M. *In vivo*, en fonction de l'effet observé pendant l'embryogénèse, leurs potentiels respectifs varient, mais N-Shh reste le ligand le plus efficace (Pathi et al., 2001). Il est nécessaire de préciser que la majorité des études portant sur les effets des différents ligands utilisent des protéines recombinantes sous la forme N-Hh. Si on sait que Shh existe et agit majoritairement sous cette forme courte, on disposait en revanche de moins d'informations quant à ses homologues Dhh et Ihh, nettement moins étudiés. Aussi, il était considéré que ce processus de maturation évoqué plus tôt s'applique à chacun des ligands. Cependant, des chercheurs se sont intéressés aux effets de ces ligands lorsqu'ils sont exprimés sous leur forme FL et leur capacité à induire la signalisation canonique. *In vitro*, ils montrent qu'aussi bien Shh que Ihh sont capable d'agir d'induire la signalisation s'ils sont initialement exprimés sous leur forme FL. La réponse est beaucoup plus faible, voire inexistante, selon le type cellulaire utilisé, pour Dhh. Plus encore, à l'aide de milieux conditionnés, ils montrent qu'une signalisation paracrine est possible pour les cellules exprimant FL-Shh et FL-Ihh (néanmoins plus faible que FL-Shh), mais pas FL-Dhh. FL-Dhh est revanche capable d'induire un signal en co-culture, si le contact cellulaire est possible. Par ailleurs, cette action est dépendante du domaine carboxy-terminal de Dhh, et Dhh existe majoritairement sous sa forme FL. Les ligands Hh ont donc des propriétés différentes en fonction de leur nature et de leur état de maturation post-traductionnelle (Pettigrew et al., 2014).

C) La voie Hh dans le développement

Le rôle par excellence de la voie Hh, et le mieux décrit, est son intervention durant le développement embryonnaire, notamment dans la régulation des territoires mésenchymateux et épithéliaux. Cette voie intervient dans le développement et l'organisation de nombreux organes, des membres, des réseaux vasculaires et neuraux. Les souris $Shh^{-/-}$ et $Ihh^{-/-}$ sont létales, mais les souris $Dhh^{-/-}$ sont viables, bien qu'atteintes d'anomalies gonadiques et nerveuses. Les ligands Hh participent à

3 grands processus au cours du développement embryonnaire : l'organisation spatiale de l'embryon, la spécification cellulaire et la régulation de la différenciation et de la prolifération cellulaire.

a) Organisation spatiale de l'embryon

Shh joue un rôle dans l'organisation spatiale précoce de l'embryon. La protéine est sécrétée du nœud de Hensen vers le côté gauche de l'embryon et participe donc à la mise en place de l'axe droite-gauche (Tanaka et al., 2005). Il intervient également dans l'organisation dorso-ventrale, plus la concentration en Shh est importante, plus l'identité des neurones est ventrale (Balaskas et al., 2012). Enfin, Shh intervient dans la polarité des membres et la mise en place des phalanges et des doigts : le membre antérieur des souris $Shh^{-/-}$ présente une absence d'arche digitale à l'exception d'une unique phalange terminale (Panman and Zeller, 2003).

b) Différenciation, migration, prolifération cellulaire

La migration et la différenciation de nombreux types cellulaires est régulée par la voie Hh. Notamment, les précurseurs neuronaux granulaires cérébelleux à l'origine des cellules constitutives du cervelet et les progéniteurs de la zone ventriculaire (Vaillant and Monard, 2009). La régulation de la prolifération et de la réorganisation du cytosquelette par la voie Hh est nécessaire à mise en place et l'organisation des axones, dendrites et synapses (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2009). La voie Hh participe également à la migration et la prolifération cellulaire des cellules neuronales lors du développement de la face, notamment lors de la formation du ganglion rétinien et du modelage craniofacial, et elle est indispensable à la différenciation cellulaire dans la formation des photorécepteurs.

c) Développement vasculaire

La voie de signalisation Hh intervient dans la mise en place initial du système vasculaire. Le sac vitellin ou vésicule ombilicale est une poche membraneuse attachée à l'embryon, formée par des cellules hypoblastiques. C'est dans le sac vitellin que sont initiés les premiers vaisseaux sanguins et des embryons murins

déficients en Smo présentent une absence totale de vaisseaux sanguins formés dans le sac vitellin à E9.5, tandis que les embryons de souris *Ihh*^{-/-} ont un nombre réduit de vaisseaux, à E10.5 et plus petits (Byrd et al., 2002). *Ihh* avait déjà été proposé comme un ligand activant l'hématopoïèse et la vasculogénèse, mais ces résultats suggèrent que d'autres ligands Hh interviennent dans ce processus et compensent partiellement la perte d'*Ihh*. Par la suite, il a été montré que *Shh* est nécessaire et suffisant à la mise en place de l'aorte dorsale chez l'embryon de poulet ou de souris (Vokes et al., 2004). *Shh* est également impliqué dans l'organisation vasculaire pulmonaire et son absence dans l'épithélium pulmonaire provoque une réduction du nombre de vaisseaux dans le poumon à E18.5 (Miller et al., 2004).

D) La voie Hh et l'angiogénèse chez l'adulte

De nombreux résultats indiquent le rôle de la voie Hh dans la régulation de l'angiogénèse, essentiellement pathologique, notamment dans le cadre de l'ischémie et du cancer.

a) Angiogénèse ischémique

Au cours de l'ischémie du membre inférieur (Hind Limb Ischemia – HLI), l'expression de *Shh* est augmentée. Le rôle de *Shh* dans l'angiogénèse réparatrice semble majeur puisque les premières études ont montré que le blocage de la voie *Shh* par un anticorps bloquant (5E1) réduit le processus (Pola Roberto et al., 2003) et qu'à l'inverse, l'administration systémique de *Shh* recombinant augmente l'angiogénèse post-ischémique (Pola et al., 2001). Cependant, de façon contradictoire, nos résultats récents montrent que l'angiogénèse post-ischémique est augmentée chez des souris déficientes pour *Shh* (défiance induite chez la souris adulte) (Caradu Caroline et al., 2018) suggérant qu'il existe une différence de fonction entre les protéines *Shh* exogène et endogène. Par ailleurs, il apparaît que l'activation de la voie de signalisation Hh dans les CE n'intervient pas dans l'angiogénèse ischémique. En effet, il a été montré que l'angiogénèse post-ischémique n'est pas affectée chez des souris dont les CE sont déficientes en Smo (Gupta et al., 2018; Renault et al., 2013).

b) Angiogenèse tumorale

Une suractivation de la voie de signalisation Hh a été proposée à plusieurs reprises comme en partie responsable de l'invasion vasculaire d'une tumeur. En effet, des inhibiteurs de Smo réduisent la densité vasculaire de différentes tumeurs surexprimant des ligands Hh (Geng et al., 2007; Kuroda et al., 2017). Il a aussi été montré que la suractivation de la voie de signalisation Hh dans les tumeurs gliales augmente l'expression du VEGFA et de MMP favorisant le remodelage de la matrice extra-cellulaire (Cui et al., 2012).

E) La voie de signalisation Hh et la BHE

Le rôle de la voie de signalisation Hh dans la BHE fait l'objet d'une littérature abondante. Toutefois ce rôle reste controversé, certains résultats décrivant un rôle de stabilisation et d'autres de déstabilisation de la BHE.

a) La voie Hh stabilise la BHE

Le rôle de la voie de signalisation Hh dans la régulation ou la mise en place de la BHE a fait l'objet de nombreuses études. J.L. Alvarez a notamment souligné l'importance de cette voie pour la BHE. L'étude d'embryons de souris déficientes en Shh révèle une perméabilité vasculaire accrue dans le cerveau de ces souris, suggérant une perturbation de la BHE. De même, l'administration intra-péritonéale de cyclopamine, bloquant la voie de signalisation Hh, augmente la perméabilité vasculaire cérébrale chez la souris adulte sauvage. Il a aussi été montré que les CE humaines de BHE ont une expression accrue des protéines de jonctions (Claudin-5, Occludine), et une résistance trans-endothéliale plus importante (méthode d'évaluation de la perméabilité trans-endothéliale *in vitro*) lorsqu'elles sont stimulées par du Shh humain recombinant ou traitées par du milieu conditionné enrichie en Shh (astrocytes). Ces travaux ont ainsi mis en lumière l'intégration d'un signal Hh par les CE impliqué dans la régulation de la BHE. Ces mêmes auteurs suggèrent que la stimulation de la voie Hh par du Shh recombinant, un agoniste de la voie (purmorphamine) ou du milieu conditionné astrocytaire réduit l'activité pro-inflammatoire des CE (expression de la cytokine IL-8 et de la protéine d'adhésion

ICAM-1), tandis qu'un antagoniste (cyclopaamine) prévient l'effet anti-inflammatoire du milieu conditionné astrocytaire (Alvarez et al., 2011).

Il a été montré au sein de l'Inserm U1034 que des souris déficientes pour Dhh présentent des anomalies vasculaires au niveau des nerfs, à savoir une augmentation de la densité et de la perméabilité vasculaires. L'étude a été menée ensuite à un niveau plus spécifique, et l'élimination de Smo dans les CE de souris provoque également une augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale, indiquant donc, comme l'article précédent, que la signalisation Hh au sein même de la CE participe au maintien de la barrière endothéliale (Chapouly et al., 2016)

Nous avons aussi montré que les CE expriment Dhh, et que ce Dhh endothélial est un régulateur de la BHE et de l'inflammation. En effet, des souris dont les CE sont déficientes pour Dhh (souris Dhh^{CEKO}) montrent une augmentation de la perméabilité vasculaire cérébrale et sont plus prônes à l'activation inflammatoire endothéliale, c'est-à-dire que l'infiltration immunitaire est augmentée dans le poumon dans un contexte d'inflammation systémique (Caradu Caroline et al., 2018). Les études portant sur les effets de la voie de signalisation Hh sur les CE s'intéressent essentiellement aux effets de Shh, qu'il soit recombinant ou produit par un autre type cellulaire (astrocytes). L'existence de Dhh dans les CE suggère l'existence d'une signalisation Hh endothéliale autonome, ce présente un intérêt majeur dans la compréhension des mécanismes par lesquels cette voie de signalisation agit sur le système vasculaire.

b) Hh et pathologie de la BHE

Une autre équipe a montré que dans un modèle d'AVC, qui provoque une perturbation de la BHE, l'administration intraveineuse de purmorphamine, un agoniste de Smo, réduit la perméabilité vasculaire, améliore la performance cognitive des souris opérées et réduit la taille de la zone infarctée. Cette administration a également pour effet de réduire la perméabilité de la BHE. Une augmentation de l'expression de Shh après chirurgie a également été détectée (Chechneva et al., 2014). Ces résultats et d'autres indiquent que les processus physiopathologiques affectant la BHE interviennent notamment au niveau de la signalisation Hh entre

astrocytes et CE. En effet, l'expression de Shh est augmentée dans la sclérose en plaque (Alvarez et al., 2011) et dans un modèle d'AVC (Chechneva et al., 2014), vraisemblablement pour réguler l'ouverture de la BHE due respectivement à la neuroinflammation et l'ischémie. A l'inverse, des processus pathologiques semblent être partiellement médiés par une diminution de l'expression de Shh. L'expression de Shh est réduite dans le cadre de l'infection par le VIH de souris humanisées et le traitement au SAG inhibe l'ouverture de BHE normalement observée (Singh et al., 2016). De même, *Mycobacterium tuberculosis* perturbe la BHE dans un modèle *in vitro* de BHE (Co-culture d'astrocytes et de CE), mais cet effet est réduit par traitement à la purmorphamine. L'effet de *M. tuberculosis* est en partie médié par la répression de l'expression astrocytaire de Scube2, un acteur de la sécrétion de Shh.

Enfin, dans un modèle de souris diabétiques, l'expression de Dhh est réduite, ce qui est associé à une augmentation de la perméabilité vasculaire endoneurale et une réduction de l'expression de la claudin-5. Ces effets et d'autres effets liés à la pathologie nerveuse sont réduits par une administration systémique de SAG (Chapouly et al., 2016).

c) La voie Hh déstabilise la BHE

Contrairement à ce qui a été évoqué précédemment, d'autres résultats indiquent que la voie Hh a un effet négatif sur l'intégrité de la BHE. Les travaux de l'équipe de J. Gavard semblent indiquer un tel effet dans le contexte du glioblastome. Ces travaux indiquent que des cellules tumorales issues de patients sécrètent des facteurs qui déstabilisent la barrière endothéliale *in vitro* ou *in vivo* dans un modèle de xénogreffe. Parmi les facteurs sécrétés figurent Dhh, et la répression de l'expression de Dhh dans ces cellules tumorales abolit ces effets. De façon intéressante, les cellules tumorales induisent également l'expression de Ptch-2 par les CE, et l'axe Dhh/Ptch-2 est responsable de cet effet sur la BHE. Enfin, contrairement à ce que suggèrent les travaux d'Alvarez décrits précédemment, le traitement de CE par des microparticules porteuses de Shh augmente l'expression d'ICAM-1 *in vitro* (Soleti et al., 2009).

F) Signalisation Hh dans les CE

Les CE ne correspondent pas à la conception habituelle de la signalisation Hh où une cellule épithéliale sécrète un ligand Hh agissant sur une cellule mésenchymateuse portant les récepteurs Ptch-1 ou Ptch-2, puisqu'elles expriment Dhh et le récepteur Ptch-2. En effet, les CE expriment à la fois le ligand et le récepteur, c'est-à-dire Dhh et Ptch-1, ainsi que Smo. Il est alors raisonnable de supposer qu'elles sont capables d'une signalisation autocrine.

L'équipe de N.A. Riobo a travaillé à éclaircir le mécanisme de signalisation Hh dans les CE. Celles-ci ne suivent pas un type de signalisation canonique : le traitement par Shh ou la purmorphamine n'augmente pas l'expression de gènes cibles des facteurs Gli, à savoir Gli-1 et Ptch-1. En revanche, le traitement par du Shh recombinant diminue l'activité de la caspase-3, un médiateur de l'apoptose, qui est un interactant de Ptch-1. Cependant, l'activation ou l'inhibition de Smo n'a aucun effet sur ce paramètre. Il existe donc une signalisation non canonique de type I (dépendante de Ptch-1, indépendante de Smo) dans les CE. Toutefois, elles subissent également une signalisation non canonique de type II. Smo est en effet nécessaire à la formation de fibres de stress et à la tubulogénèse suite à l'activation de la voie Hh. Cet effet est dépendant de l'activité de Smo en tant que RCPG et passe par l'activation de RhoA, effet inhibé par la cyclopamine (Chinchilla et al., 2010) et donc dépendant de Smo. Une difficulté apportée par les voies non canoniques est l'absence de marqueurs spécifiques connus, par opposition à la voie canonique où Ptch-1 et Gli-1 sont des cibles transcriptionnelles fiables de la voie Hh.

G) Les approches thérapeutiques de la voie Hh

La voie Hh présente un intérêt croissant quant à la thérapie des pathologies cardiovasculaires. L'administration de Shh a été précédemment rapportée comme ayant un effet pro-angiogénique (Pola et al., 2001), et la thérapie génique Shh améliorer la régénération et la néovascularisation du cœur dans un modèle murin d'ischémie myocardique, suggérant la possibilité de cibler la voie Hh chez les individus atteints d'ischémie myocardique aiguë ou chronique (Kusano et al., 2005). Il a aussi été évoqué précédemment qu'un traitement SAG permet de réduire la neuropathie vasculaire diabétique (Chapouly et al., 2016), et que la purmorphamine

a un effet neuroprotecteur dans un modèle d'ischémie cérébrale (Chechneva et al., 2014). C'est néanmoins avant tout pour ses effets pro-angiogénique et vasculoprotecteur que la voie Hh est discutée comme cible thérapeutique dans des maladies cardiovasculaires (Cristofaro and Emanuelli, 2009; Dunaeva and Waltenberger, 2017; Wang et al., 2017). Eclaircir les mécanismes par lesquels la voie Hh agit sur le système vasculaire présente donc un intérêt majeur.

II/ Raisonnement et Objectif

La voie de signalisation Hh joue indiscutablement un rôle dans le maintien de la BHE mais des contradictions semblent exister au sein de la littérature. Le but de cette thèse est de clarifier le rôle des ligands Hh dans la régulation de l'intégrité de la BHE dans des conditions physiologiques et dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives, notamment la sclérose en plaque et la démence.

L'essentiel des travaux publiés quant à l'effet de la voie de signalisation Hh sur la BHE ont porté sur l'étude de Shh. Les travaux d'Alvarez et al., notamment, rapportent que Shh est nécessaire à la mise en place de la BHE chez l'embryon de souris, et que l'inhibition pharmacologique de la voie de signalisation Hh chez des souris adultes augmente la perméabilité vasculaire cérébrale. Shh est donc proposé comme étant nécessaire au maintien de la BHE chez l'adulte. (Alvarez et al., 2011).

Les résultats précédents du laboratoire montrent que Dhh est exprimé par les CE de la BHE et que la suppression de la signalisation Hh endothéliale par la délétion aussi bien de Dhh que de Smo dans les CE entraîne une ouverture de la barrière endothéliale (Caradu Caroline et al., 2018; Chapouly et al., 2016)

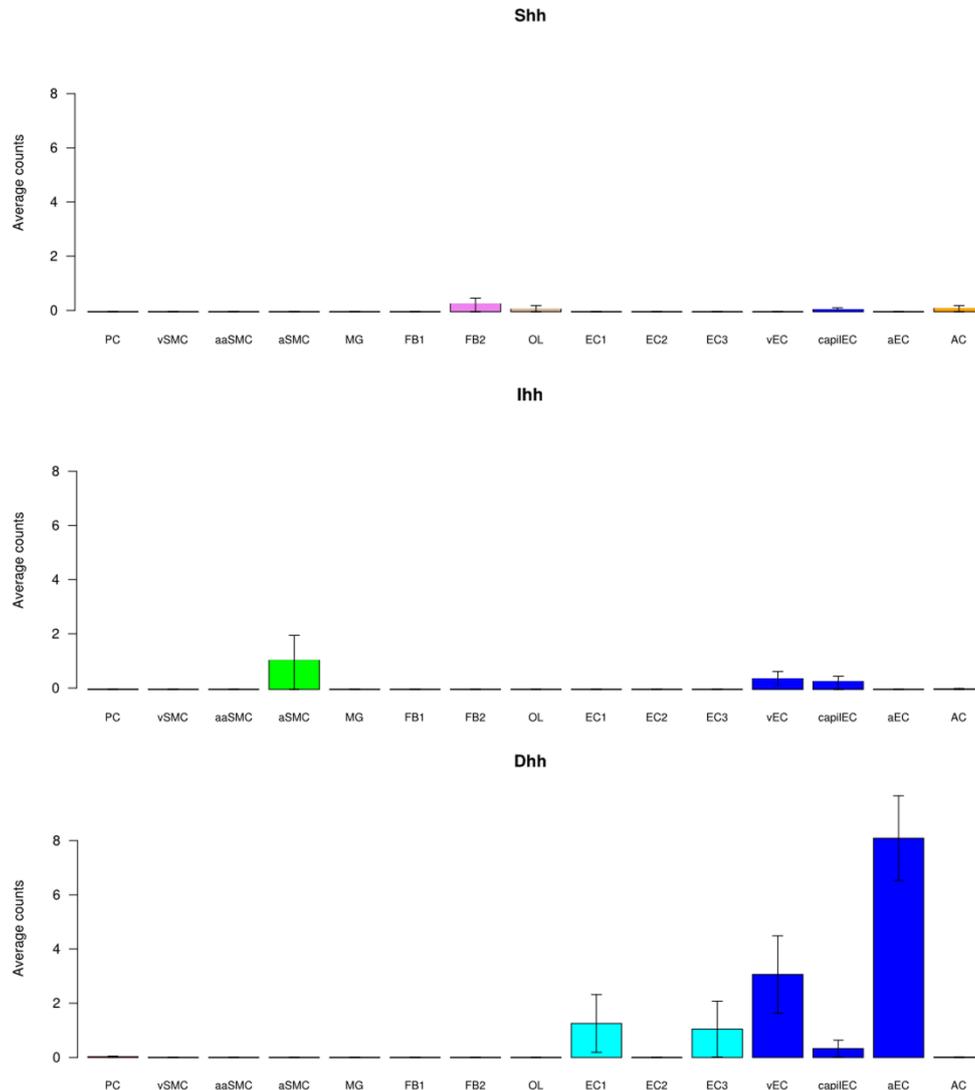


Figure 10 : Expression des ligands Hh dans les cellules associées aux vaisseaux sanguins cérébraux, adapté de <http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>. PC: péricyte ; vSMC : cellule musculaire lisse (CML) veineuse ; aaSMC : CML artériolaire ; aSMC : CML artérielle ; MG : microglie ; FB1-2 : Fibroblaste-like Type 1-2 ; OL : oligodendrocyte ; EC1-2-3 : CE type 1-2-3 ; vEC :CE veineuse ; capilEC : CE capillaire ; aEC : CE artérielle ; AC : astrocyte.

Enfin, le résultat de l'analyse transcriptomique de l'expression des gènes dans les cellules vasculaires et les cellules associées aux vaisseaux dans le cerveau de souris adulte réalisée par *single cell sequencing* dans le laboratoire de Christer Betsholtz confirme nos résultats en démontrant que l'ARNm Dhh est détectée dans les cellules endothéliales de la BHE. Il apparaît notamment que dans les cellules vasculaires et paravasculaires, Dhh semble être le ligand Hh le plus fortement exprimé, tandis que les niveaux d'expression de Shh et Ihh sont beaucoup plus faibles (Figure 10, (He et al., 2018; Vanlandewijck et al., 2018)).

Le premier objectif de ma thèse fut de vérifier le rôle physiologique de Dhh endothélial quant à la régulation de la BHE, d'étudier son mode d'action ainsi que d'évaluer les conséquences physiopathologiques et neurologiques de la délétion de Dhh dans les CE.

Le second objectif a été d'évaluer le rôle de Dhh et de Shh dans la physiopathologie des maladies neurodégénératives. Dans ce but, nous avons cherché à savoir si les expressions de ces deux protéines sont modulées dans des conditions pathologiques. Ceci nous a amené à étudier les conséquences de la perte de Dhh dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer et les conséquences de la perte de Shh dans la physiopathologie de la SEP. Dernièrement, nous avons étudié le mécanisme d'action de Shh quant à son effet sur la BHE.

III/ Matériel et méthodes

Les méthodes utilisées qui ne sont pas détaillées ici sont décrites dans les manuscrits.

A) Animaux

a) Souris C57BL/6J

Les souris de fond génétique C57BL/6J non génétiquement modifiées ont été utilisées en guise d'animaux sauvage.

b) Souris Dhh-CEKO ou $Cdh5-Cre^{ER/T2}$; $Dhh^{flox/flox}$

Les souris $Cdh5-Cre^{ER/T2}$ ont été obtenues en collaboration avec R.H. Adams. Ces souris possèdent un transgène codant pour une Cre-recombinase modifiée sous le contrôle du promoteur $Cdh5$ (VE-cadhérine) spécifiquement actif dans les CE. Cette Cre-recombinase est fusionnée à un récepteur aux œstrogènes muté sensible au tamoxifène. L'injection de tamoxifène (100 µg/jour pendant 5 jour) permet la translocation nucléaire de la recombinaise et la recombinaison génétique dépendante de séquences spécifiques loxP. Les souris $Dhh^{flox/+}$ ont été obtenues générées à l'Institut Clinique de la Souris. Ces souris possèdent un gène Dhh modifié génétiquement, dont les exons 2 et 3 sont flanqués par des séquences loxP dans le même sens. Par croisements successifs de ces deux lignées, les souris Dhh-CEKO ($Cdh5-Cre^{ER/T2}$; $Dhh^{flox/flox}$) et les souris contrôles ou Dhh-Ctrl ($Dhh^{flox/flox}$) ont été obtenues. Après injection de tamoxifène, les souris Dhh-CEKO subissent donc une recombinaison de la séquence du gène Dhh , spécifiquement dans les CE, afin d'obtenir des souris dont les CE sont déficientes pour Dhh (Figure 11).

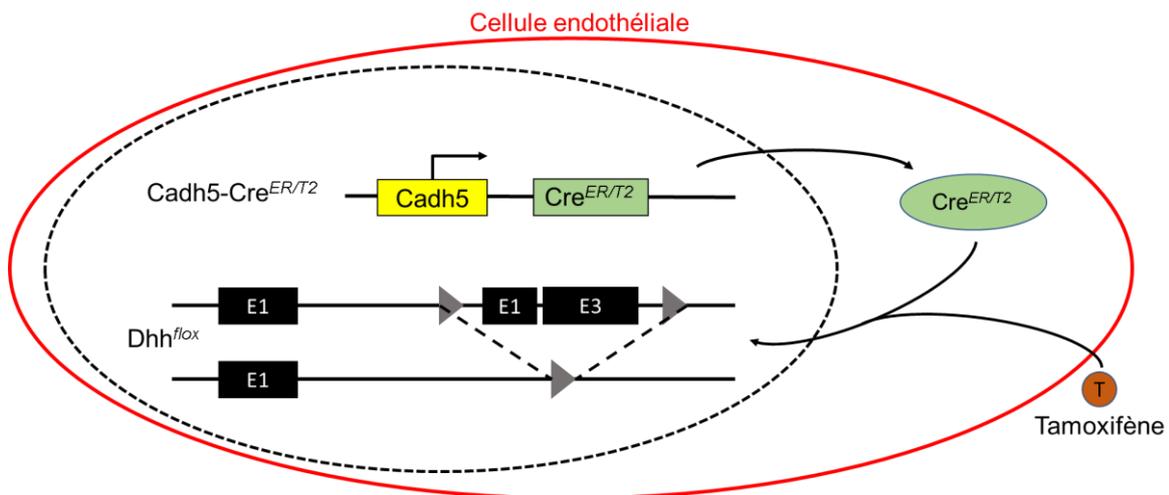


Figure 11 : Schéma du knockout endothélial de Dhh.

c) Souris Smo-CEKO ou Cadh5-Cre^{ER/T2} ; Smo^{flox/flox}

Les Souris Smo^{flox/+} ont été obtenues auprès de laboratoires Jackson. Ces souris ont été modifiées génétiquement afin que le locus de Smo soit encadré par des séquences loxP. Par croisement successifs avec les souris Cadh5-Cre^{ER/T2}, les souris Smo-CEKO (Cadh5-Cre^{ER/T2} ; Smo^{flox/flox}) et les souris contrôles ou Smo-Ctrl (Smo^{flox/flox}) ont été obtenues. De façon similaire au modèle précédemment évoqué, Ces souris possèdent des CE déficientes pour Smoothened après injection de tamoxifène (Figure 12).

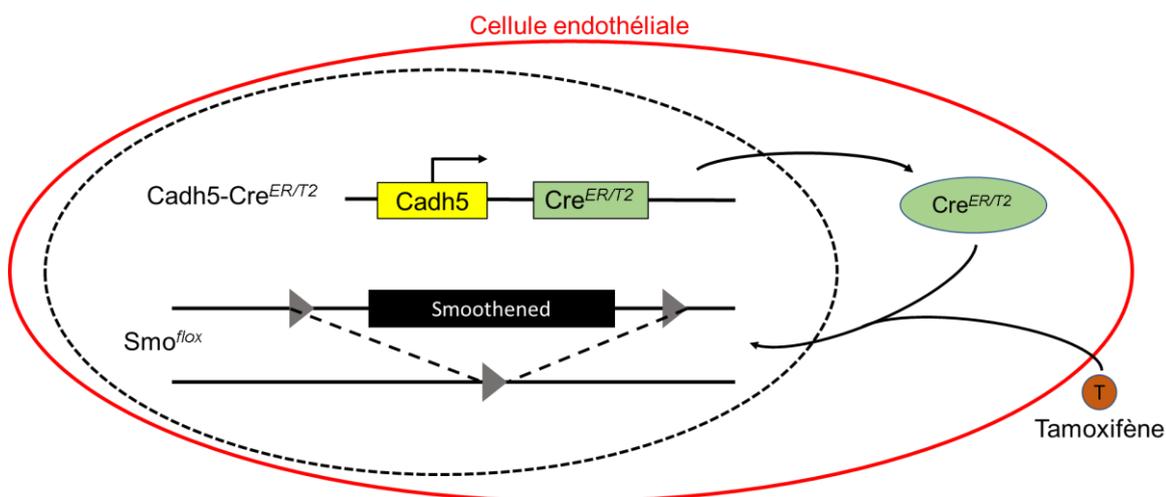


Figure 12 : Schéma du knockout endothélial de Smoothened.

d) Souris APPSwe/PSEN1de9 (APP/PS1)

Ces souris ont été modifiées génétiquement de façon à posséder des gènes humains mutés connus dans les formes familiales de la MA : Swedish (mutation du gène codant l'APP amenant à une surexpression de l'APP humaine) et une mutation du gène codant la préséniline-1. Ces souris développent spontanément la MA et ont été croisées avec les souris $Cadh5-Cre^{ER/T2}$ et $Dhh^{flox/flox}$ afin d'obtenir les souris APPD-Ctrl (APP/PS1 ; $Dhh^{flox/flox}$) et APPD-KO (APP/PS1 ; $Cadh5-Cre^{ER/T2}$; $Dhh^{flox/flox}$).

e) Hébergement

Les souris sont hébergées en animalerie conventionnelle avec une photopériode de 12h, en cages communes sur portoirs ventilés, ont accès à de l'enrichissement dans chaque cage, et à l'eau et à la nourriture *ad libitum*, en accord avec les protocoles internationaux d'hébergement des animaux de laboratoire.

B) EAE et neuroinflammation comme modèle d'ouverture de la BHE.

Nous avons évoqué en introduction que la neuroinflammation, l'expression de Shh est activée dans les astrocytes, et l'ouverture de la BHE joue un rôle important dans la neuroinflammation et la SEP. Pour ces raisons, la pathologie neuroinflammatoire semble être un modèle intéressant à l'étude du rôle de la voie Hh sur la BHE. C'est pour cette raison que deux modèles sont utilisés ici : le modèle d'EAE décrit dans l'article 2 provoque une réponse auto-immune chronique dirigée contre la myéline chez les souris utilisées, mimant donc l'étiologie de la SEP, et ces souris développent une démyélination antérograde. L'autre modèle est un modèle de neuroinflammation aiguë, qui consiste en l'injection stéréotaxique d'un adénovirus codant pour l'expression de IL-1 β , cytokine provoquant une neuroinflammation locale aiguë et notamment une forte activation astrocytaire. Ces deux modèles provoquent une ouverture de la barrière hémato-encéphalique.

C) Procédures chirurgicales et manipulations animales invasives

a) Injection de tamoxifène

La solution injectable de tamoxifène est préparée à partir de poudre de tamoxifène (Sigma-Aldrich #T5648) diluée à 1mg/mL dans un mélange d'huile de tournesol autoclavée et d'éthanol 96% (9:1). A 8 semaines après la naissance, les souris concernées sont injectées une fois par jour pendant 5 jour par voie intra-péritonéale avec 100 µL de solution.

b) Mesure du flux sanguin cérébral cortical par laser doppler trans-crânial

30 minutes avant chirurgie, Les souris sont analgésiées par une injection sous-cutanée de buprénorphine de bupréorphine 50µg/kg (Vetergesic). La souris est anesthésiée par inhalation d'isoflurane (induction avec 4% d'isoflurane puis maintien à 2,5%). La peau du crâne de la souris est incisée à l'aide de ciseaux de chirurgie et réclinée afin d'exposer les os supérieurs du crâne. Ce dernier est hydraté afin de le rendre plus transparent, et le flux sanguin cérébral est ensuite mesuré par laser doppler trans-crânial (Doppler Moor LDI-2®). L'animal est ensuite suturé avec du fil 6/0 et remis en cage. Les premiers jours suivant la procédure, l'intégrité de la suture et le bien-être de l'animal sont contrôlés.

c) Test de néovascularisation cornéenne

1 - Préparation des pellets

Les pellets sont préparés à partir d'une solution de 5 µg de VEGFA (Shenandoah biotechnology) ou de Rec-NShh (Shenandoah biotechnology) dilués dans 10 µL de PBS, additionnée de 2,5 mg de complexe sucrose octasulfate-aluminium (Sigma-Aldrich) et 10µL de hydron 12% dilué en éthanol. Le mélange est déposé sur les deux faces d'une maille de nylon de 400 µm (Sefar America) ensuite laissée à sécher.

2 - Procédure chirurgicale

Les souris sont préalablement analgésées par une injection sous-cutanée de buprénorphine (vetergesic) 50µg/kg. Elles sont ensuite anesthésiées par une injection intrapéritonéale de mélange kétamine (100mg/kg) et xylazine (10 mg/kg). Les yeux des souris sont localement anesthésiés avec de la Prorocaïne™ 0,5%. Le globe oculaire est exorbité à l'aide d'une pince en prenant soin de ne pas abîmer les vaisseaux limbiques à la base du globe. Le dessèchement de l'œil est prévenu par application de solution saline stérile. A l'aide d'une lame chirurgicale, une incision superficielle linéaire est réalisée sur la cornée. Un couteau à cataracte Greafe est ensuite utilisé pour créer une « poche » au niveau de l'incision. Le pellet préalablement hydraté par une goutte de solution saline est ensuite délicatement inséré dans la poche à l'aide du couteau à cataracte Greafe.

Neuf jours après implantation, les souris sont sacrifiées, les yeux récupérés et fixés en formaline 2%.

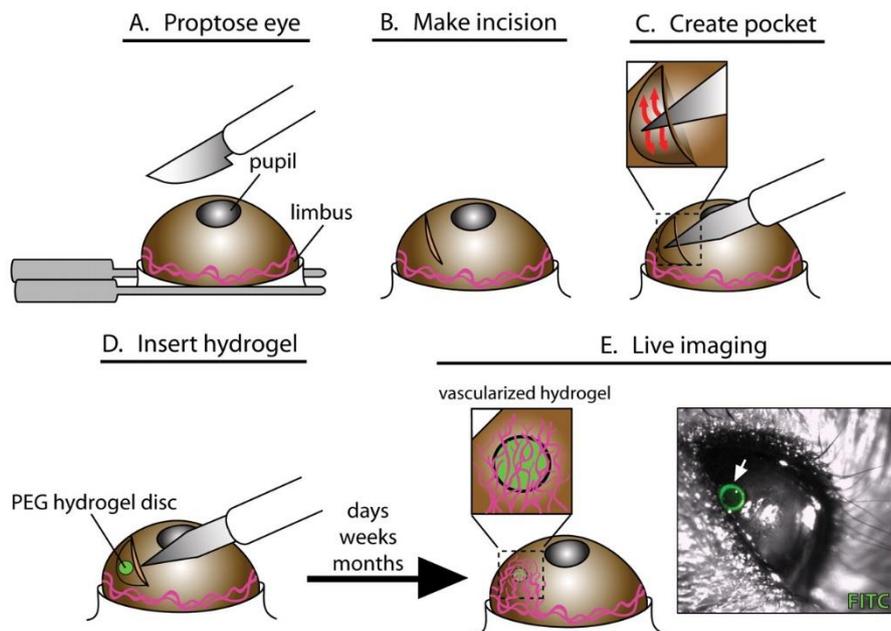


Figure 13 : Test de néovascularisation cornéenne (creative-bioarray.com).

d) Micro-injection stéréotaxique

Les souris sont préalablement analgésées par injection sous-cutanée de buprénorphine (Vetergesic) 50 µg/kg, anesthésiées par inhalation d'isoflurane (induction avec 4% d'isoflurane puis maintien à 2,5%) et placées dans un cadre stéréotaxique (Stoelting®). La peau du crâne est incisée à l'aide de ciseaux de

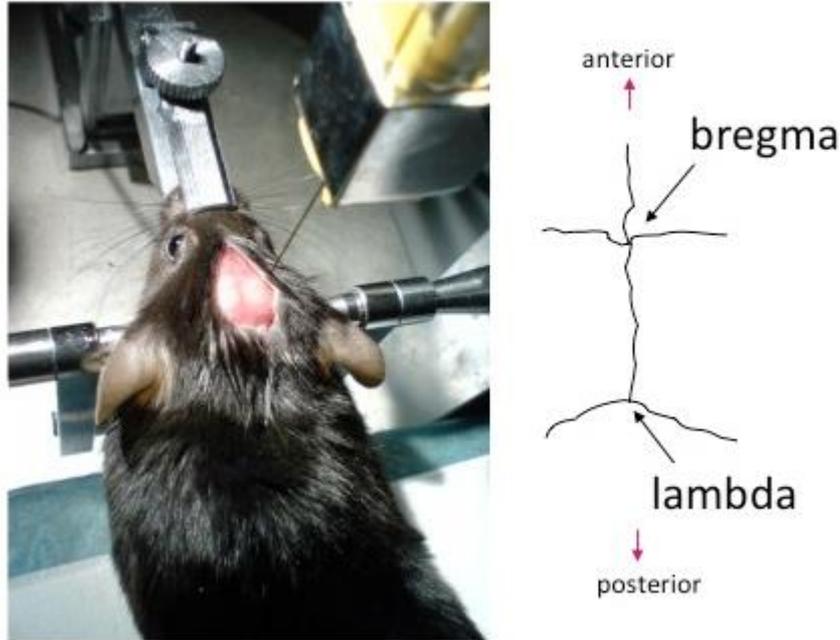


Figure 14 : injection stéréotaxique

chirurgie et réclinée afin d'exposer les os supérieurs du crâne. Le cadre stéréotaxique est utilisé pour définir le point d'injection. Une petite fenêtre est forée en prenant soin de ne pas abîmer le cerveau en-dessous, et une seringue hamilton est utilisée pour injecter 3 μ L de solution contenant l'un des virus suivants : AdIL-1, AdDL70 (Adctrl), LV-NShh, LV-GFP (contrôle). Le forage et l'injection sont réalisés, vis-à-vis du Bregma, 2 mm latéralement, 1 mm caudalement, et à une profondeur de 1,5 mm par rapport à la surface du crâne. Le volume injecté est laissé à infuser pendant trois minutes, puis l'aiguille est lentement retirée du cerveau. La peau du crâne est suturée à l'aide de fil 6/0, l'animal remis en cage. Les souris sont sacrifiées 7 jours après injection d'un adénovirus ou 14 jour s'il s'agit d'un lentivirus par injection létale d'un mélange pentobarbital sodique (Exagon Axience) 300mg/kg et lidocaïne (Lurocaïne vétoquinol) 30 mg/kg. Elles sont ensuite perfusées 5 minutes par du PBS puis 5 minutes par une solution formaline 4%. Le cerveau est entièrement prélevé, fixé en formaline 4% pendant 4 heures à 4°C, puis incubé 24 heures en saccharose 30% pour cryoprotection avant immersion et congélation en OCT.

e) Encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE)

Afin d'immuniser les souris contre la myéline, une injection sous-cutanée dorsale de 300 µg de myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 (MOG35-55) (Hooke Laboratories) dilué dans 200 µL d'adjuvant de Freund à 300µg/mL de mycobacterium tuberculosis H37Ra (Hooke Laboratories). Le même jour et une seconde fois le lendemain, les souris sont injectées avec 500 µg de toxine pertussique (Hooke Laboratories). Les souris sont ensuite observées quotidiennement afin de quantifier l'apparition et le développement de l'EAE sur un score de 0 à 5.

Les souris sont sacrifiées lorsqu'elles sont au moins au stade 4,5 pendant deux jours, ou au bout du 32^{ème} jour après immunisation. Elles sont anesthésiées par injection létale d'un mélange pentobarbital sodique (Exagon Axience) 300mg/kg et lidocaïne (Lurocaïne vétoquinol) 30 mg/kg. La rate et trois sections - cervicale, thoracique et lombaire - de la moelle épinière sont prélevées et fixées en formaline 4% pendant heures à 4°C puis incubé 24 heures en saccharose 30% pour cryoprotection avant immersion et congélation en OCT.

D) Test de comportement : test d'alternance spontanée

a) Habituation

Avant de procéder au test proprement dit, les souris sont habituées à l'expérimentateur ainsi qu'à la salle d'expérimentation. A cette fin, tous les jours pendant une semaine avant le jour de l'expérimentation, les souris sont amenées dans la salle de test et manipulées par l'expérimentateur. Enfin, le jour du test, les souris sont déplacées dans la salle d'expérimentation un minimum de 30 minutes avant le test.

b) Alternance spontanée

La souris est déposée au centre d'un labyrinthe en Y dont les trois bras ont des dimensions de 35x14x8 cm. Des indices visuels sont disposés hors du labyrinthe pour aider à la reconnaissance des bras. La souris, observée via une caméra, ne

peut pas voir l'expérimentateur depuis le labyrinthe. Pendant 5 minutes, les déplacements de la souris sont observés et les entrées dans chaque bras du labyrinthe sont notées. La souris est ensuite sortie du labyrinthe et replacée en cage, tandis que le labyrinthe est nettoyé à l'aide d'éthanol 70%.

L'observation des entrées successives de la souris dans les bras du labyrinthe permet d'établir un score d'alternance spontanée. Une séquence est réussie lorsque sur trois entrées successives, la souris a visité chaque bras du labyrinthe. Le score est ensuite calculé de la façon suivante :

$$\text{Score} = \frac{\text{Nombre de séquences réussies}}{(\text{Nombre total d'entrées}) - 2} \times 100$$

E) Culture cellulaire

a) Brain Microvascular Endothelial Cells (BMEC) : isolement et culture

Les cellules endothéliales microvasculaires de cerveau ou BMEC primaires sont isolées à partir de cerveau de souris. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale, et le cerveau est prélevé, puis le cervelet, les bulbes olfactifs et la matière blanche sont retirés. Un coton-tige est utilisé pour retirer les méninges à la surface du cortex cérébral. Le cortex est ensuite transféré dans un mortier contenant 2 mL d'HBSS 1X sans phenol red, 10 mmol/L HEPES et 0,1% BSA. Le tissu est broyé mécaniquement et le broyat est récupéré dans un tube de 15 mL, tandis qu'un volume égal de solution Dextran 30% froide est ajouté. Après centrifugation de 25 minutes à 3000 g à 4°C, le culot contenant les éléments vasculaires est récupéré et le surnageant est à nouveau centrifugé. Les culots sont regroupés et lavés trois fois avec un milieu HBSS 1X sans Ca²⁺/Mg²⁺ avec phenol red, 10 mmol/L et 0,1% BSA. Après le dernier lavage le culot est resuspendu en DMEM à 37°C additionné de collagenase/dispase 2 mg/mL (Roche), de TLCK 0,147 µg/mL (Lonza) et de DNase 1 10 µg/mL. La suspension est placée sur agitateur à vitesse maximale à 37°C pendant 30 minutes. La digestion est arrêtée par addition de 10 mL d'HBSS 1X sans Ca²⁺/Mg²⁺ avec phenol red, 10 mmol/L HEPES, 0,1% BSA et 3 nouveau lavage sont réalisés avec cette même solution. Le culot final est resuspendu dans le milieu de

culture des BMEC (DMEM à 1 g/L de glucose et contenant du sodium pyruvate complété avec 20% de SVF, 2% d'acides aminés non essentiels, 1 ng/mL de FGF2 ajouté au dernier moment et 10 mg/mL de gentamycine. La suspension est ensemencée sur des plaques préalablement coatées au Matrigel 2% (BD biosciences).

F) Test de migration cellulaire

La migration cellulaire est mesurée à l'aide du 48-well micro chemotaxis chamber (Neuro Probe). Une membrane filtrante (pores de 8 µm de diamètre) est coatée à la gélatine 0,2% pendant 30 minutes. Les cellules sont détachées de leur boîte de culture, culottées et resuspendues à 1000 cellules par µL en milieu EBM-2 contenant 0,5% de SVF. Les puits de la chambre inférieure sont remplis avec 19µL de milieu EBM-2 contenant 0,5% de SVF acellulaire. La membrane coatée est placée avec un joint en silicone entre les chambres inférieure et supérieure, les chambres sont scellées et les puits supérieurs sont remplis avec 50 µL de suspension cellulaire (contenant $50 \cdot 10^3$ cellules). Les cellules sont incubées à 37°C pendant 6 heures. Après 6 heures, les chambres sont descellées, et la membrane est délicatement retirée du dispositif. Les cellules sont éliminées mécaniquement de la surface supérieure de la membrane, puis la membrane est immergée 30 secondes en méthanol pour fixer les cellules sur la face inférieure. Les cellules ayant migrées sont ensuite colorées à l'hémalum de Mayer pendant 30 secondes. La membrane est finalement placée entre lame et lamelle montée à l'Eukitt pour observation au microscope à lumière transmise. Chaque condition est réalisée en triplicat technique et biologique.

G) Analyses statistiques

En ce qui concerne les résultats non publiés, les données ont été analysées à l'aide du test de Mann-Whitney. Les schémas représentatifs des résultats reportent la moyenne +/- l'écart-type des valeurs obtenues. n.s. : non significatif ; * :p<0.05 ; ** :p<0.01 ; *** :p<0.001 ; **** :p<0.0001.

H) Matériel supplémentaire

Les anticorps utilisés ne figurant pas dans les articles sont répertoriés dans le tableau 1.

Cible	Espèce	Fournisseur	Référence
Neun	Lapin	Millipore	ABN78
Podocalyxine	Chèvre	R&D	AF1556
IBA1	Lapin	Fujifilm	019-19741
A β	Souris	Biolegend	BLE803001

Tableau 1 : Liste des anticorps primaires utilisés

Un couple d'amorces ne figurant pas dans l'article a été utilisé en qPCR, ciblant l'ADNc KLF-2 humain. Amorce sens : 5'-ACTCACACCTGCAGCTACGC-3'. Amorce anti-sens : 5'-GGTACGTGTAGGTAGCCCACA-3'.

Nous avons également utilisé, pour des expérimentations *in vitro*, du peptide A β 1-42 humain recombinant, fourni par Eurogentec (AS-20276).

Manuscripts - Article I :

Full-length Dhh and N-terminal Shh act as competitive antagonists to regulate angiogenesis and vascular permeability

Pierre-Louis Hollier [†], **Candice Chapouly** [†], **Aissata Diop**, **Sarah Guimbal** ,
 **Lauriane Cornuault** , **Alain-Pierre Gadeau** , and **Marie-Ange Renault** *

Inserm, Biology of Cardiovascular Diseases, University of Bordeaux, U1034, 1, avenue de Magellan, F-33604 Pessac, France

Received 23 July 2020; revised 4 September 2020; editorial decision 23 September 2020; accepted 30 September 2020

Time for primary review: 20 days

Aims

The purpose of the present article is to clarify some conflicting literature data. The therapeutic potential of Hedgehog (Hh) signalling agonists for vascular diseases is of growing interest. However, molecular and cellular mechanisms underlying the role of the Hh signalling in vascular biology remain poorly understood.

 **AQ2**

Methods and results

With this goal, we have demonstrated that, unexpectedly, ectopically administered N-terminal Sonic Hh (N-Shh) and endogenous endothelial-derived Desert Hh (Dhh) induce opposite effects in endothelial cells (ECs). Notably, endothelial Dhh acts under its full-length soluble form (FL-Dhh) and activates Smoothed in ECs, while N-Shh inhibits it. At molecular level, N-Shh prevents FL-Dhh binding to Patched-1 (Ptch1) demonstrating that N-Shh acts as competitive antagonist to FL-Dhh. Besides, we found that even though FL-Hh ligands and N-Hh ligands all bind Ptch1, they induce distinct Ptch1 localization. Finally, we confirmed that in a pathophysiological setting, i.e. brain inflammation, astrocyte-derived N-Shh acts as a FL-Dhh antagonist.

Conclusion

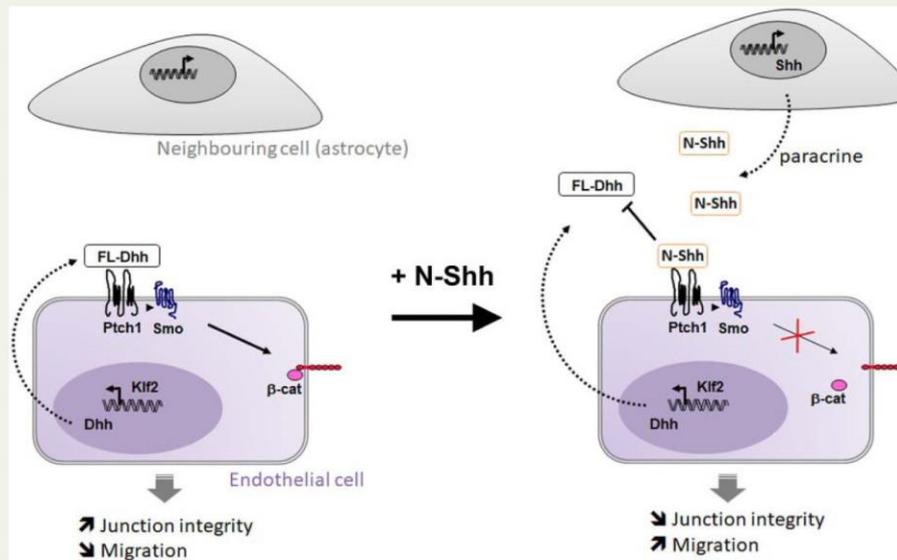
The present study highlights for the first time that FL-Dhh and N-Hh ligands have antagonistic properties especially in ECs.

[†]The first two authors contributed equally to the study.

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

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author(s) 2020. For permissions, please email: journals.permissions@oup.com.

Graphical Abstract



Keywords

Hedgehog signalling • Endothelium • Permeability • Antagonism • Multiple sclerosis

1. Introduction

Evidences accumulated over the past decades identified Hedgehog (Hh) signalling as a new regulator of vascular homeostasis. More specifically, it has been shown to regulate both angiogenesis¹ and micro-vessel integrity.² Indeed, previous investigations have reported that antibody-mediated neutralization of Hh protein impairs ischaemia-induced angiogenesis both in the setting of hind limb ischaemia and myocardial infarction in mice.^{3,4} Accordingly, when Sonic Hh (Shh), one of the Hh ligands, was administered either as a recombinant protein or via gene therapy, it enhanced the neovascularization of ischaemic tissues by promoting both angiogenesis¹ and endothelial progenitor cell recruitment.⁵ Besides, Hh signalling was shown to promote blood–brain barrier (BBB) integrity and immune quiescence in the setting of multiple sclerosis² and in the setting of stroke.⁶ Additionally, we have shown that disruption of Hh signalling specifically in endothelial cells (ECs) induces blood–nerve barrier breakdown and peripheral nerve inflammation.⁷ As a consequence, the therapeutic potential of Hh signalling agonists for vascular diseases is of growing interest.^{8–13} However, molecular and cellular mechanisms underlying the role of the Hh ligands in vascular biology remain poorly understood and conflicting results have been reported.¹⁴ For instance, while, as described above, most studies agree upon the proangiogenic role of Shh,^{1,5,15} unexpectedly, ischaemia-induced angiogenesis was shown to be accelerated in Shh-deficient mice.¹⁶ Similarly, while Hh signalling is typically believed to promote endothelial barrier integrity,^{2,17} glioblastoma-derived Desert Hh (Dhh) was shown to disrupt the BBB.¹⁸

Additionally, an early study reported that ectopic Shh overexpression in the dorsal neural tube induces haemorrhage in the spinal cord.¹⁹

The Hh family of morphogens, which was identified nearly four decades ago in drosophila as crucial regulators of cell fate determination during embryogenesis, includes three members: Shh, Indian Hh (Ihh), and Dhh.²⁰ The interaction of Hh proteins with their specific receptor Patched-1 (Ptch1) de-represses the transmembrane protein Smoothed (Smo), which activates downstream pathways, including the Hh canonical pathway leading to the activation of Gli family zinc finger (Gli) transcription factors and the so-called Hh non-canonical pathways, which are independent of Smo and/or Gli.²¹ However, while Shh, Ihh, and Dhh, all bind to the same receptor, Ptch1, with close affinities, their ability to activate Gli-dependent transcription in fibroblast cell lines is dramatically different. Ihh is six times less potent than Shh, and Dhh is >10 times less potent than Ihh.²² This has been one of the reasons why Shh is the main Hh gene considered for therapy. In contrast, some of Hh biological effects including *Islet-1* induction²² or activation of RhoA in ECs are equally induced by the three proteins.²³

Besides, Shh is synthesized as a pre-protein whose signal sequence is first cleaved to produce a full-length unmodified form. Then an autocatalytic reaction removes the carboxy-terminal domain and attaches a cholesterol moiety to the newly exposed carboxy-terminus. Shh is further modified by Hh acyltransferase which catalyses the addition of a palmitate to the amino-terminus,²⁴ to generate the Shh active form (N-Shh). Secretion and solubility of cholesterol-modified Shh depend on the transmembrane protein *Disp1* (dispatched RND transporter family

member 1) and the cell surface protein Scube2 (signal peptide, CUB domain, and EGF like domain containing 2).²⁵ Both Disp1 and Scube2 bind the cholesterol-anchor of Shh. On the contrary to Shh, Ihh and Dhh processing have been poorly investigated, and may differ. Indeed, Dhh is suggested not to undergo efficient autocatalytic cleavage.²⁶

The purpose of the present paper is to compare the vascular effects of endothelial-derived Dhh with those of ectopically administered N-Shh in order to determine whether Hh ligands rather promote vessel integrity and quiescence or destabilize vessels to promote angiogenesis and to validate some debated vascular effects of Hh ligands. Notably, Shh is not expressed by ECs. ECs mainly express Dhh.^{17,27} Ihh may be found in some vascular bed including the one of the eye choroid.^{28,29}

2. Methods

2.1 Mice

Dhh Floxed (Dhh^{Flox}) mice 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 programme, EUCOMM, and described before.¹⁷ Shh Floxed (Shh^{Flox}) mice,³⁰ Smo Floxed (Smo^{Flox}) mice,³¹ Tg(Slc1a3-cre/ERT)1Nat/J (Glast-Cre^{ERT2}) mice,³² and Gt(ROSA)26Sor^{tm4}(*ACTB-tdTomato-EGFP*)^{Luo/J} (Rosa26^{tmG}) mice³³ were obtained from Jackson Laboratories. Tg(Cdh5-cre/ERT)1Rha (Cdh5-CreERT2) mice³⁴ were a gift from RH. Adams.

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 (CEEA 50).

The Cre recombinase in Cdh5-Cre^{ERT2} mice was activated by intraperitoneal (IP) injection of 1 mg tamoxifen for five consecutive days at 8 weeks of age. Mice were phenotyped 2 weeks later. Successful and specific activation of the Cre recombinase has been verified before.^{17,27} The Cre recombinase in Glast-Cre^{ERT2} mice was activated by IP injection of 1 mg tamoxifen, twice a day for five consecutive days at 8 weeks of age. Mice were phenotyped 2 weeks later. Successful and specific activation of the Cre recombinase has been verified ([Supplementary material online, Figure S9A](#)).

Both males and females were used in equal proportions except otherwise stated. Mice were sacrificed by cervical dislocation or pentobarbital overdose (300 mg/kg).

2.2 Mouse corneal angiogenesis assay

Pellets were prepared as previously described.³⁵ Briefly, either 5 µg of VEGFA (Shenandoah biotechnology) or rec N-Shh (Shenandoah biotechnology) diluted in 10 µL sterile phosphate-buffered saline was mixed with 2.5 mg sucrose octasulfate-aluminum complex (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), and 10 µL of 12% hydron in ethanol was added. The suspension was deposited on a 400 µm nylon mesh (Sefar America Inc., Depew, NY, USA), and both sides of the mesh were covered with a thin layer of hydron and allowed to dry.

Female mice were anaesthetized with an IP injection of ketamine 100 mg/kg and xylazine 10 mg/kg. The eyes of the mice were topically anaesthetized with 0.5% ProparacaineTM. The globe of the eye was proposed with jeweller's forceps taking care to not damage the limbus vessel surrounding the base of the globe. Sterile saline was also be applied directly to each eye as needed during the procedure to prevent excessive drying of the cornea and to facilitate insertion of the pellet into the

lamellar pocket of the eyes. Using an operating microscope, a central, intrasomal linear keratotomy was performed with a surgical blade parallel to the insertion of the lateral rectus muscle. Using a modified von Greafe knife, a lamellar micro pocket was made towards the temporal limbus by rocking the von Greafe knife back and forth. The pellet was placed on the cornea surface with jeweller's forceps at the opening of the lamellar pocket. A drop of saline was applied directly to the pellet and using the modified von Greafe knife, the pellet was gently advanced to the temporal end of the pocket. To avoid any pain, Buprenorphine was given at a dose of 0.05 mg/kg subcutaneously on the day of surgery.

Nine days after pellet implantation, mice were sacrificed, and eyes were harvested and fixed with 2% formalin. Capillaries were stained with rat anti-mouse CD31 antibodies (BMA Biomedicals, Cat No. T-2001), and primary antibodies were visualized with Alexa 568-conjugated anti-rat antibodies (Invitrogen). Pictures were taken under 50× magnification. Angiogenesis was quantified as the CD31+ surface area using Image J software.

2.3 Central nervous system microinjection

To obtain LV-N-Shh, pRES-N-Shh¹⁶ was digested by *NheI* and *HpaI*, the mouse N-Shh sequence was then cloned in pRRLsin.MND.MCS.VVPRE (Addgene) that had been previously digested by *NheI* and *PmlI*. Lentiviral particles were produced at the vectorology facility of Bordeaux University.

Mice (male and female used in equal proportion) were anaesthetized by 3% isoflurane inhalation and placed into a stereotaxic frame (Stoelting, IL, USA). To prevent eye dryness, an ophthalmic ointment was applied at the ocular surface to maintain eye hydration during the time of surgery. The skull was shaved and the skin incised on 1 cm to expose the skull cap. Then, a hole was drilled into the skull above the cerebral cortex and 3 µL of an AdLL-1,³⁶ AdDL70 control (AdCtrl), LV-NShh, or LV-GFP control (10⁷ pfu) solution were microinjected at y = 1 mm caudal to Bregma, x = 2 mm, z = 1.5 mm using a Hamilton syringe, into the cerebral cortex and infused for 3 min before removing the needle from the skull hole.³⁷ To avoid any pain, mice received a subcutaneous injection of buprenorphine (0.05 mg/kg) 30 min before surgery and again 8 h post-surgery to assure a constant analgesia during the procedure and post-operatively. Mice were sacrificed by pentobarbital overdose. Those injected with the adenovirus were sacrificed 7 days post-surgery and those injected with the lentivirus were sacrificed 14 days post-surgery to maximize the vector effectiveness. For histological assessment, brains were harvested and fixed with 10% formalin for 3 h before being incubated in 30% sucrose overnight and embedded in OCT. For each brain, the lesion area, identified by the puncture site, was cut into 7 µm thick sections.

2.4 Experimental autoimmune encephalomyelitis

Ten-week-old female mice were immunized by subcutaneous injection of 300 µg myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 (MOG35-55) (Hooke Laboratories) in 200 µL Freund's adjuvant containing 300 µg/mL mycobacterium tuberculosis H37Ra (Hooke Laboratories) in the dorsum. Mice were then administered with 500 ng pertussis toxin IP on day of sensitization and 1 day later (Hooke Laboratories). To avoid any pain, injections were performed under anaesthesia (3% isoflurane inhalation). Disease was scored [0, no symptoms; 1, floppy tail; 2, hind limb weakness (paraparesis); 3, hind limb paralysis (paraplegia); 4, fore- and hind limb paralysis; 5, death]³⁶ from Day 7 post-immunization until Day 32 post-

immunization. At Day 32, all the animals were euthanized by pentobarbital overdose. For histological assessment, cervical, lumbar, and dorsal sections of each animal spinal cord, as well as the spleen, were harvested and fixed in formalin for 3 h before being incubated in 30% sucrose overnight, embedded in OCT, and cut into 7 μm thick sections.

2.5 Immunostaining

Prior to staining, brains were fixed with 10% formalin for 3 h, incubated in 30% sucrose overnight, OCT embedded, and cut into 7 μm thick sections. Cultured cells were fixed with 10% formalin for 10 min.

Human Cdh5 was stained using mouse anti-human Cdh5 antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat No. sc-9989). Mouse Cdh5 was stained using goat anti-mouse Cdh5 antibodies (R&D systems, Cat No. AF1002). Cldn5 was stained using either mouse monoclonal anti-Cldn5 antibodies (Invitrogen, Cat No. 35-2500) or rabbit polyclonal anti-Cldn5 antibodies (Invitrogen, Cat No. 34-1600). Albumin and fibrinogen were stained using sheep anti-albumin antibodies (Abcam, Cat No. ab8940) and rabbit anti-fibrinogen antibodies (Dako, Cat No. A0080), respectively.

Leucocytes were identified using rat anti-mouse CD45 antibodies (BD Pharmingen Inc, Cat No. 550539). Iba1+ microglia was identified using rabbit anti-Iba1 antibodies (FUJIFILM Wako chemicals, Cat No. 019-19741). Reactive astrocytes were stained using rabbit anti-Gfap antibodies (ThermoFisher, Cat No. OPA1-06100). Myelin was identified using rat anti-Mbp antibodies (Abcam, Cat No. ab7349).

Hh ligands were stained using rabbit anti-Shh antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat No. sc-9024). Dhh was specifically stained using mouse anti-Dhh antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat No. sc-271168). Ptch1 was stained using rabbit anti-Ptch1 antibodies (Abcam, Cat No. ab53715).

For immunofluorescence analyses, primary antibodies were resolved with Alexa Fluor[®]-conjugated secondary polyclonal antibodies (Invitrogen, Cat Nos 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.

BBB permeability was evaluated by measuring tight junction integrity and plasmatic protein extravasation. For each brain or spinal cord section, Cldn5+, Cdh5+, Fibrinogen+, and Albumin+ and IgG+ areas were quantified in 20 pictures taken at the margins of the lesion area under 40 \times magnification. CD45+ leucocytes were counted in 20 pictures randomly taken under 40 \times magnification. Gfap+ and NeuN+ areas were quantified in 10 pictures taken in and around the lesion area under 20 \times magnification. One section, localized in the I1 β -induced inflammatory lesion area, per brain was quantified for each mouse. Three sections/spinal cord were quantified (one cervical, one lumbar, and one dorsal) for each mice to get a global vision of the inflammatory lesion.

2.6 Isolation of primary-cultured mouse brain ECs

Mice were sacrificed by cervical dislocation. Brain was then harvested and cerebellum, olfactory bulb, and white matter removed with sterile forceps. Additionally, meninges were eliminated by rolling a sterile cotton swab at the surface of the cortex. The cortex was then transferred in a potter containing 2 mL HBSS 1X without phenol red containing 10 mol/L HEPES and 0.1% BSA and the brain tissue was pounded to obtain a homogenate which was collected in a 15 mL tube. Cold 30% dextran solution was then added to the tube (V/V) to obtain a 15% dextran working solution. After a 25 min centrifugation at 3000 g at 4°C, the

pellet (neurovascular components and red cells) was collected and the supernatant (dextran solution and neural components) was centrifuged again to get the residual vessels. Neurovascular components were then pooled and washed three times with HBSS 1X Ca²⁺/Mg²⁺ free containing phenol red, 10 mmol/L HEPES, and 0.1% BSA. The pellet was then suspended in DMEM containing 2 mg/mL collagenase/dispase (Roche), 0.147 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TLCK (Lonza), and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DNase 1 (Roche), pre-warmed at 37°C, before being placed on a shaking table at maximum speed agitation at 37°C. After 30 min, the digestion was stopped by adding 10 mL HBSS 1X Ca²⁺/Mg²⁺ free containing phenol red, 10 mmol/L HEPES, and 0.1% BSA and washed again three times in this same buffer. The digested neurovascular pellet was finally re-suspended in mouse brain EC culture medium (DMEM 1 g/L glucose containing 20% FBS, 2% sodium pyruvate, 2% non-essential amino acids, 1 ng/mL FGF2, and 10 mg/mL gentamycin) and plated on dishes previously coated with 2% Matrigel[™] (BD biosciences). In each experiment, replicates were always prepared from independent animals (1 mice = one cell culture well).

2.7 Cell culture

Cell culture assays are described in [Supplementary material online, Methods](#).

2.8 Statistics

Results are reported as mean \pm SEM. Comparisons between groups were analysed for significance with the non-parametric Mann-Whitney test or a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test (for more than two groups) using GraphPad Prism v8.0.2 (GraphPad Inc, San Diego, CA, USA). Differences between groups were considered significant when $P \leq 0.05$ (* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

3. Results

3.1 Ectopic administration of N-Shh promotes angiogenesis while endothelial Dhh inhibits it

Since Hh ligands are well known for their pro-angiogenic effect,¹ we first used the mouse corneal angiogenesis model to compare the effect of ectopically administered recombinant N-Shh (rec N-Shh) and endogenous endothelial Dhh on angiogenesis. Consistent with previous investigations,^{1,15} implantation of N-Shh-containing pellets in the cornea of wild-type mice-induced angiogenesis (Figure 1A and B). However, when VEGFA-containing pellets were implanted in the corneas of both EC specific Dhh knockout mice (Dhh^{ECKO}) and their control littermates, angiogenesis was significantly enhanced in Dhh^{ECKO} mice compared to control mice (Figure 1C and D). This latter result indicates that unlike ectopically administered rec N-Shh, endogenous endothelial Dhh prevents VEGFA-induced angiogenesis indicating that endothelial Dhh is rather anti-angiogenic. Importantly neither Shh nor Ihh expression was modified in ECs to compensate for Dhh deficiency (Figure 1E-G). Similar results were obtained when we quantified migration of cultured ECs. Indeed, while treatment with rec N-Shh protein promoted EC migration (Figure 1H), Dhh knockdown in ECs (Figure 1I) also increased cell migration (Figure 1J).

Altogether, this first set of data demonstrates for the first time that ectopic N-Shh and EC-derived endogenous Dhh induce opposite effects especially in ECs.

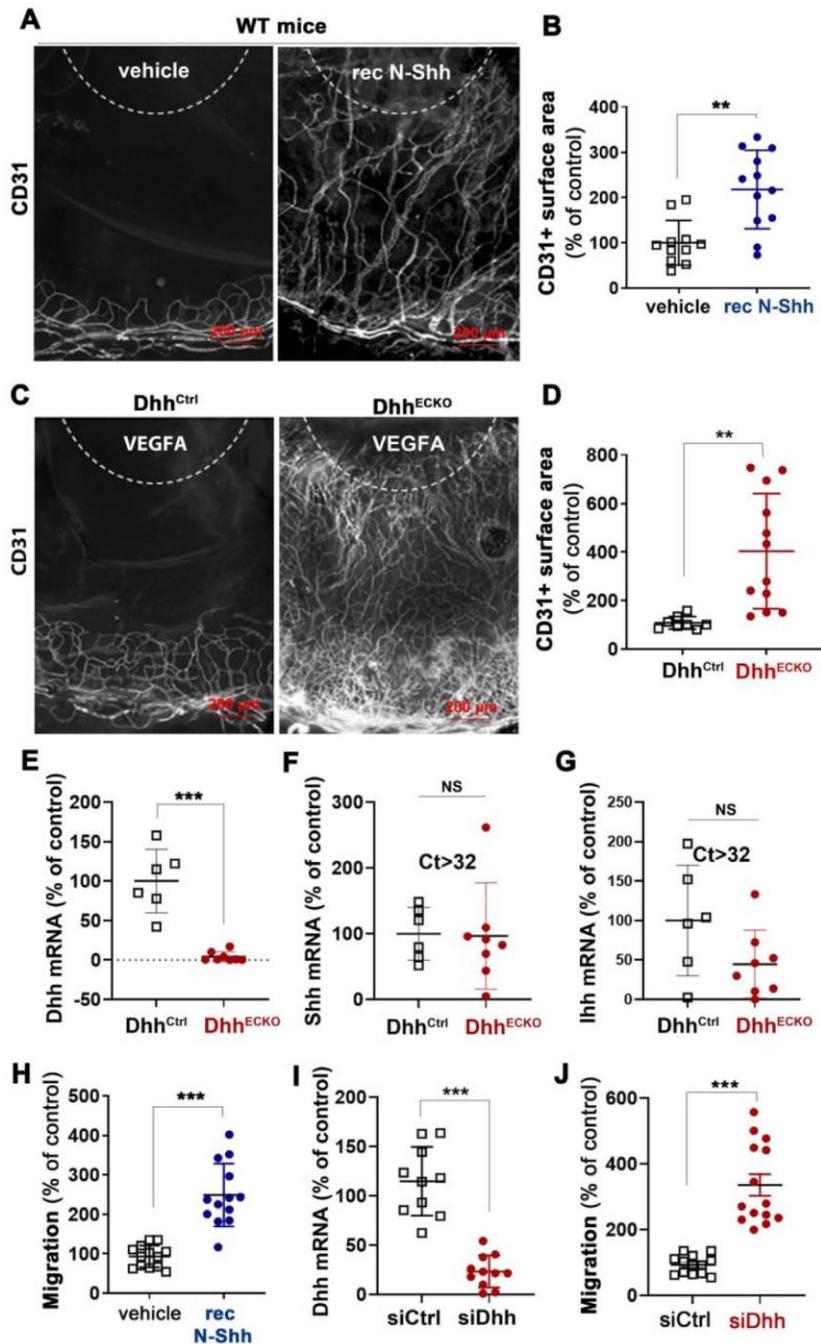


Figure 1 N-Shh promotes angiogenesis while EC-derived Dhh inhibits it. (A and B) recombinant N-Shh-containing or control pellets were implanted in the corneas of WT mice. Mice were sacrificed 9 days later. (A) Whole-mount corneas were immunostained with anti-CD31 antibodies to identify blood vessels. Representative pictures are shown. (B) Angiogenesis was quantified as the percentage of CD31+ surface area (n = 12 and 11 corneas, respectively). (C–G) Cdh5-Cre^{ERT2} Dhh^{Flox/Flox} (Dhh^{ECKO}) and Dhh^{Flox/Flox} (Dhh^{Ctrl}) mice were administered with tamoxifen and sacrificed 2 weeks later. (C and D) VEGFA-containing pellets were implanted in the corneas of Cdh5-Cre^{ERT2} Dhh^{Flox/Flox} (Dhh^{ECKO}) and Dhh^{Flox/Flox} (Dhh^{Ctrl}) mice 2 weeks after they were administered with tamoxifen. (C) Whole-mount corneas were immunostained with anti-CD31 antibodies to identify blood vessels. Representative pictures are

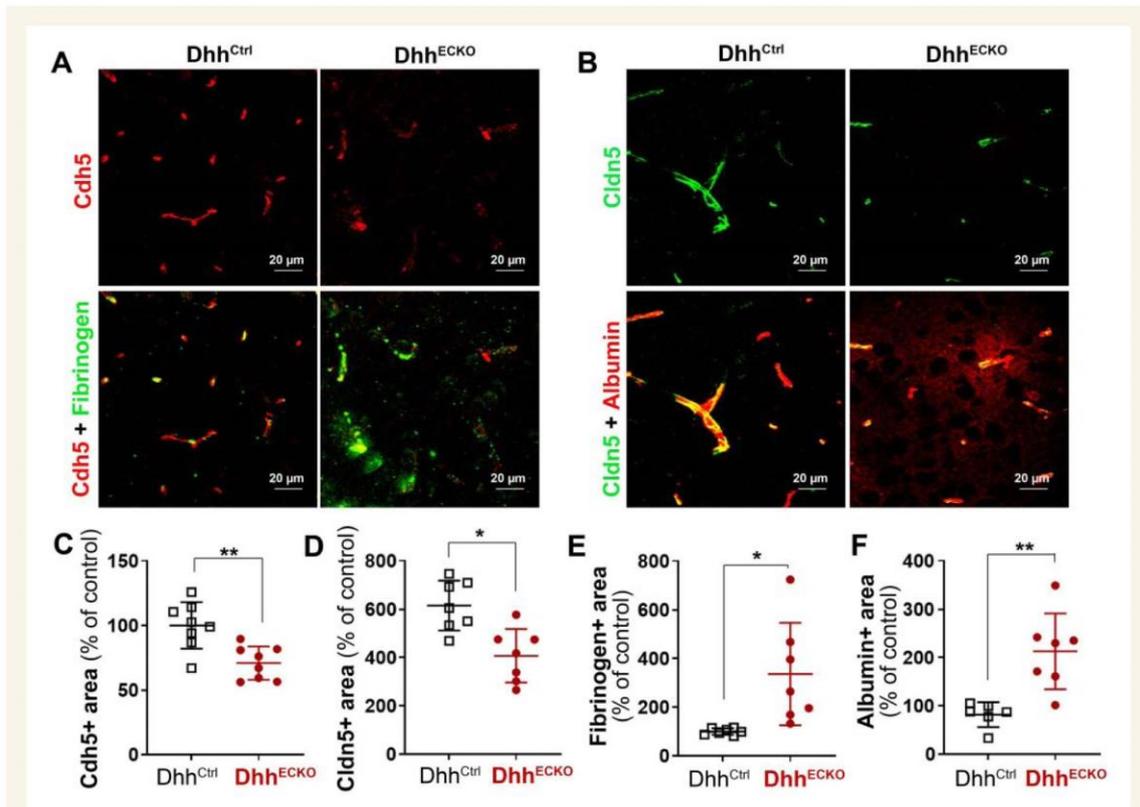


Figure 2 EC-derived Dhh prevents BBB opening while N-Shh disrupts it. *Cdh5*-Cre^{ERT2} *Dhh*^{Flox/Flox} (*Dhh*^{ECKO}) and *Dhh*^{Flox/Flox} (*Dhh*^{Ctrl}) mice were sacrificed 2 weeks after they were administered with tamoxifen. (A and B) Brain sagittal sections were immunostained with either anti-*Cdh5* (in red), and anti-Fibrinogen (in green) antibodies (A) or anti-*Cldn5* (in green) and anti-Albumin (in red) antibodies (B). Representative confocal images are shown. (C) *Cdh5* expression was quantified as the *Cdh5*+ surface area (*n* = 8 mice in each group). (D) *Cldn5* expression was quantified as the *Cldn5*+ surface area (*n* = 7 mice in each group). (E) Fibrinogen extravasation was quantified as the fibrinogen+ surface area (*n* = 7 mice in each group). (F) Albumin extravasation was quantified as the albumin+ surface area (*n* = 7 and 6 mice in each group, respectively). **P* ≤ 0.05; ***P* ≤ 0.01. Mann-Whitney test.

3.2 Endothelial Dhh promotes BBB integrity while ectopic administration of N-Shh disrupts it

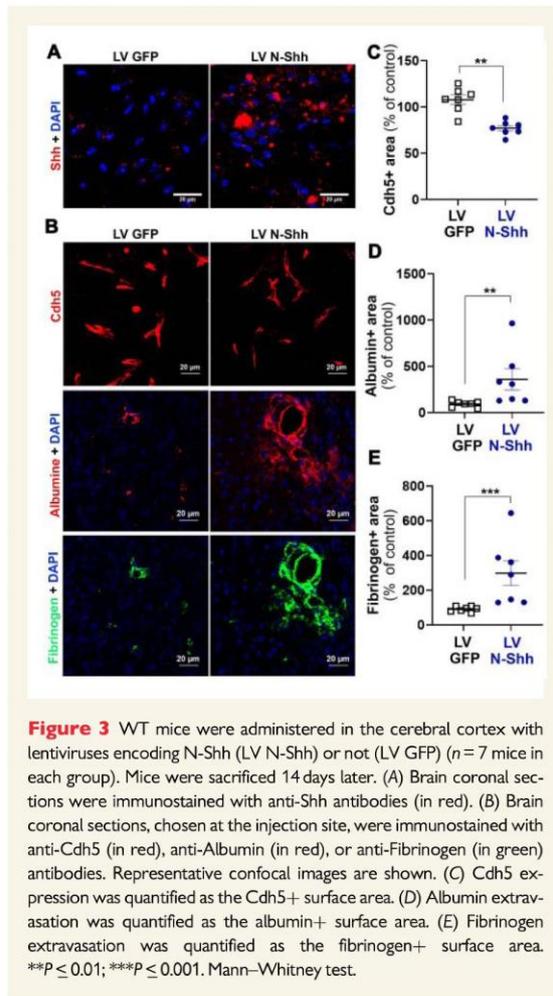
To confirm that endothelial Dhh and ectopic N-Shh induce opposite effects on ECs, we compared their effect on endothelial barrier integrity. Consistent with previous investigations,^{7,17} expression of both *Cdh5* and *Cldn5* was significantly diminished at the BBB of *Dhh*^{ECKO} mice

compared to littermate controls (Figure 2A–D). This was associated with fibrinogen and albumin extravasation (Figure 2A, B, E, and F), demonstrating abnormal BBB permeability. To investigate the effects of N-Shh, both N-Shh-encoding and control lentiviruses were administered locally in the brain cortex of wild-type mice (Figure 3A). As shown in Figure 3B–E, N-Shh significantly reduced *Cdh5* expression at the BBB which was associated with increased albumin and fibrinogen extravasation. Consistent results were obtained in HUVECs in which both Dhh knockdown or

Figure 1 Continued

shown. (D) Angiogenesis was quantified as the percentage of CD31+ surface area (*n* = 12 and 8 corneas, respectively). (E) Dhh, (F) Shh, and (G) Ihh mRNA expression was quantified via RT-qPCR in ECs isolated from their brain (*n* = 8 and *n* = 6 in each group, respectively). (H) HUVEC migration was assessed in a chemotaxis chamber in the presence or not of 1 µg/mL recombinant N-Shh (*n* = 13 in each condition). (I and J) HUVECs were transfected with Dhh or control siRNAs. (I) Dhh mRNA was quantified via RT-qPCR (*n* = 11 and 10 in each condition, respectively). (J) Cell migration was assessed in a chemotaxis chamber (*n* = 14 and 12 in each condition, respectively). ***P* ≤ 0.01; ****P* ≤ 0.001; NS, not significant. Mann-Whitney test.

AQ12



treatment with recombinant N-Shh protein increased Cdh5 junction thickness indicating destabilization of adherens junctions (Supplementary material online, Figure S1A–D). Additionally, these results were confirmed in mouse primary-cultured brain ECs that were either prepared from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls, or from WT mice which were then treated with either recombinant N-Shh protein or BSA. As shown in Supplementary material online, Figure S1E, Dhh deficiency in brain ECs led to disorganized Cdh5 junctions and decreased expression of tight junction proteins including Cldn5 and Occludin (Occludin) (Supplementary material online, Figure S1F–I). Treatment with rec N-Shh also altered brain EC junctions as it led to increased Cdh5 and Cldn5 internalization (Supplementary material online, Figure S1J) and Cldn5 down-regulation (Supplementary material online, Figure S1K–N).

This second set of data confirms that endothelial Dhh and ectopic N-Shh trigger opposite effects: while endothelial Dhh promotes endothelium integrity, ectopic N-Shh destabilizes blood vessels.

3.3 Activating Smo mimics endothelial Dhh-induced effects while inhibiting Smo recapitulates N-Shh effects

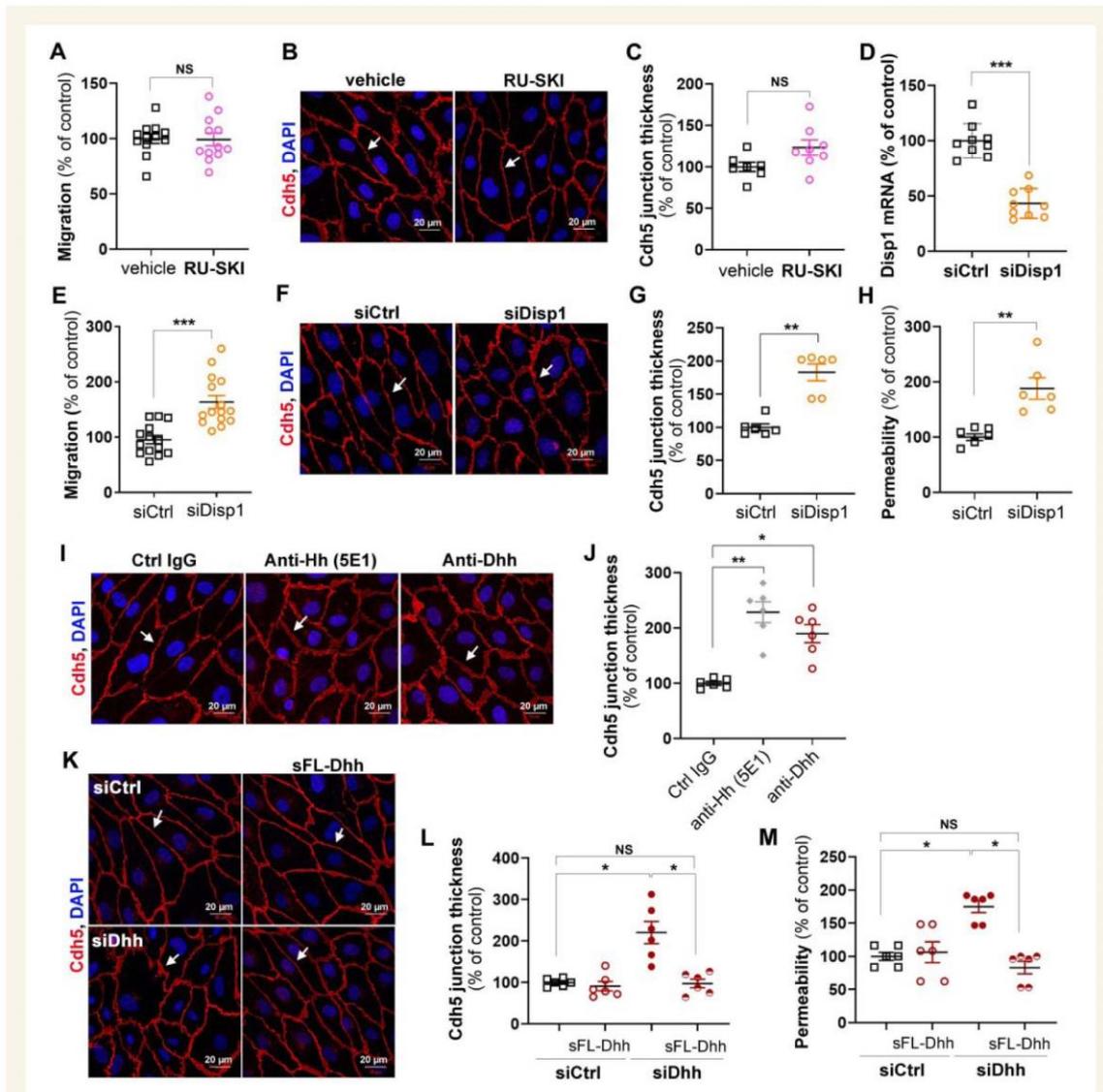
Since endothelial Dhh and ectopic N-Shh induce opposite effects in ECs, we hypothesized that one of the ligand would activate Hh signalling in EC while the other would inhibit it. To test this hypothesis, we assessed the functional consequences of Smo modulation since the classical read-out to assess Hh signalling activity (i.e. Gli activity) is not modulated in ECs (Supplementary material online, Figure S2). First, we investigated the role of endothelial Smo in angiogenesis; VEGFA-containing pellets were implanted in the corneas of both Smo^{ECKO} mice and their control littermates. Interestingly, Smo deficiency significantly increased VEGFA-induced angiogenesis (Supplementary material online, Figure S3A and B). Consistently, *in vitro*, Smo inhibition with GDC-0449 significantly stimulated HUVEC migration while Smo activation with the Smo agonist SAG did not (Supplementary material online, Figure S3C). Then we investigated the role of Smo on endothelial barrier integrity; Smo deficiency in ECs significantly decreased both Cdh5 and Cldn5 expression at the BBB (Supplementary material online, Figure S3D–G), which was associated with increased fibrinogen and albumin extravasation (Supplementary material online, Figure S3D–E and H–I). *In vitro*, GDC-0449 increased Cdh5 junction thickness in both HUVECs (Supplementary material online, Figure S4A and B) and mouse brain EC (Supplementary material online, Figure S4C). Moreover, it induced Cldn5 internalization in mouse brain EC (Supplementary material online, Figure S4C). Besides, SAG increased Cldn5 expression in mouse brain EC (Supplementary material online, Figure S4D–F).

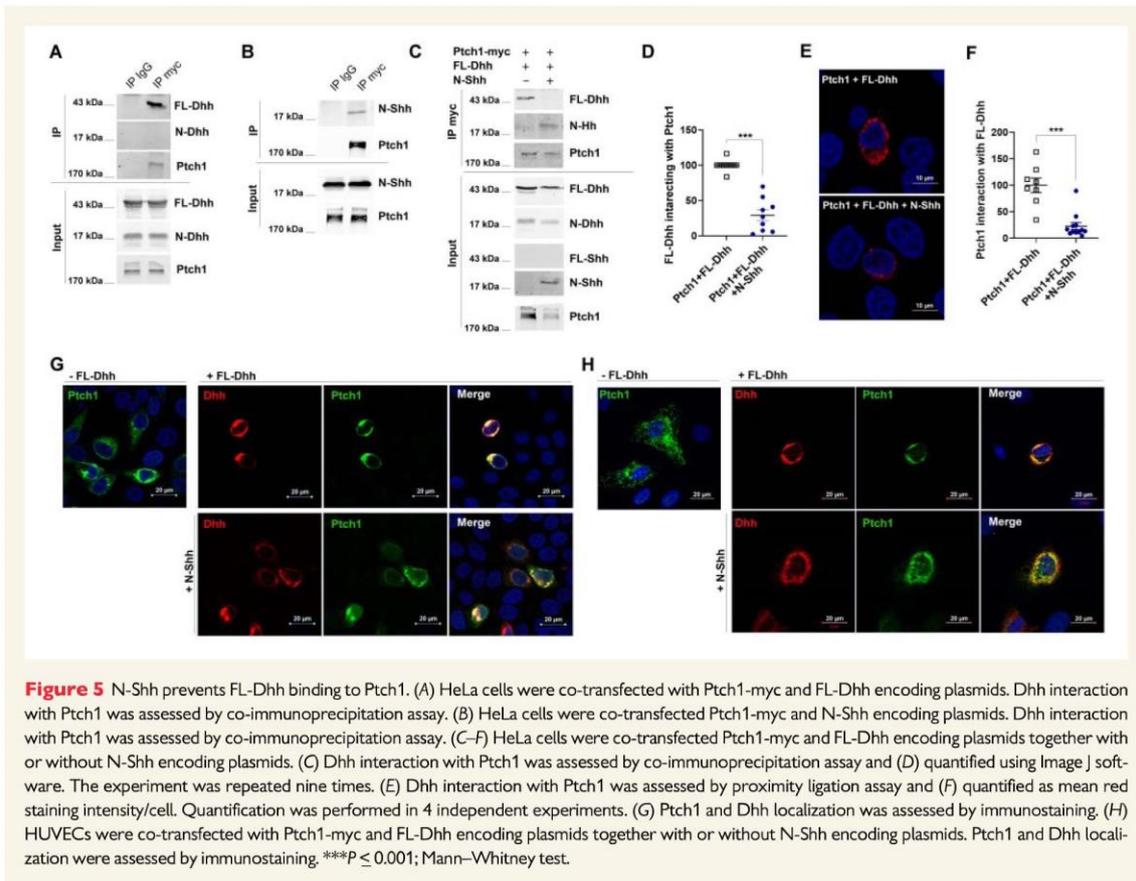
Altogether these results suggest that Dhh activates Hh signalling in ECs via Smo while ectopic N-Shh inhibits it. In order to verify this hypothesis, we performed rescue experiments. ECs were either transfected with control or Dhh siRNA and then treated or not with SAG. As expected, the increased Cdh5 junction thickness observed in the absence of Dhh was reversed in the presence of SAG (Supplementary material online, Figure S5A and B). In parallel, ECs were treated with rec N-Shh in the presence or not of SAG. Once again, N-Shh-induced increased Cdh5 junction thickness was reversed in the presence of SAG (Supplementary material online, Figure S5C and D) suggesting that ectopic N-Shh inhibits Dhh-induced autocrine signalling in ECs.

3.4 Dhh promotes endothelium integrity under its 43 kDa full-length soluble form

With the aim to investigate why endothelial Dhh and ectopic N-Shh induce opposite effects in ECs, we first wished to characterize under which form endothelial Dhh promotes endothelium integrity. Notably, while Shh is mainly processed as a 19 kDa N-terminal peptide and secreted as both a 45 kDa full-length peptide and 19 kDa N-terminal peptide (Supplementary material online, Figure S6A), Dhh is mainly produced as a 43 kDa full-length protein and secreted exclusively under this form (Supplementary material online, Figure S6B).

We then tested whether Dhh requires being palmitoylated using the Hh acyltransferase inhibitor RU-SKI 43. RU-SKI did not modulate neither HUVEC migration nor HUVEC junction thickness (Figure 4A–C), indicating that Dhh may not need to be palmitoylated to promote endothelium integrity. To investigate the role of Disp1, a transmembrane protein necessary for Hh ligand transport across the plasma membrane, HUVECs were transfected with Disp1 or control siRNA (Figure 4D). Disp1 knock-down in HUVECs enhanced HUVEC migration (Figure 4E), increased Cdh5+ junction thickness (Figure 4F and G) and endothelium





permeability (Figure 4H). Consistent with Dhh being exposed at the cell surface or secreted, Hh blocking antibodies increased Cdh5 junction thickness in HUVECs (Figure 4I and J). Finally, to investigate whether Dhh acts as a membrane-bound protein or as a soluble secreted protein, we tested whether conditioned medium containing soluble 43 kDa Dhh would restore adherens junction integrity in Dhh siRNA-transfected HUVECs. Soluble 43 kDa Dhh prevented both Dhh siRNA-induced Cdh5+ junction thickening (Figure 4K and L) and endothelial permeability (Figure 4M) demonstrating that Dhh promotes endothelial integrity as a soluble 43 kDa, full length.

In the meantime, we compared the effects of conditioned medium of HeLa cells transfected with either FL-Dhh, N-Shh, FL-Shh, or N-Dhh encoding plasmids on HUVEC barrier properties. The conditioned medium from HeLa cells transfected with both N-Shh and FL-Shh encoding plasmids increased Cdh5 junction thickness (Supplementary material online, Figure S6C and D) and increased endothelial monolayer permeability (Supplementary material online, Figure S6E) confirming recombinant N-Shh protein effects. Notably, 17 kDa N-Dhh containing conditioned medium recapitulated the effects of N-Shh but not these of FL-Dhh demonstrating that Dhh requires being under its 43 kDa full-length form to promote endothelium integrity and suggesting that any N-Hh ligands would inhibit Hh signalling in ECs.

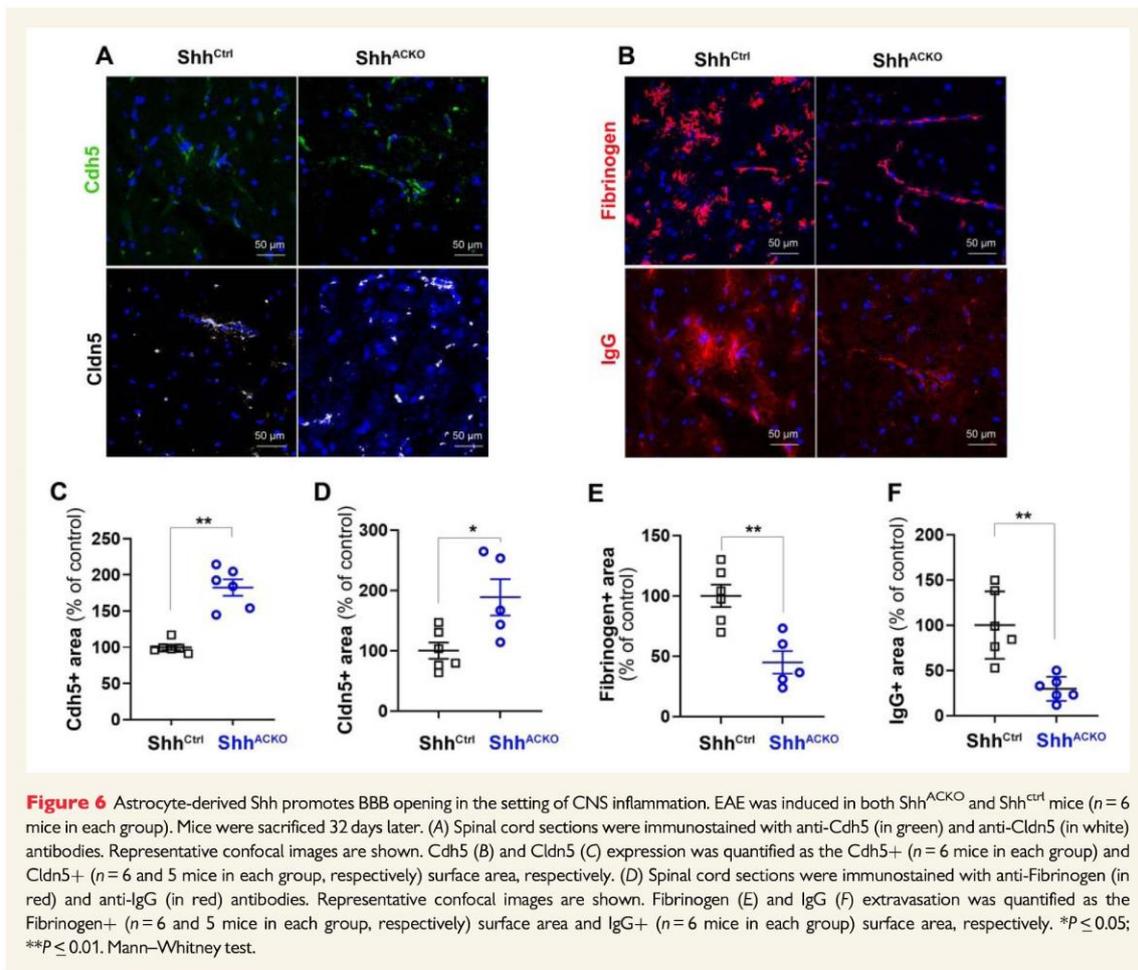
3.5 N-Shh prevents FL-Dhh binding to Ptch1

We hypothesized that N-Hh ligands inhibit Hh signalling in ECs by preventing Dhh-induced signalling. First, we quantified Dhh binding to Ptch1 in the presence or absence of N-Shh. To do so, we verified that both 43 kDa Dhh and N-Shh bind Ptch1 in immunoprecipitation assays (Figure 5A and B). We then measured the amount of 43 kDa Dhh bound to Ptch1 in the presence or absence of N-Shh by immunoprecipitation assay. Dhh binding to Ptch1 was reduced by ~70–80% in the presence of N-Shh (Figure 5C and D). The same result was obtained in the proximity ligation assay (Figure 5E and F). Notably, N-Dhh also bound Ptch1 (Supplementary material online, Figure S7A). However, N-Dhh prevented 43 kDa Dhh binding to Ptch1 to the same extent as N-Shh while FL-Shh only decreased 43 kDa Dhh binding to Ptch1 by 50% (Supplementary material online, Figure 7B and C).

Altogether these results indicate for the first time that N-Hh ligands may act as competitive antagonists to 43 kDa Dhh in ECs.

3.6 Each forms of Hh ligands induces a specific localization in Ptch1

The key remaining question was to determine why N-Hh ligands are not recapitulating 43 kDa Dhh-induced effects once they bind Ptch1.

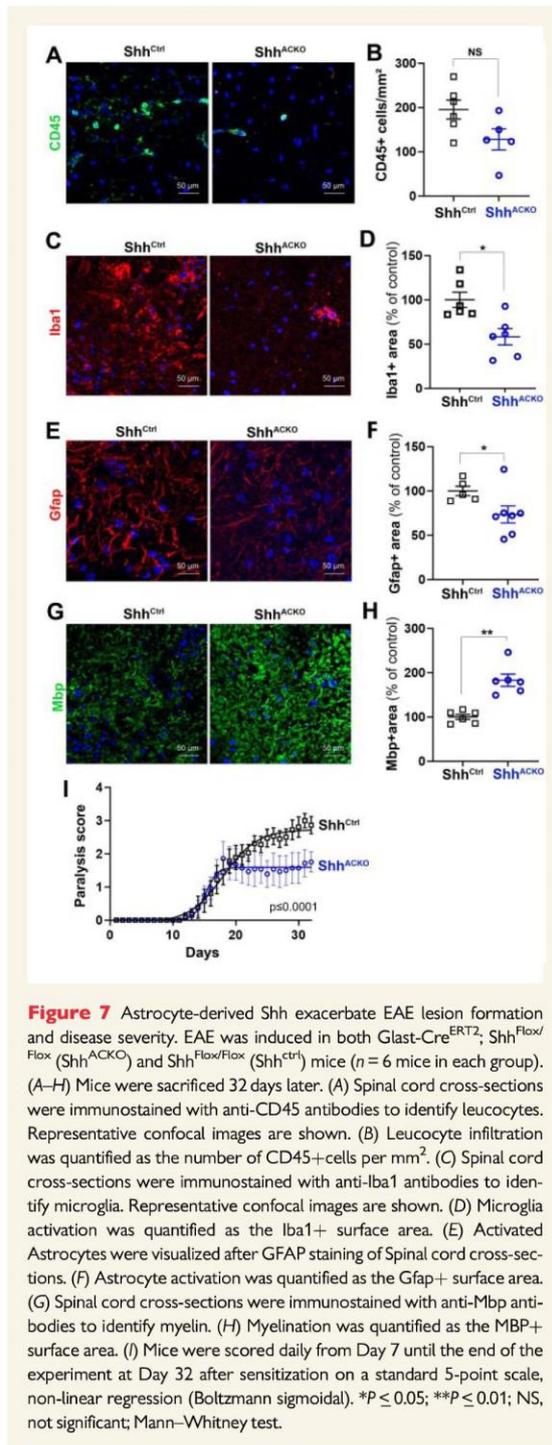


Therefore, we decided to investigate the earliest signalling events following Hh ligands binding to Ptch1. Upon Hh ligands binding to Ptch1, Ptch1 is being internalized and degraded by the ubiquitin proteasome system.³⁸ Accordingly, FL-Dhh, N-Shh, N-Dhh, and FL-Shh all induced Ptch1 degradation (Supplementary material online, Figure S8A and B) and neither of them modulated 43 kDa FL-Dhh-induced Ptch1 degradation (Supplementary material online, Figure 8C and D).

On the contrary, each Hh ligand and form of Hh ligand induced a distinct localization of Ptch1. A 43 kDa Dhh provoked a peri-nuclear localization of Ptch1, FL-Shh triggered Ptch1 endocytosis into vesicle distributed within the entire cell, while N-Shh and N-Dhh induced the formation of big Ptch1 aggregates in cells (Supplementary material online, Figure S8E). As a consequence, N-Shh prevented 43 kDa Dhh-induced massive peri-nuclear localization of Ptch1 (Figure 5G). Finally, we verified whether the same was true in ECs, to this end, we repeated this last experiment in HUVECs. Consistently with results obtained in HeLa, N-Shh prevented 43 kDa Dhh-induced Ptch1 peri-nuclear localization (Figure 5H).

3.7 Astrocyte-derived Shh disrupts BBB in the setting of brain inflammation

Finally, since we have only been investigating the vascular effects of ectopic N-Shh so far, we wished to investigate whether such regulation of Hh signalling exists in pathophysiological settings. Interestingly, while, Shh is barely expressed in the healthy vasculature, its expression is strongly up-regulated in perivascular astrocytes upon brain inflammation (Supplementary material online, Figure S9B).² More specifically, Shh mRNA is strongly up-regulated in astrocytes upon $Il1\beta$ treatment (Supplementary material online, Figure S9C) and we verified that $Il1\beta$ -treated astrocytes produce a N-terminal fully processed Shh form (Supplementary material online, Figure S9D). We then performed a series of experiments to investigate what would be the paracrine effects of astrocyte-derived Shh on endothelial barrier integrity. We compared BBB integrity in the setting of $Il1\beta$ -induced acute inflammation in both mice deficient for Shh in astrocytes (Shh^{ACKO}) and in their control littermates. At 7 days after Ad $Il1\beta$ brain microinjection (Supplementary



material online, Figure S9E), expression of both *Cdh5* and *Cldn5* were significantly increased in the absence of astrocyte-derived Shh (Supplementary material online, Figure S9F–H). This was associated with decreased extravasation of serum proteins including fibrinogen and albumin (Supplementary material online, Figure S9I–K) demonstrating for the first time that astrocytic Shh expression disrupts BBB integrity during acute neuro-inflammation.

3.8 Mice with astrocyte Shh inactivation display reduced disability in a model of multiple sclerosis

To examine the impact of these findings on disease severity, we investigated the phenotype of the multiple sclerosis model (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) in *Shh^{ACKO}* and control mice. Mice were sensitized with the encephalitogenic myelin peptide MOG_{35–55} and sacrificed 32 days later. Consistent with the acute cortex inflammation model, expression of both *Cdh5* and *Cldn5* were significantly increased at the endothelium of spinal cord vessels in the absence of astrocyte-derived Shh (Figure 6A–C). Accordingly, fibrinogen and albumin extravasation was reduced (Figure 6D–F). These results thus confirmed the damaging role of astrocytic Shh at the BBB. As a consequence, in the absence of astrocyte-derived Shh, leucocyte entry in the spinal cord parenchyma was reduced (Figure 7A and B), so was microglia (Figure 7C and D) and astrocyte activation (Figure 7E and F) which all together concur to prevent demyelination (Figure 7G and H). Finally, the clinical consequences of astrocytic Shh deficiency were evaluated using a widely accepted 5-point paradigm from Day 7 until the end of the experiment at Day 32 after sensitization (Figure 7I). Critically, these studies revealed that the clinical course and pathology of EAE were strongly reduced in *Shh^{ACKO}* mice during the plateau of the disease. In controls, neurologic deficit was observed from Day 9, and increased in severity until Day 29, when clinical score stabilized at a mean of 2.91, representing hind limb paralysis. In contrast, the onset of clinical signs in *Shh^{ACKO}* mice was first seen 3 days later, and the clinical course was much milder. In *Shh^{ACKO}* mice, disease reached a plateau at Day 19 at a mean of 1.78, indicating hind limb weakness and unsteady gait, a mild phenotype, and this divergence in scores are significant from Day 8 to Day 32 after sensitization (Figure 7I). The peak EAE score (1.75 vs. 2.86 in control mice), total average score (0.86 vs. 1.20 in control mice), and score during the time of disability (1.31 vs. 1.82 in control mice) were all decreased in *Shh^{ACKO}* mice (data not shown) but there were no significant changes in survival and mortality rates (data not shown).

In conclusion, this last set of data reveals for the first time that N-Shh may indeed act as a Dhh antagonist in a pathophysiological setting especially brain inflammation.

4. Discussion

While Hh ligands are typically used instead of another for therapeutic purposes,³⁹ the present study is the first one to our knowledge reporting that each forms of Hh ligand may induce its own specific effects. As a consequence, Hh ligands can enter into competition between each other to induce their effects. Notably, this is not the first time that different form of Hh ligand were reported to compete between each other, indeed, >20 years ago, unpalmitoylated Hh ligands were reported to act as dominant inhibitors towards palmitoylated Shh by competing for *Ptch1* binding.⁴⁰ These findings, together with our findings, thus highlight a

totally new mode of Hh signalling regulation based on the regulation of Hh ligand processing.

More specifically, in this study, we have investigated the effects of Hh ligands on ECs and compared the autocrine effects of 43 kDa FL-Dhh to the paracrine effects of 19 kDa N-Shh. We found that 43 kDa FL-Dhh promotes endothelial barrier integrity and stabilizes blood vessels, while 19 kDa N-Shh destabilizes endothelial intercellular junctions and promotes angiogenesis at least in part by acting as a competitive inhibitor of 43 kDa FL-Dhh (Supplementary material online, Figure S10) demonstrating that Hh ligands cannot be used instead of another for therapeutic purposes. Moreover, 17 kDa N-Dhh also acts as a competitive inhibitor of 43 kDa FL-Dhh demonstrating that the different form of Hh ligands can also not be used instead of another.

While canonical Hh signalling is typically induced in a 'mesenchymal type' cell by a fully processed 19 kDa N-Shh form produced by an 'epithelial like' cell, Hh signalling in ECs occurs through a non-canonical autocrine signalling. Consistent with the present finding, such signalling was shown to be induced by full-length unprocessed Hh ligands.⁴¹ However, the molecular mechanisms by which 43 kDa FL-Dhh promotes endothelial barrier function remains to be characterized. All that we know so far is that 43 kDa FL-Dhh-induced endothelial barrier integrity involves Smo but is more likely independent on Gli transcription factors. Besides, consistent with Taddei *et al.* results, Dhh regulation of Cldn5 depends on FoxO1,²⁷ suggesting that Smo does not regulate tight junctions directly but rather through the regulation of adherens junctions. To further characterize this pathway, it is critical to fully understand why 43 kDa FL-Dhh, 45 kDa FL-Shh, 17 kDa N-Dhh, and 19 N-Shh do not all induce the same effects in ECs. Indeed, while they all induce Ptch1 degradation through the proteasome, each of them induces a specific Ptch1 relocalization. Notably, Ptch1 inhibition and internalization were shown to be carried out by separable parts of Shh,⁴² explaining why some Hh ligands-induced effects may be induced by any form of Hh ligands while other may be specific for one form or another. Consistently, it is currently not known why 19 kDa N-Shh is a strong activator of Gli1 transcription in fibroblast while 17 kDa N-Dhh is not.²²

Importantly, the present study may resolve quite a few inconsistent literature data regarding the role of Hh signalling in vascular biology.¹⁴ Indeed, in most studies that have investigated Shh effect on angiogenesis, Shh was delivered ectopically under its N-terminal form and was shown to be pro-angiogenic^{1,5,15} which is fully consistent with the results obtained in the present study. However, it would be necessary to determine the cell origin and the form under which endogenous Shh is produced in the setting of ischaemia to apprehend why ischaemia-induced angiogenesis was shown to be accelerated in Shh-deficient mice.¹⁶ Besides, studies reporting that Hh signalling promotes BBB integrity in adults have either used Smo inhibitors, Smo^{ECKO}, or Dhh^{ECKO} mice.^{2,17,43} In each of these cases, 43 kDa FL-Dhh-induced, Smo-dependent autocrine signalling in ECs was then more likely responsible for the findings. On the contrary, when glioblastoma-derived Dhh was shown to disrupt the BBB,¹⁸ it may have been produced under its 17 kDa N-Dhh form which competes with 43 kDa FL-Dhh. The same conclusion can be made from the study reporting that ectopic Shh expression induces haemorrhage in the spinal cord.¹⁹ Once again either FL-Shh or N-Shh may have acted as 43 kDa FL-Dhh competitive antagonists.

Moreover, while Hh signalling is mostly shown to be good for the cardiovascular system, Scube2 which was shown to be up-regulated in the setting of type 2 diabetes⁴⁴ and atherosclerosis,⁴⁵ has been associated with endothelial dysfunction⁴⁴ and has a strong proangiogenic activity.^{46,47} Since Scube2 promotes soluble 19 kDa cholesterol-esterified N-

Shh release, these results are actually fully consistent with the conclusion of the present study, i.e. 43 kDa FL-Dhh promotes endothelial barrier integrity and inhibits angiogenesis while 19 kDa N-Shh destabilizes endothelial intercellular junctions and promotes angiogenesis.

In conclusion, the present study reveals unsuspected competitive and antagonistic activities of the different forms and types of Hh ligands in the adult cardiovascular systems especially ECs. Such results represent a breakthrough regarding our understanding of the regulation of Hh signalling and demonstrate that Hh ligands or form of Hh ligands cannot be used instead of another for therapeutic purposes. AQ4

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

We thank Annabel Reynaud, Sylviane Grolleau, and Maxime David for their technical help. We thank Christelle Boullé for administrative assistance.

Conflict of interest: none declared. AQ5

Funding

This study was supported by grants from the Fondation de France (Appel d'Offre Recherche sur les maladies Cardiovasculaires 2013 and 2018), and the Fondation ARSEP pour la recherche sur la sclérose en plaques. In addition, this study was funded by a Marie Skłodowska-Curie Actions (MSCA-IF-2019) from the European council. Finally, this study was co-funded by the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' and by the University of Bordeaux. AQ6

Data availability

The data underlying this article are available in the article and its Supplementary material online. AQ7

References

- 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.
- Alvarez JJ, 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.
- Pola R, Ling LE, Aprahamian TR, Barban E, Bosch-Marce M, 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.
- 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.
- Kusano KF, Pola R, Murayama T, Curry C, Kawamoto A, Iwakura A, Shintani S, Li M, Asai J, Tkebuchava T, Thorne T, Takenaka H, Aikawa R, Goukassian D, von SP, 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.
- 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.
- 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.
8. Lavine KJ, Ornitz DM. Rebuilding the coronary vasculature: hedgehog as a new candidate for pharmacologic revascularization. *Trends Cardiovasc Med* 2007;**17**:77–83.
 9. Cristofaro B, Emanuelli C. Possible novel targets for therapeutic angiogenesis. *Curr Opin Pharmacol* 2009;**9**:102–108.
 10. Pan JY, Zhou SH. The hedgehog signaling pathway, a new therapeutic target for treatment of ischemic heart disease. *Pharmazie* 2012;**67**:475–481.
 11. Wang Y, Lu P, Zhao D, Sheng J. Targeting the hedgehog signaling pathway for cardiac repair and regeneration. *Herz* 2017;**42**:662–668.
 12. Dunaeva M, Waltenberger J. Hh signaling in regeneration of the ischemic heart. *Cell Mol Life Sci* 2017;**74**:3481–3490.
 13. Salybekov AA, Salybekova AK, Pola R, Asahara T. Sonic hedgehog signaling pathway in endothelial progenitor cell biology for vascular medicine. *Int J Mol Sci* 2018;**19**.
 14. Chapouly C, Guimbal S, Hollier P-L, Renault M-A. Role of hedgehog signaling in vasculature development, differentiation, and maintenance. *Int J Mol Sci* 2019;**20**.
 15. 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.
 16. Caradu C, Guy A, James C, Reynaud A, Gadeau AP, Renault MA. Endogenous Sonic Hedgehog limits inflammation and angiogenesis in the ischemic skeletal muscle of mice. *Cardiovasc Res* 2018.
 17. Caradu C, Couffignal T, Chapouly C, Guimbal S, Hollier P-L, Ducasse E, Bura-Rivière A, Dubois M, Gadeau A-P, Renault M-A. Restoring endothelial function by targeting desert hedgehog downstream of Klf2 improves critical limb ischemia in adults. *Circ Res* 2018;**123**:1053–1065.
 18. Azzi S, Treps L, Leclair HM, Ngo H-M, Harford-Wright E, Gavard J. Desert Hedgehog/Patch2 axis contributes to vascular permeability and angiogenesis in glioblastoma. *Front Pharmacol* 2015;**6**.
 19. Rowitch D, Jacques BS, 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.
 20. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980;**287**:795–801.
 21. Robbins DJ, Fei DL, Riobo NA. The Hedgehog signal transduction network. *Sci Signal* 2012;**5**:re6.
 22. Pathi S, Pagan-Westphal S, Baker DP, Garber EA, Rayhorn P, Bumcrot D, Tabin CJ, Blake Pepinsky R, Williams KP. Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev* 2001;**106**:107–117.
 23. Chinchilla P, Xiao L, Kazanietz MG, Riobo NA. Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* 2010;**9**:570–579.
 24. Farzan SF, Singh S, Schilling NS, Robbins DJ. Hedgehog processing and biological activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008;**294**:G844–G849.
 25. Tukachinsky H, Kuzmickas RP, Jao CY, Liu J, Salic A. Dispatched and scube mediate the efficient secretion of the cholesterol-modified hedgehog ligand. *Cell Rep* 2012;**2**: 308–320.
 26. Pettigrew CA, Asp E, Emerson CP. A new role for Hedgehogs in juxtacrine signaling. *Mech Dev* 2014;**131**:137–149.
 27. Hollier P-L, Guimbal S, Mora P, Diop A, Cornuault L, Couffignal T, Gadeau A-P, Renault M-A, Chapouly C. Genetic disruption of the blood brain barrier leads to protective barrier formation at the glia limitans. *bioRxiv* 2020;2020.03.13.990762.
 28. Lehmann GL, Hanke-Gogokhia C, Hu Y, Bareja R, Salfati Z, Ginsberg M, Nolan DJ, Mendez-Huergo SP, Dalotto-Moreno T, Wojcinski A, Ochoa F, Zeng S, Certiani JP, Panagis L, Zager PJ, Mullins RF, Ogura S, Luty GA, Bang J, Zippin JH, Romano C, Rabinovich GA, Elemento O, Joyner AL, Rafii S, Rodriguez-Boulan E, Benedicto I. Single-cell profiling reveals an endothelium-mediated immunomodulatory pathway in the eye choroid. *J Exp Med* 2020;**217**.
 29. 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.
 30. Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 2000;**127**:4775–4785.
 31. 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.
 32. de Melo J, Miki K, Rattner A, Smallwood P, Zibetti C, Hirokawa K, Monuki ES, Campochiaro PA, Blackshaw S. Injury-independent induction of reactive gliosis in retina by loss of function of the LIM homeodomain transcription factor Lhx2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;**109**:4657–4662.
 33. Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 2007;**45**:593–605.
 34. Azzoni E, Conti V, Campana L, Dellavalle A, Adams RH, Cossu G, Brunelli S. Mesogenic endothelium generates mesoangioblasts that contribute to several mesodermal lineages in vivo. *Development* 2014;**141**:1821–1834.
 35. 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.
 36. Hornig S, Therattil A, Moyon S, Gordon A, Kim K, Argaw AT, Hara Y, Mariani JN, Sawai S, Flodby P, Crandall ED, Borok Z, Sofroniew MV, Chapouly C, John GR. Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J Clin Invest* 2017;**127**:3136–3151.
 37. Argaw AT, Gurfein BT, Zhang Y, Zameer A, John GR. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;**106**:1977–1982.
 38. Chen XL, Chinchilla P, Fombonne J, Ho L, Guix C, Keen JH, Mehlen P, Riobo NA. Patched-1 proapoptotic activity is downregulated by modification of K1413 by the E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog. *Mol Cell Biol* 2014;**34**:3855–3866.
 39. Calcutt NA, Allendoerfer KL, Mizisin AP, Middlemas A, Freshwater JD, Burgers M, Ranciato R, Delcroix JD, Taylor FR, Shapiro R, Strauch K, Dudek H, Engber JM, Galdes A, Rubin LL, Tomlinson DR. Therapeutic efficacy of sonic hedgehog protein in experimental diabetic neuropathy. *J Clin Invest* 2003;**111**:507–514.
 40. Williams KP, Rayhorn P, Chi-Rosso G, Garber EA, Strauch KL, Horan GS, Reilly JO, Baker DP, Taylor FR, Kotliansky V, Pepinsky RB. Functional antagonists of sonic hedgehog reveal the importance of the N terminus for activity. *J Cell Sci* 1999;**112**: 4405–4414.
 41. Casillas C, Roelink H. Gain-of-function Shh mutants activate Smo cell-autonomously independent of Ptch1/2 function. *Mech Dev* 2018;**153**:30–41.
 42. Tukachinsky H, Petrov K, Watanabe M, Salic A. Mechanism of inhibition of the tumor suppressor Patched by Sonic Hedgehog. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016;**113**: E5866–E5875.
 43. Li T, Zhang J, Liu RY, Lian ZG, Chen XL, Ma L, Sun HM, Zhao YL. The role of the sonic hedgehog signaling pathway in early brain injury after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurosci Lett* 2013;**552**:81–86.
 44. Ali H, Rustam R, Aprilia D, Arizal C, Gusadri IB, Utami PR. Upregulation of SCUBE2 expression in dyslipidemic type 2 diabetes mellitus is associated with endothelin-1. *Diabetes Metab Syndr* 2019; **13**:2869–2872.
 45. Ali H, Emoto N, Yagi K, Vignon-Zellweger N, Nakayama K, Hatakeyama K, Asada Y, Rikitake Y, Hirata K-I. Localization and characterization of a novel secreted protein, SCUBE2, in the development and progression of atherosclerosis. *Kobe J Med Sci* 2013;**59**:E122–E131.
 46. Lin Y-C, Chao T-Y, Yeh C-T, Roffler SR, Kannagi R, Yang R-B. Endothelial SCUBE2 interacts with VEGFR2 and regulates VEGF-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;**37**:144–155.
 47. Lin Y-C, Liu C-Y, Kannagi R, Yang R-B. 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018;**38**:1202–1215.

Translational perspective

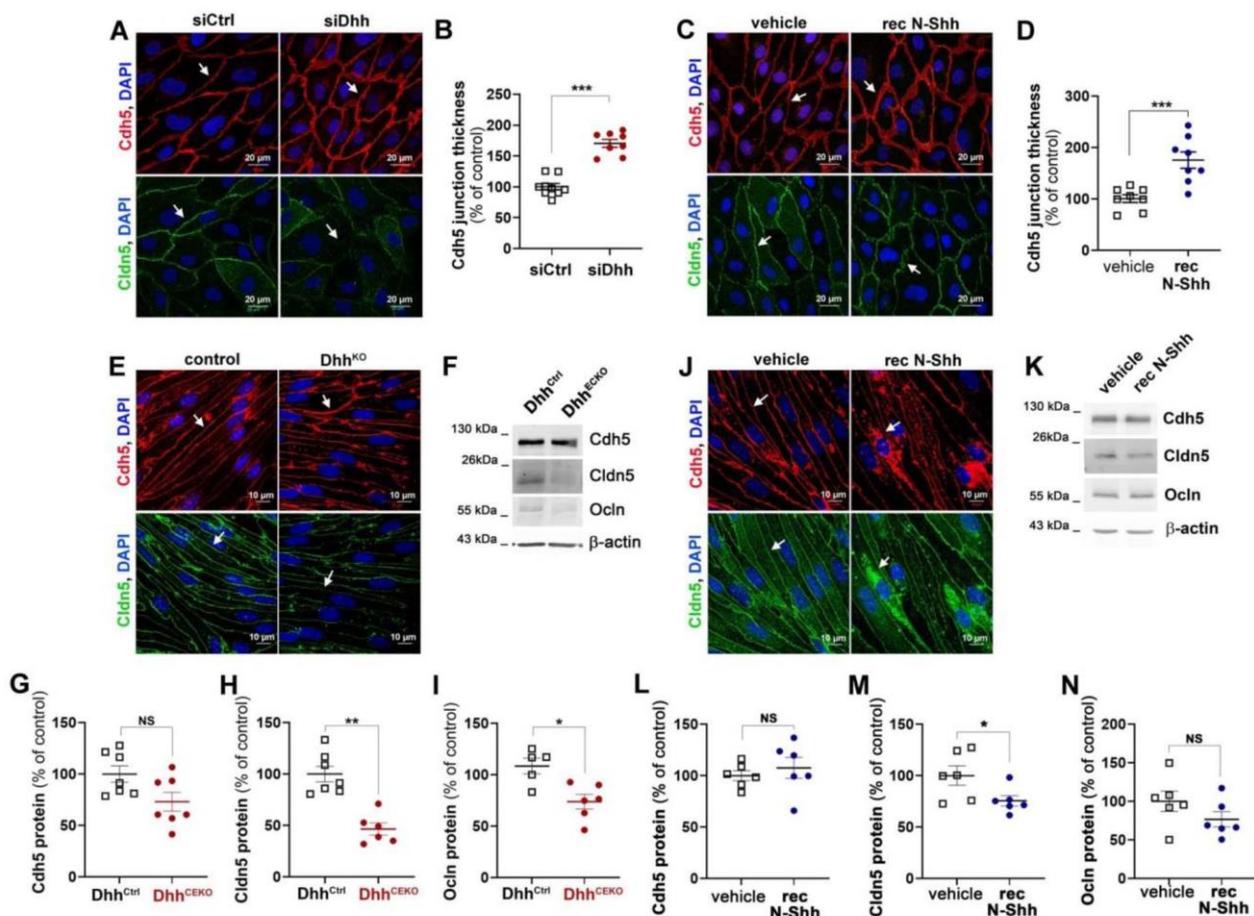
As a consequence, Hh ligands or forms of Hh ligands cannot be used instead of another for therapeutic purposes.

Full-length Dhh and N-terminal Shh act as competitive antagonists to regulate angiogenesis and vascular permeability

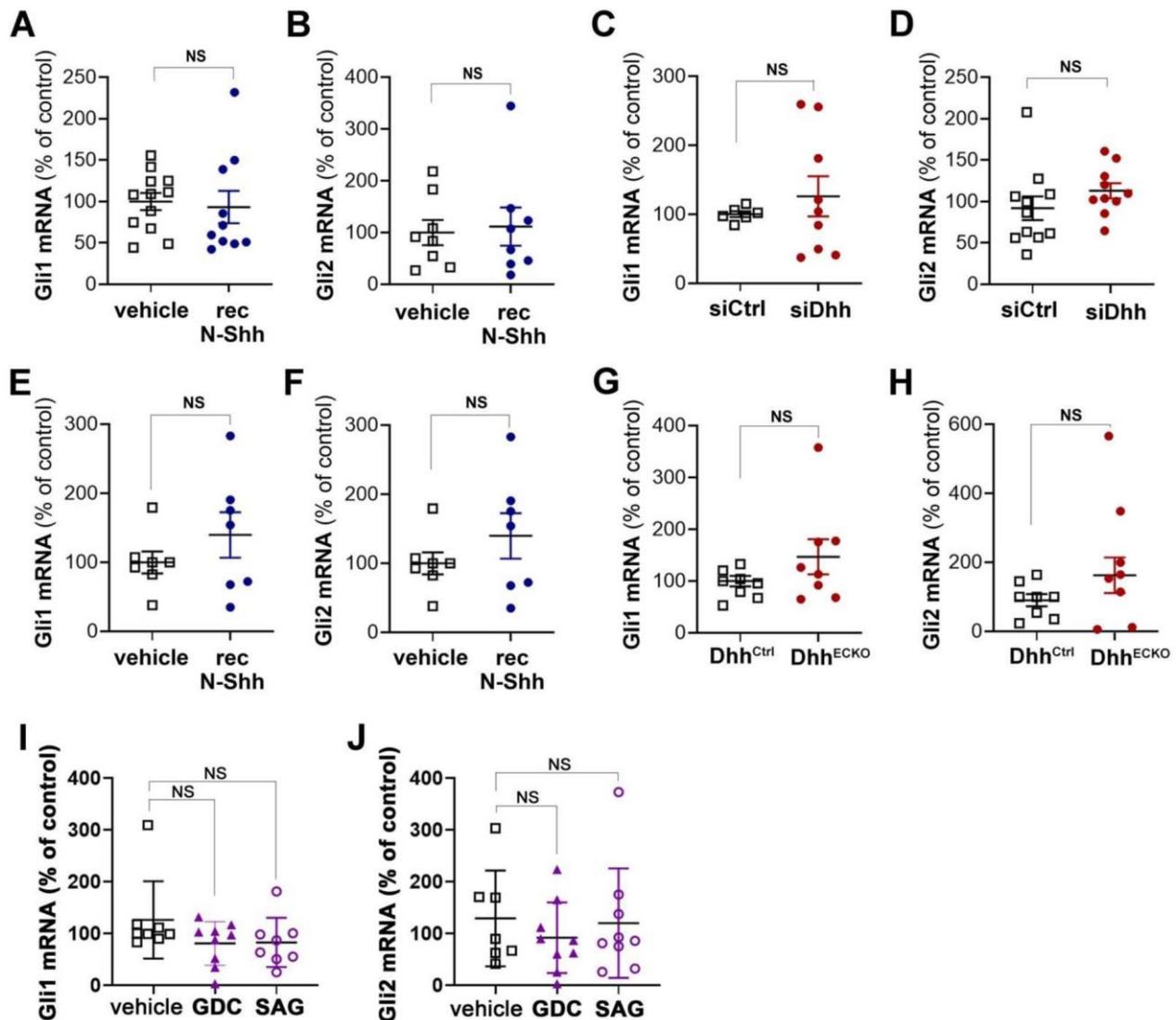
Pierre-Louis Hollier^{1*}, Candice Chapouly^{1*}, Aissata Diop¹, Sarah Guimbal¹, Lauriane Cornuault¹, Alain-Pierre Gadeau¹ and Marie-Ange Renault¹

Supplementary data

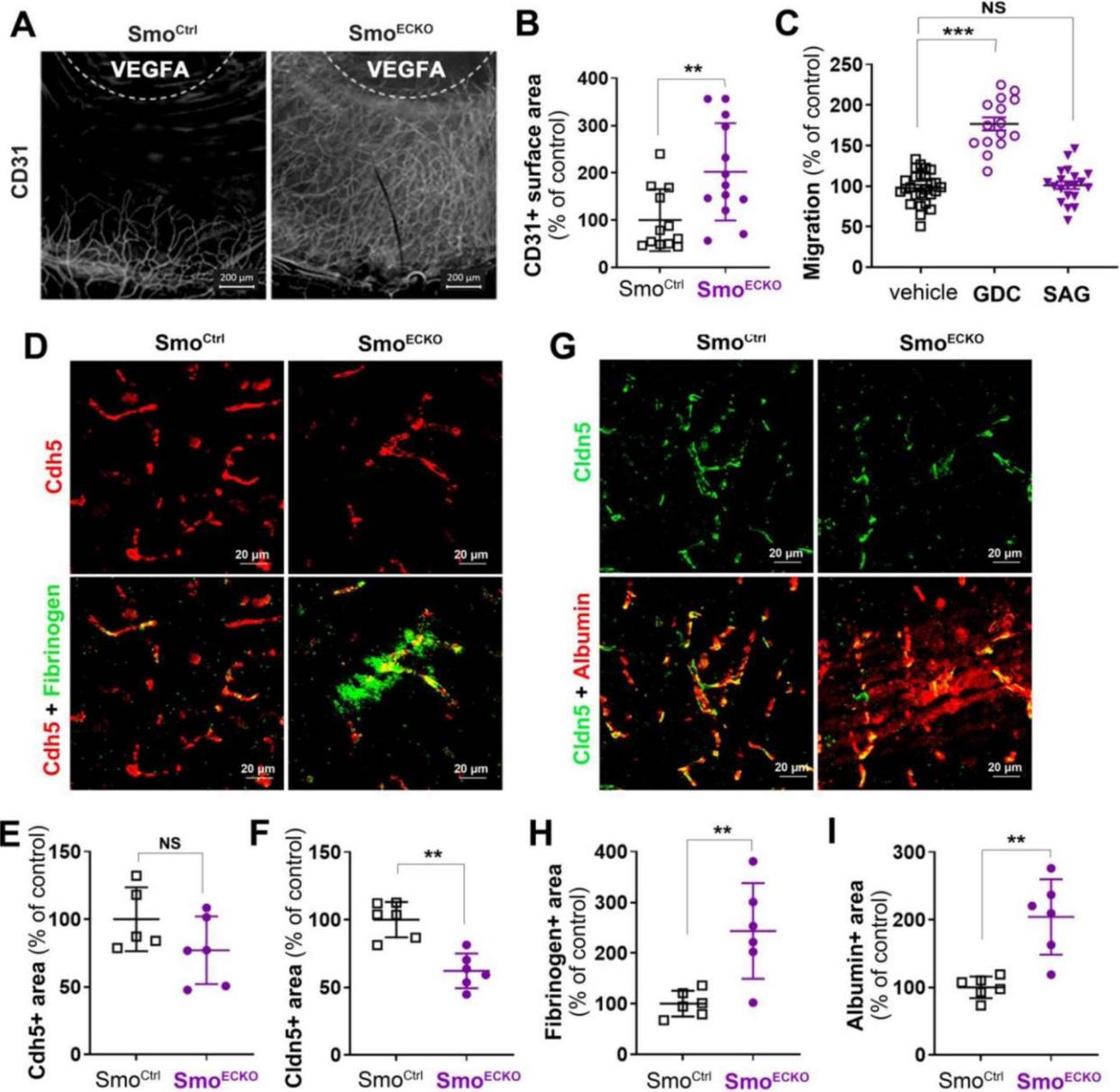
Supplementary Figures and Supplementary Figure Legends



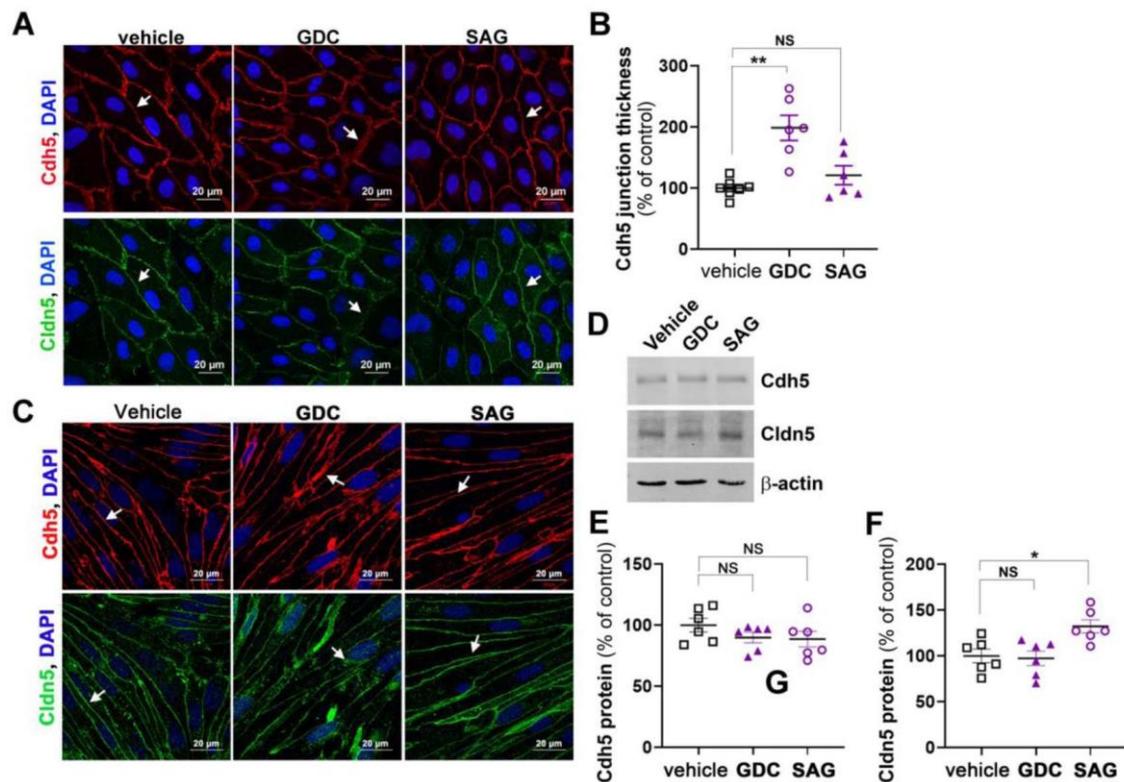
Supplementary Figure 1: EC-derived Dhh improves intercellular junction integrity while recombinant N-Shh disrupts it. (A-B) HUVECs were transfected with Dhh or control siRNAs. (A) Cdh5 (in red) and Cldn5 (in green) localization was evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer and (B) quantified as the mean junction thickness using Image J software. The experiment was repeated 8 times. (C-D) HUVECs were treated or not with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ recombinant N-Shh (rec N-Shh) for 30 minutes. (C) Cdh5 (in red) and Cldn5 (in green) localization was evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer and (D) quantified as the mean junction thickness using Image J software. The experiment was repeated 6 times. (E-I) mouse brain ECs were isolated from Cdh5-Cre^{ERT2}; Dhh^{Flox/Flox} (Dhh^{ECKO}) and Dhh^{Flox/Flox} (Dhh^{Ctrl}) mice that had been previously administered with tamoxifen. (E) Cdh5 (in red) and Cldn5 (in green) localization was evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer. (F) Cdh5, Cldn5 and Ocln protein levels were evaluated by western blot analyses and (G-I) quantified using Image J software (n=7 mice per group). (J) Mouse brain ECs were isolated from WT mice, and then treated or not with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rec N-Shh for 30 minutes. Cdh5 (in red) and Cldn5 (in green) localization was evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer. (K-N) mouse brain ECs were isolated from WT mice, and then treated or not with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ rec N-Shh for 24 hours. (K) Cdh5, Cldn5 and Ocln protein levels were evaluated by western blot analyses and (L-N) quantified using Image J software (n=6 mice per group). *: p \leq 0.05; **: p \leq 0.01; ***: p \leq 0.001; NS: not significant. Mann-Whitney test.



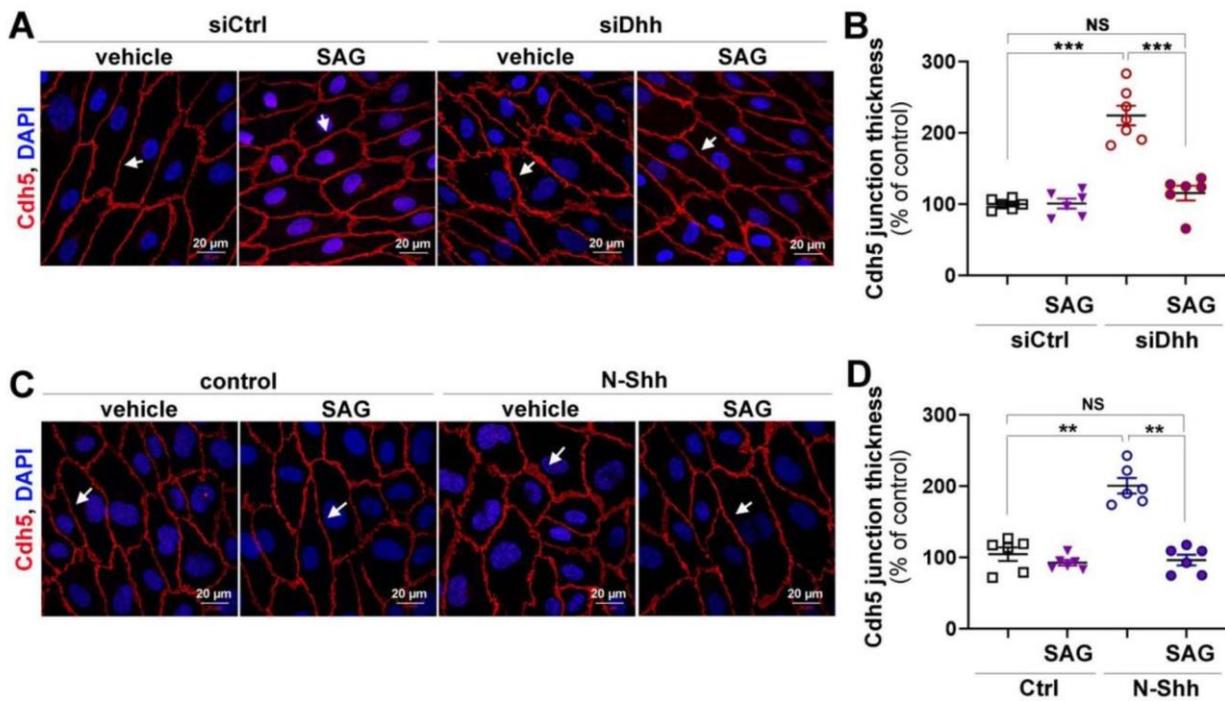
Supplementary Figure 2: *Hh* ligands do not modulate *Gli* expression in ECs. (A-B) HUVECs were treated or not with 1 μ g/mL recombinant N-Shh (recN-Shh) for 24 hours. Gli1 (A) and Gli2 (B) mRNA expression was quantified via RT-qPCR. The experiment was repeated 3 times, each experiment included triplicates. (C-D) HUVECs were transfected with Dhh or control siRNAs. Gli1 (C) and Gli2 (D) mRNA expression was quantified via RT-qPCR. The experiment was repeated 3 times, each experiment included triplicates. (E-F) Mouse brain ECs were isolated from WT mice, and then treated or not with 1 μ g/mL rec N-Shh for 24 hours. Gli1 (E) and Gli2 (F) mRNA expression was quantified via RT-qPCR (n=7 mice in each group) (G-H) mouse brain ECs were isolated from $Cdh5-Cre^{ERT2} Dhh^{Fllox/Fllox}$ (Dhh^{ECKO}) and $Dhh^{Fllox/Fllox}$ (Dhh^{Ctrl}) mice that had been previously administered with tamoxifen). Gli1 (G) and Gli2 (H) mRNA expression was quantified via RT-qPCR (n=8 mice in each group) (I-J) HUVECs were treated with either 30 nmol/L GDC-0449, 100 nmol/L SAG or control vehicle for 24 hours. Gli1 (I) and Gli2 (J) mRNA expression was quantified via RT-qPCR. The experiment was repeated 3 times, each experiment included triplicates. NS: not significant. Mann-Whitney test.



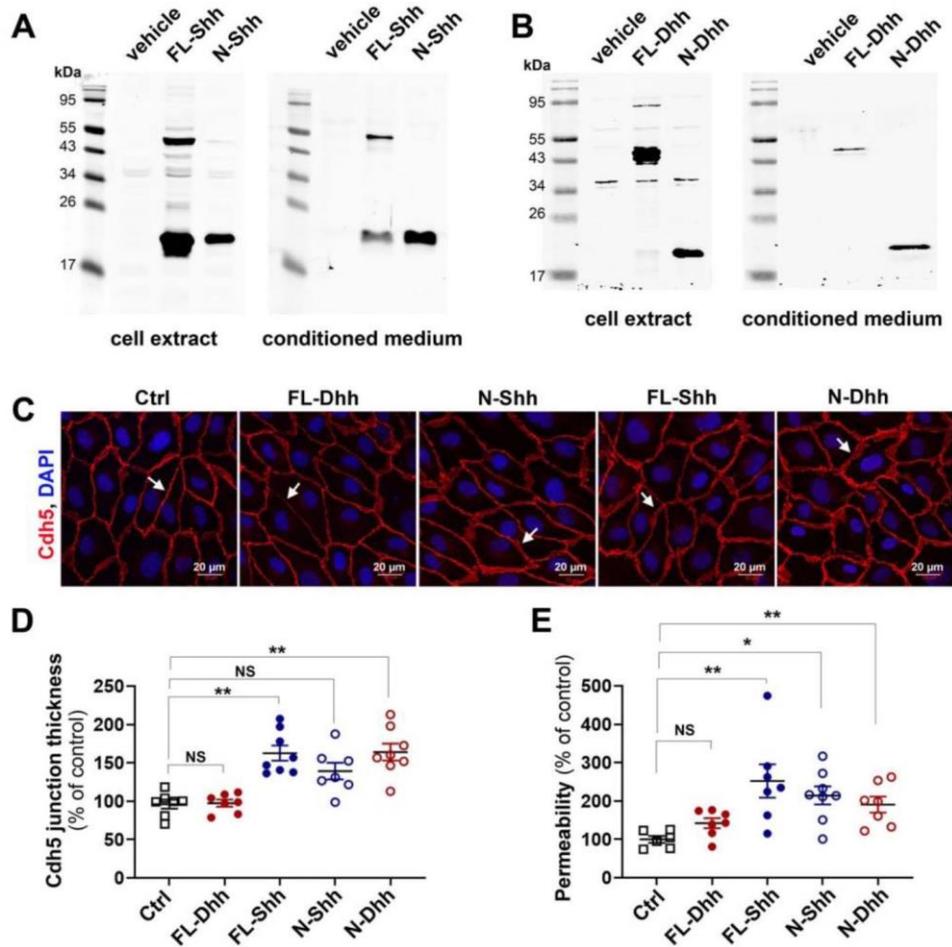
Supplementary Figure 3: Inhibition of Hh signaling in ECs promotes angiogenesis and destabilizes the BBB. (A-B) VEGFA containing pellets were implanted in the corneas of Cdh5-Cre^{ERT2} Smo^{Flox/Flox} (Smo^{ECKO}) and Smo^{Flox/Flox} (Smo^{Ctrl}) mice 2 weeks after they were administered with tamoxifen. Whole mount corneas were immunostained with anti-CD31 antibodies to identify blood vessels. (A) Representative pictures are shown. (B) Angiogenesis was quantified as the percentage of CD31+ surface area (n=13 and 12 corneas respectively). (C) HUVECs were treated either with 30 nmol/L GDC-0449, 100 nmol/L SAG or control vehicle. Cell migration was assessed in a chemotaxis chamber. The experiment was repeated 4 times, each experiment included n=4 wells/conditions. (D-I) Smo^{ECKO} and Smo^{Ctrl} mice were sacrificed 2 weeks after they were administered with tamoxifen (n= 6 mice in each group). (D) Brain sagittal sections were immunostained with either anti-Cdh5 (in red), and anti-Fibrinogen (in green) antibodies (E) or anti-Cldn5 (in green) and anti-Albumin (in red) antibodies. Representative confocal images are shown. (F) Cdh5 expression was quantified as the Cdh5+ surface area. (G) Cldn5 expression was quantified as the Cldn5+ surface area. (H) Fibrinogen extravasation was quantified as the fibrinogen+ surface area. (I) Albumin extravasation was quantified as the albumin+ surface area. **: p \leq 0.01; ***: p \leq 0.001; NS: Not significant. Mann-Whitney test.



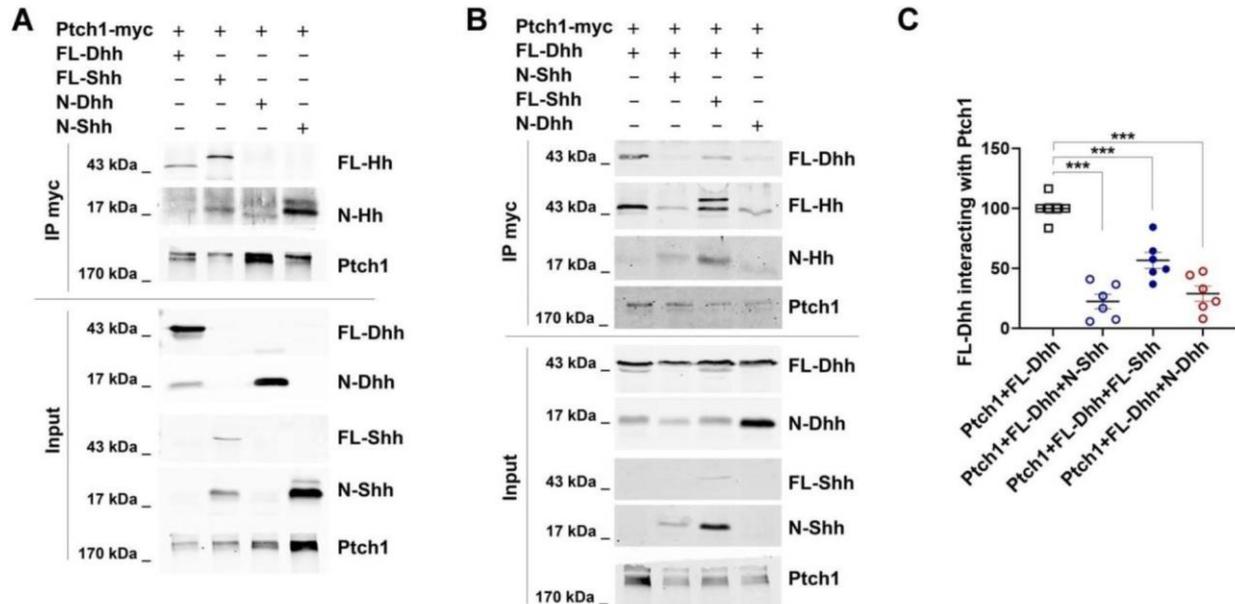
Supplementary Figure 4: Inhibition of Hh signaling in ECs destabilizes intercellular junctions and promotes EC migration. (A-B) HUVECs were treated either with 30 nmol/L GDC-0449, 100 nmol/L SAG or control vehicle. (A) Cdh5 (in red) and Cldn5 (in green) localization was evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer and (B) quantified as the mean junction thickness using Image J software. The experiment was repeated 6 times. (C-F) Mouse brain ECs were isolated from C57BL/6 WT mice and then treated either with 30 nmol/L GDC-0449, 100 nmol/L SAG or control vehicle for 24 hours. (C) Cdh5 (in red) and Cldn5 (in green) localization was evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer. (D) Cdh5 and Cldn5 protein levels were evaluated by western blot analyses and (E-F) quantified using Image J software (n=6 in each group). *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; NS: not significant. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.



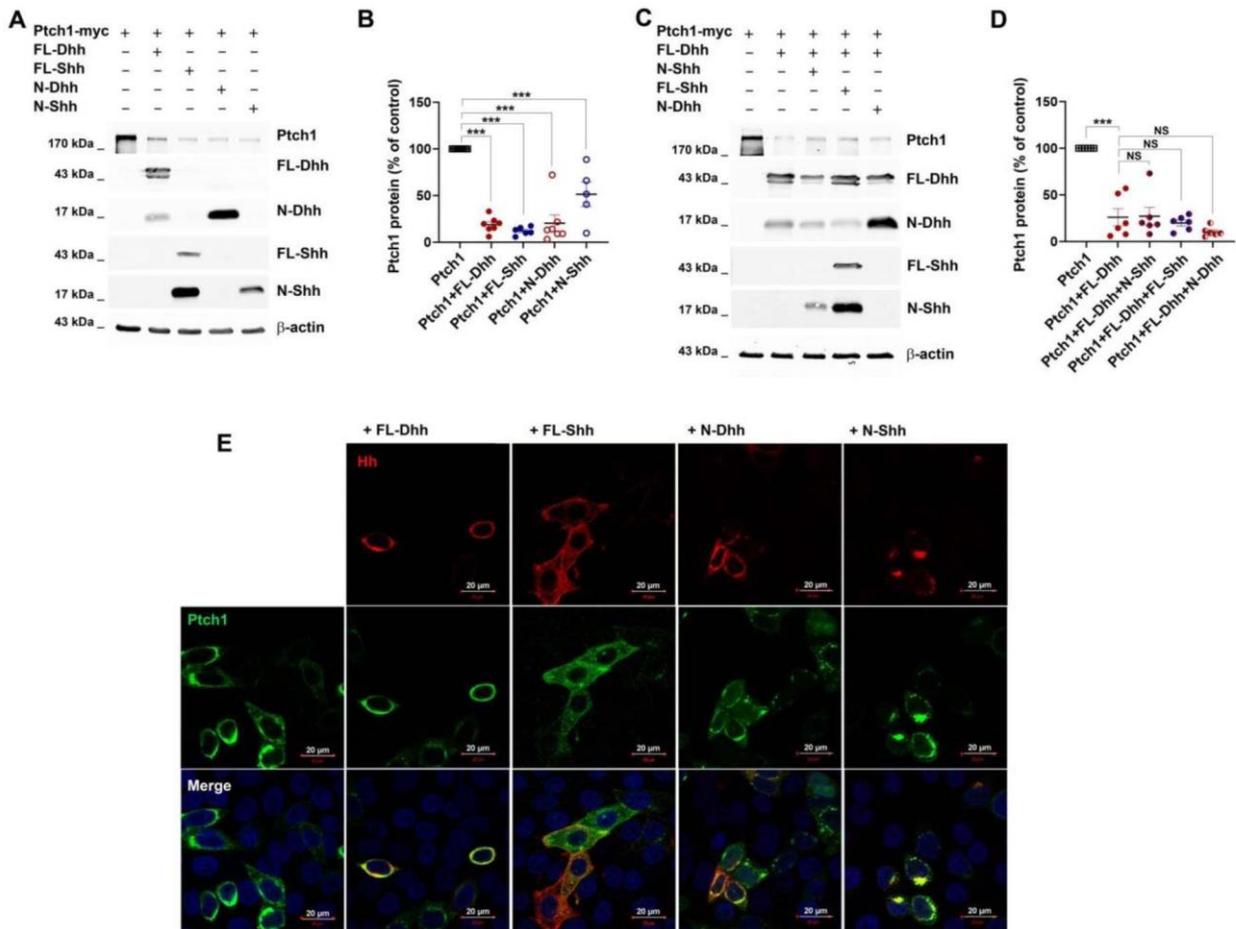
Supplementary Figure 5: *FL-Dhh* activates *Hh* signaling in ECs while *N-Shh* inhibits it. (A-B) HUVECs were transfected with Dhh or control siRNAs and then treated or not with 100 nmol/L SAG for 16 hours. (A) Cdh5 (in red) localization was evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer and (B) quantified as the mean junction thickness using Image J software. The experiment was repeated 6 times. (C-D) HUVECs were treated or not with 1 µg/mL rec N-Shh for 16 hours in the presence or not of 100 nmol/L SAG (C) Cdh5 (in red) localization was evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer and (D) quantified as the mean junction thickness using Image J software. The experiment was repeated 6 times. **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$; NS: not significant. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.



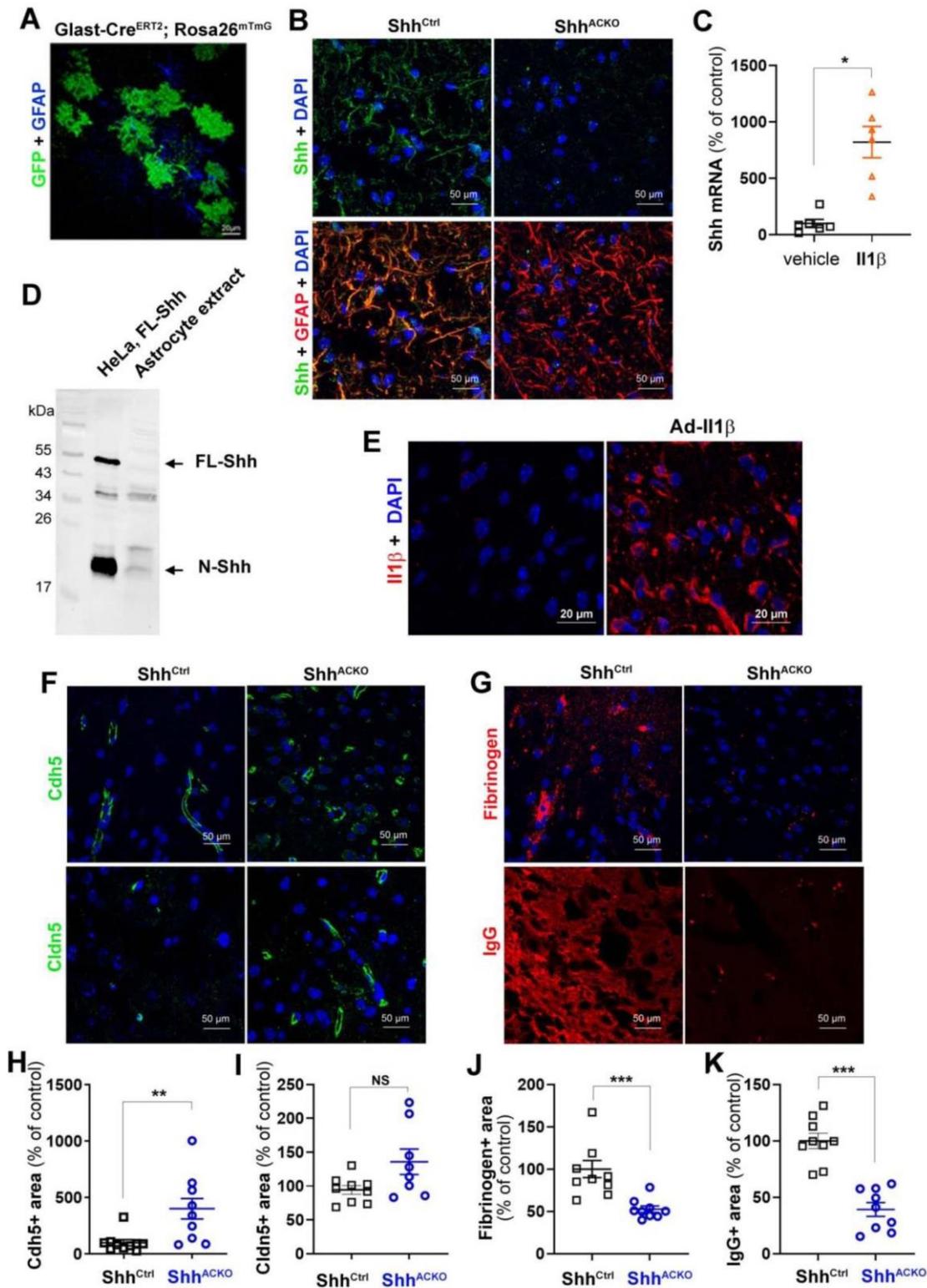
Supplementary Figure 6: (A) HeLa cells were transfected either with FL-Shh or N-Shh encoding plasmids. Expression and secretion of Shh was assessed by western blot analysis. (B) HeLa cells were transfected either with FL-Dhh or N-Dhh encoding plasmids. Expression and secretion of Dhh was assessed by western blot analysis. (C-E) HUVECs were treated with conditioned medium from HeLa containing or not FL-Dhh, N-Shh, FL-Shh or N-Dhh. (C) Cdh5 localization was evaluated by immunofluorescent staining (in red) of a confluent cell monolayer and (D) quantified as the mean junction thickness using Image J software. The experiment was repeated 6 times. (E) Endothelial monolayer permeability to 70 kDa FITC-Dextran was assessed using Transwells. The experiment was repeated 3 times, each experiment included duplicates. *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; NS: not significant. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.



Supplementary Figure 7: (A) HeLa cells were co-transfected Ptch1-myc together with FL-Dhh, FL-Shh, N-Dhh or N-Shh encoding plasmids. Hh ligands interaction with Ptch1 was assessed by co-immunoprecipitation assay. (B) HeLa were co-transfected Ptch1-myc and FL-Dhh encoding plasmids together with or without N-Shh, FL-Shh or N-Dhh encoding plasmids. Hh ligands interaction with Ptch1 was assessed by co-immunoprecipitation assay and (C) quantified using Image J software. The experiment was repeated 6 times. ***: $p \leq 0.001$. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.

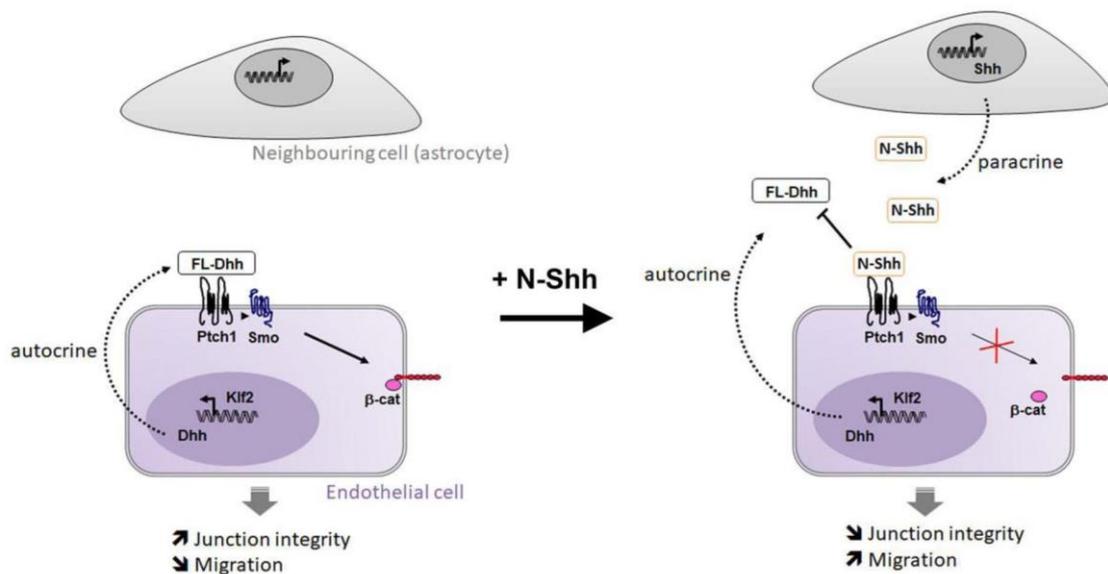


Supplementary Figure 8: (A) HeLa cells were co-transfected with Ptch1-myc encoding plasmids together with plasmids expressing or not FL-Dhh, FL-Shh, N-Dhh or N-Shh. Ptch1, Dhh, and Shh protein level was assessed by western blot analysis. (B) Ptch1 protein level was quantified using Image J software. The experiment was performed 6 times. (C) HeLa cells were co-transfected Ptch1-myc and FL-Dhh encoding plasmids together with or without N-Shh, FL-Shh or N-Dhh encoding plasmids. Ptch1, Dhh, and Shh protein level was assessed by western blot analysis. (D) Ptch1 protein level was quantified using Image J software. The experiment was performed 6 times. (E) HeLa cells were co-transfected with Ptch1-myc encoding plasmids together with plasmids expressing or not FL-Dhh, FL-Shh, N-Dhh or rec N-Shh. Ptch1 (in green), Dhh (in red), and Shh (in red) protein localization was assessed by immune-fluorescent staining. ***: $p \leq 0.05$; NS: not significant. Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test.



Supplementary Figure 9: (A) Spinal cord sections from *Glast-Cre^{ERT2}; Rosa26^{mT/mG}* were co-immunostained with anti-GFP (in green) and anti-GFAP (in blue) antibodies. The co-localization of GFAP and GFP staining validate the specific activity of the Cre recombinase within the astrocytes in the *Glast-Cre^{ERT2}* mouse model. (B) EAE was induced in both *Glast-Cre^{ERT2}; Shh^{Flox/Flox}* (*Shh^{ACKO}*) and *Shh^{Flox/Flox}* (*Shh^{Ctrl}*) mice. Mice were sacrificed 32 days later. Spinal cord sections were co-immunostained with anti-Shh (in green) and anti-GFAP (in red) antibodies. (C) Cultured normal

human astrocytes were treated with or not with 10 ng/mL $Il1\beta$ for 24 hours. Shh mRNA expression was quantified by RT-qPCR. The experiment was repeated 6 times. (D) Shh protein expression in cell extract from both HeLa transfected with FL-Shh encoding plasmids and $Il1\beta$ -treated astrocytes was analysed by western blot. (E-K) Both $Glast-Cre^{ERT2}; Shh^{Fllox/Fllox}$ (Shh^{ACKO}) and $Shh^{Fllox/Fllox}$ (Shh^{ctrl}) mice were administered in the cerebral cortex with adenoviruses encoding $Il1\beta$. Mice were sacrificed 7 days later. (E) Brain coronal sections were immunostained with anti- $Il1\beta$ (in red) antibodies. (F) Brain coronal sections were immunostained with anti-Cdh5 (in green) or anti-Cldn5 (in green) antibodies. Representative confocal images are shown. (G) Cdh5 and (H) Cldn5 expression was quantified as the Cdh5+ (n=9 mice in each group) and Cldn5+ (n=8 and 9 mice respectively) surface area respectively. (I) Brain coronal sections were immunostained with anti-Fibrinogen (in red) and anti-IgG (in red) antibodies. Representative confocal images are shown. (J) Fibrinogen and (K) IgG extravasation was quantified as the fibrinogen+ surface area (n=9 mice in each group) and Albumin+ surface area respectively (n=9 mice in each group). *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$; NS: not significant. Mann-Whitney test.



Supplemental Figure 10: Schema recapitulating the findings. In healthy conditions, FL-Dhh which is produced by endothelial cell themselves promotes endothelium integrity and quiescence. N-Shh which is either produced in a neighbouring cell in pathological conditions (e.g. astrocytes in the setting of brain inflammation) or administered ectopically prevents FL-Dhh binding to Ptch1 which leads to destabilization of endothelial intercellular junctions and an increased EC migration.

Supplemental table

hActb	F	5' -GGAGGAGCTGGAAGCAGCC-3'
	R	5' -GCTGTGCTACGTGCGCCCTG-3'
hDhh	F	5' -AACAGCTTACTTCCGGCTCC-3'
	R	5' -CGACTCTTGTGGGCTCTGTT-3'
hDisp1	F	5' -TGCAGAAGCACTGGATCGTT-3'
	R	5' -CTGTGACAAGCTCAGCTCCA-3'
hGli1	F	5' -TTCTACCAGAGTCCCAAGT-3'
	R	5' -CCCTATGTGAAGCCCTATTT-3'
hGli2	F	5' -CAGATCCACATGTACGAACAG-3'
	R	5' -CCATGATGGCATCGAAGTC-3'
hShh	F	5' -CAGTTTATCCCAATGTGGC-3'
	R	5' -GCCAAAGCGTTCAACTTGTC-3'
mActb	F	5' -CCTGAACCCTAAGGCCAACC-3'
	R	5' -TAGCCCTCGTAGATGGGCAC-3'
mGli1	F	5' -GAAGGAATTCGTGTGCCATT-3'
	R	5' -GCAACCTTCTTGCTCACACA-3'
mGli2	F	5' -TGGTTGAGCGGAAGGTTGAA-3'
	R	5' -ACAGGTTTGGGATACGCACA-3'
mDhh	F	5' -CTTGGACATCACCACGTCTG-3'
	R	5' -ATGTAGTTCCTCAGCCCCT-3'
mlhh	F	5' -TGTCAAGTCTGAGCATTCCGG-3'
	R	5' -GTCTCGATGACCTGGAAAGC-3'
mShh	F	5' -GTCGAGCAGTGGACATCACC-3'
	R	5' -GAAACAGCCCGCGGATTTGG-3'

F forward, R reverse

Actb was used as the household gene

Supplementary Table I: List of primers used for reverse transcription (RT) quantitative polymer chain reaction (qPCR)

Supplementary methods

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) (Lonza) were cultured in endothelial basal medium-2 (EBM-2) supplemented with EGM™-2 BulletKit™ (Lonza). Cell from passage 3 to passage 6 were used. Each experiment was performed on at least 2 independent cell batches. HeLa ATCC®CCL-2™ cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) supplemented with 10% fetal bovine serum. Normal human astrocytes (Lonza) were cultured in astrocytic basal medium (ABM) supplemented with AGM bulletKit™ (Lonza). Cell from passage 2 to passage 5 were used.

Recombinant proteins and chemicals

Recombinant N-Shh was from Shenedoah, the Hhat inhibitor RU SKI 43 was from Sigma Aldrich, the Smoothened agonist SAG was from Sigma Aldrich, while GDC-0449 was from Selleckchem.

siRNA/transfection

HUVECs were transfected with human Dhh siRNA: rArCrUrCrCrUrUrArArArGgArGrGrArCrUrArUrUrArGCC, human Disp1 siRNA: rGrGrArUrCrUrArArCrArArGrUrUrArCrArUrUrGrUrArUAG or universal scrambled negative control siRNA duplex (Origen) using JetPRIME™ transfection reagent (Polyplus Transfection), according to the manufacturer's instructions.

Plasmids/Transfection

pIRES-NDhh⁴⁷, pIRES-NShh¹⁶ and pcDNA3-FL-Dhh⁴³ were described previously. Human FL-Dhh sequence was obtained after EcoRI digestion of pBS hSHH (Addgene ID13996) and then cloned at the EcoRI site of pCDNA3.1 myc His to generate the pcDNA3-FL-Shh plasmid. The myc-tagged human Ptch1, Ptch1-1B-myc was kindly given by R. Toftgard⁴⁸ and the human full length Dhh was previously described⁴³. HeLa cells were transfected using JetPRIME™ transfection reagent (Polyplus Transfection), according to the manufacturer's instructions.

Quantitative RT-PCR

RNA was isolated using Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc) as instructed by the manufacturer, from 3×10^5 cells or from tissue 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 table 1.

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

Migration assay

Cell migration was evaluated with a chemotaxis chamber (Neuro Probe, Inc., Gaithersburg, MD, USA). Briefly, a polycarbonate filter (8 µm pore size) (GE Infrastructure, Fairfield, CN, USA) was coated with a solution containing 0.2% gelatin (Sigma-Aldrich Co.) and inserted between the chambers. 5×10^4 cells per well were seeded in the upper chamber, and the lower chamber was filled with EBM-2 containing 0.5% FBS. Cells were incubated for 8 hours at 37°C then viewed under 20× magnification,

and the number of cells that had migrated to the lower chamber were counted in 3 HPFs per well; migration was reported as the mean number of migrated cells per HPF. Each condition was assayed in triplicate and each experiment was performed at least three times.

In vitro permeability assay

100 000 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 one hour later.

Immunoprecipitation/western blot analysis

Prior to western blot analysis, Ptch1 was immunoprecipitated with anti myc-tag antibodies (Millipore, Cat# 05-724). Expression of Dhh, Shh, Ptch1 and Smo were evaluated by SDS PAGE using mouse anti-Dhh antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat# sc-271168), mouse anti-Shh antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat#sc-365112), rabbit-anti Hh antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Cat# sc-9024), rabbit anti-Ptch1 antibodies (Abcam, Cat#ab53715).

Expression of junction protein Cdh5, Ocln and Cldn5 was evaluated by SDS PAGE using goat anti-mouse Cdh5 antibodies (R&D systems, cat#AF1002), mouse anti-Ocln (Invitrogen, cat#33-1500) and mouse anti-Cldn5 antibodies (Invitrogen, cat#33-1500).

Protein loading quantity was controlled using rabbit monoclonal anti- β -actin antibodies (Cell Signaling Technology, Cat#4970). 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).

Proximity ligation assay

Proximity ligation assay was performed using the Duolink® In Situ Orange Starter Kit Mouse/Rabbit (Sigma) according to the manufacturer instructions. Images were taken at the 63x magnification under a confocal microscope. 8-12 transfected cells per conditions were imaged for quantification.

Manuscripts - Article II :

Title

Genetic disruption of the Blood Brain Barrier leads to protective barrier formation at the Glia Limitans

Authors and affiliations

Pierre-Louis Hollier^{1*}, Sarah Guimbal^{1*}, Pierre Mora¹, Aïssata Diop¹, Lauriane Cornuault¹, Thierry Couffinhal¹, Alain-Pierre Gadeau¹, Marie-Ange Renault¹ and Candice Chapouly¹

¹ Univ. Bordeaux, Inserm, Biology of Cardiovascular Diseases, U1034, CHU de Bordeaux, F-33604 Pessac, France

* These authors contributed equally to this work

Corresponding author

Candice Chapouly

Inserm U1034

1, avenue de Magellan

33604 Pessac

France

e-mail : candice.chapouly@inserm.fr

Tel : (33) 5 57 89 19 79

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

Recent work demonstrated that Central Nervous System (CNS) inflammation induces endothelial Blood Brain Barrier (BBB) opening as well as the formation of a tight junction barrier between reactive astrocytes at the Glia Limitans. We hypothesized that these two barriers may be reciprocally regulated by each other state and further, that the CNS parenchyma may acquire protection from the reactive astrocytic Glia Limitans not only in neuro-inflammation but also when BBB integrity is compromised under resting condition, without pathology. Previous studies identified Sonic hedgehog (Shh) astrocytic secretion as implicated in stabilizing the BBB during neuropathology and we recently demonstrated that desert hedgehog (Dhh) is expressed at the BBB in adults.

Here we unraveled the role of the morphogen Dhh in maintaining BBB tightness and, using endothelial Dhh knockdown as a model of permeable BBB, we demonstrated that a double barrier system comprising both the BBB and Glia Limitans, is implemented in the CNS and regulated by a crosstalk going from endothelial cell to astrocytes.

First, we showed that, under neuro-inflammatory conditions, Dhh expression is severely down regulated at the BBB and that Dhh is necessary for endothelial intercellular junction integrity as Dhh knockdown leads to CNS vascular leakage. We then demonstrated that, in Dhh endothelial knockout (Dhh^{ECKO}) mice which display an open BBB, astrocytes are reactive and express the tight junction Claudin 4 (Cldn4) and showed that astrocytes can respond to signals secreted by the permeable endothelial BBB by becoming reactive and expressing Cldn4. To examine the consequences of the above results on disease severity, we finally induced multiple sclerosis in Dhh^{ECKO} mice versus control littermates and showed that the pathology is less severe in the knockout animals due to Glia Limitans tightening, in response to BBB leakage, which drives inflammatory infiltrate entrapment into the perivascular space. Altogether these results suggest that genetic disruption of the BBB generates endothelial signals capable of driving the implementation of a secondary barrier at the Glia Limitans to protect the parenchyma. The concept of a reciprocally regulated CNS double barrier system has implications for treatment strategies in both the acute and chronic phases of multiple sclerosis pathophysiology.

Abbreviations

Alb	Albumin
Aldh11	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1
BBB	Blood Brain Barrier
Cd4	Cluster of differentiation 4
Cd45	Cluster of differentiation 45
Cdh5	Cadherin5
Cldn4	Claudin4
Cldn5	Claudin5
Dhh	Desert hedgehog
FoxO1	Forkhead box O1
Fgb	Fibrinogen beta chain
Gfap	Glial fibrillary acidic protein
Icam1	Intercellular adhesion molecule 1
IgG	Immunoglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
Mbp	Myelin basic protein
NeuN	RNA binding fox-1 homolog 3
Pdgfb	Platelet derived growth factor subunit b
Pdgfr β	Platelet derived growth factor receptor beta
Pecam1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule 1
Podxl	Podocalyxin
PVS	Perivascular space
Tymp	Thymidine phosphorylase
Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1
VegfA	Vascular endothelial growth factor A
Vim	Vimentin
Zo1	Zonula Occludens 1

Introduction

In a healthy individual, the CNS parenchyma is protected from the peripheral circulation by the blood-brain barrier (BBB) which tightly regulates the entry and exit of soluble factors and immune cells¹. Importantly, during multiple sclerosis, the abnormal permeability of the BBB allows penetration into the CNS parenchyma of inflammatory cells and soluble factors such as autoantibodies, cytokines and toxic plasma proteins which drive lesion formation and acute disease exacerbation^{2,3}. Therefore identifying key mechanisms that promote BBB tightness is currently considered as a main strategy to control leukocyte and humoral entry, preventing disease progression and severity in multiple sclerosis.

Previous studies identified the Hedgehog (Hh) pathway as a new regulator of vessel integrity in multiple sclerosis, HIV and stroke, showing its implication in stabilizing the BBB⁴⁻⁷ and we recently demonstrated that Dhh is expressed at the BBB in adults⁸. Dhh, together with Shh (sonic hedgehog) and Ihh (indian hedgehog), belongs to the Hh family identified nearly 4 decades ago in drosophila as crucial regulators of cell fate determination during embryogenesis⁹. The interaction of Hh proteins with their specific receptor patched-1 (Ptch1) derepresses the transmembrane protein smoothened (Smo), which activates downstream pathways, including the Hh canonical pathway leading to the activation of gli family zinc finger (Gli) transcription factors and the so-called Hh non canonical pathways, which are independent of Smo and/or Gli¹⁰.

Interestingly, recent discovery showed that considering the BBB only as a vascular structure may be a simplistic and inaccurate vision. Indeed, a substantial intercellular communication occurs between vascular cells and the adjoining glia¹¹. It is more proper to consider CNS barrier structure as a multicellular neurovascular unit that includes pericytes¹², astrocytes¹³ as well as the blood vessels themselves. More specifically, to enter the CNS from the vasculature, soluble factors and immune cells must initially traverse the BBB. Then, they circulate within the perivascular space (PVS), a region surrounding the basal surface of the endothelial cell wall to reach the CNS parenchyma by going through a network of astrocytes termed the Glia Limitans^{14,15}. While it is now well established that BBB breakdown leads to soluble factor and inflammatory cell infiltration into the PVS during neuropathology⁴, the role of the Glia Limitans appears trickier. Indeed, astrocytes, described as reactive, are emerging as “Dr Jekyll and Mister Hyde” cells, having complex roles in both recruiting and restricting neuro-inflammatory infiltration¹⁶. Reactive astrocyte behavior is determined in a context-specific manner by signaling events that vary with the nature and severity of CNS insults. Specifically, in multiple sclerosis as well as Alzheimer’s and Parkinson’s diseases, it has been shown that reactive astrocytes, on one hand, produce pro-inflammatory and pro-permeability factors¹⁷⁻¹⁹ and on the other hand, neuro-protective factors². Strikingly, the results we published in 2017 raised considerable attention on a new property of reactive astrocytes: the expression of tight junction proteins (notably Claudin4 (Cldn4)) under inflammatory conditions²⁰.

The first objective of our study is to decipher the role of the morphogen desert hedgehog (Dhh) in maintaining BBB tightness. The second objective is to demonstrate that a double barrier system comprising both the BBB and Glia Limitans, is implemented in the CNS and regulated by a crosstalk going from endothelial cell to astrocytes, using endothelial Dhh knockdown as a model of permeable BBB.

In this study, we first demonstrated that endothelial Dhh expression is down regulated during neuro-inflammation and necessary to maintain BBB tightness. We then showed that BBB opening, induced by Dhh knockdown, drives astrocyte Cldn4 expression, conferring barrier properties to the Glia Limitans which result in the PVS entrapment of plasmatic protein and inflammatory cell both physiologically and during pathology. Altogether these data identify the gliovascular unit as a double barrier system whom function is controlled by the crosstalk between endothelial cell and astrocyte.

In conclusion, this work strengthen the concept of CNS double barrier system, unveiling how signals at the endothelium drive astrocyte barrier properties to protect the parenchyma during

neuropathology. Consequently, taking into account both components of the gliovascular unit is of translational interest and could open the way for new therapeutic strategies notably to limit progressive multiple sclerosis pathology.

Results

Desert hedgehog (but not Sonic and Indian hedgehog) is expressed by CNS microvascular endothelial cells and downregulated during chronic neuro-inflammation.

First, we showed that Dhh is expressed at the BBB both *in vitro* using mouse CNS MECs* (Figure 1, A) and *in vivo* using human cortical sections from healthy donors (Figure 1, B). Shh and Ihh are not expressed in the healthy CNS confirming the single cell sequencing data from the Betscholtz's lab²⁵ and Dhh is known to be stored intracellularly as well as being secreted⁷. Therefore, we here infer the CNS endothelial cells as the source of Dhh within the gliovascular unit. Next, we demonstrated that Dhh is severely down regulated at the BBB under inflammatory conditions both *in vitro* using HBMECs treated with IL-1 β (one of the main pro-inflammatory cytokine implicated in multiple sclerosis pathophysiology) (Figure 1, C) and *in vivo* (Figure 1, F) using a pre-clinical model of multiple sclerosis (MOG₃₅₋₅₅) to induce chronic neuro-inflammation in C57BL/6 mice. Dhh down regulation at the BBB is associated to the up regulation of endothelial activation markers Icam1 (Figure 1, D, G) and Vcam1 (Figure 1, E, H) and to the down regulation of tight junctions (Cldn5 and Zo1) (Figure 1, I-J).

Altogether these data identify Dhh as the only Hh expressed in adults at the endothelial BBB. Moreover they highlight the fact that Dhh expression is down regulated at the BBB during neuro-inflammatory pathology.

** It is important to note that CNS endothelial cells are from a pooled source including both brain and spinal cord tissues. Therefore the resulting cell cultures/lysates may be heterogeneous in their use of Dhh. This remark applies to Figure 1, Figure 2, Figure 3 and Figure 4.*

Endothelial-specific Dhh inactivation induces adherens junction Cdh5 and tight junction Cldn5 down regulation ex vivo.

To test the importance of endothelial Dhh expression at the BBB, we conditionally disrupted Dhh expression in endothelial cells, and examined the consequences on BBB integrity.

We first verified the efficiency of the knockout by measuring Dhh expression in primary CNS MECs isolated from Dhh^{ECKO} and littermate controls and showed that Dhh expression is strongly down regulated in the knockout mice (Figure 2, A). Moreover we showed that Cdh5, Cldn5 and Zo1 junctions are disorganized in Dhh^{ECKO} endothelial cells: Cdh5 junctions are duplicated and blurry and Cldn5 and ZO1 junctions present a Z organisation (Figure 2, D-F). Cdh5 and Cldn5 but not Zo1 are down regulated in Dhh^{ECKO} CNS MECs compared to controls (Figure 2, B-C, G-I).

We concluded that endothelial Dhh expression is necessary to maintain endothelial adherens and tight junction expression at the BBB.

Dhh induces Cldn5 up regulation through the inhibition of FoxO1 transcriptional activity in vitro.

We previously identified Dhh as a factor facilitating the interaction between Cdh5 and Ctnn β 1 in endothelial cells⁸ and a paper published by Dejana's lab in 2008 showed that Cdh5 interacts with Ctnn β 1 to inhibit transcription factor FoxO1²⁶ via a PI(3)K-Akt dependent phosphorylation, which thereby upregulate the expression of the endothelial tight junction protein Cldn5²⁶. Therefore, we next measured the expression level of the phosphorylated form of FoxO1 (p-FoxO1) in CNS MECs from Dhh^{ECKO} and control mice and demonstrated that p-FoxO1 is down

regulated in Dhh^{ECKO} mice compared to controls (Figure 2, G, J-K). We then treated CNS MECs from Dhh^{ECKO} mice with a cell permeable inhibitor of the transcription factor FoxO1 (AS1842856) which blocks the transcription activity of FoxO1 and measured the expression level of *Cldn5*. We demonstrated that *Cldn5* expression, in Dhh^{ECKO} CNS MECs treated with the inhibitor of FoxO1, returns to its expression level in control CNS MECs, unlike the Dhh^{ECKO} CNS MECs treated with DMSO (Figure 2, L).

We concluded that endothelial autocrine *Dhh* expression at the BBB maintains the pool of *Cdh5-Ctnn β 1* signaling in endothelial cells which promotes *Cldn5* expression through the inhibitory phosphorylation of the transcription factor FoxO1 (Figure 3, M).

Endothelial-specific Dhh inactivation induces BBB permeability associated to endothelial and astrocytic activation in vivo.

In vivo, on spinal cord sections from control and Dhh^{ECKO} mice, we confirmed that the adherens junction *Cdh5* and tight junction *Cldn5* are down regulated under resting conditions (Figure 3, A-C) and demonstrated that it is associated to an increase accumulation of serum proteins (Fgb and Alb)²⁷ around the vessels suggesting BBB opening (Figure 3, A, D-E).

We then analyzed the activation status of both the BBB and Glia Limitans in Dhh^{ECKO} and control littermates. Using spinal cord sections, we revealed that *Icam1*, a marker of endothelial activation, is up regulated in Dhh^{ECKO} mice compared to littermate controls (Figure 3, F, H) and associated to the up regulation of *Gfap*, a marker of astrocyte activation (Figure 3, G, I).

Here, we highlighted that *Dhh* expression at the endothelium controls BBB tightness and demonstrated that endothelial-specific *Dhh* inactivation at the BBB drives endothelial and astrocyte activation.

BBB breakdown is sufficient to induce a secondary CNS protective barrier at the Glia Limitans

As we already demonstrated in Figure 3, Dhh^{ECKO} mice display BBB leakage whereas control littermates feature a tight BBB.

Although we demonstrated (Figure 3, A, D-G) BBB leakage in Dhh^{ECKO} mice, we noticed that infiltrating plasmatic proteins are concentrated around the vascular area and not seamlessly distributed within the parenchyma. To verify this observation, we quantified the distribution of Fgb in the 3 compartments (lumen, PVS and parenchyma). Specifically, in control mice, there is no significant endothelial permeability with more than 75% of Fgb contained in the lumen of blood vessels, 25% segregated in the PVS area limited by the astrocytic endfeet (*Gfap* antigen) on one side and the vessel wall (*Podxl* antigen) on the other side, and none found in the parenchyma (Figure 4, A-B). In Dhh^{ECKO} mice, vascular leakage is significant but what is striking is that 52 % of Fgb is contained into the PVS while none is found in the parenchyma, highlighting the presence of a secondary barrier at the Glia Limitans. (Figure 4, A-B).

We previously published that reactive astrocytes express tight junctions, notably *Cldn4*, under inflammatory conditions, in a mouse model of multiple sclerosis (EAE)²⁰. Here, we highlighted that this data is relevant to Human since *Cldn4* is also expressed at the Glia Limitans in active cortical lesions from multiple sclerosis patients (Figure 4, C). Based on the above results, we investigated if the PVS entrapment of plasmatic proteins observed in Dhh^{ECKO} mice is linked to the expression of the tight junction *Cldn4* at the Glia Limitans in response to BBB permeability (Figure 4, D-G). We showed that *Cldn4* is expressed at the Glia Limitans in Dhh^{ECKO} mice but not control littermates (Figure 4, D, E, G) using isolated gliovascular unit samples.

Altogether these results suggest that, in Dhh^{ECKO} mice, spontaneous BBB permeability leads to the establishment of a physical barrier at the Glia Limitans characterized by the expression of the tight junction *Cldn4*. Therefore, in Dhh^{ECKO} mice, astrocytic endfeet at the Glia Limitans, are « preconditioned » to form a secondary barrier protecting the parenchyma.

Endothelial signals can drive astrocyte barrier properties at the Glia Limitans

Given the above results, we wanted to determine if astrocyte barrier formation requires signals from the endothelial BBB or from the plasmatic protein perivascular infiltrate. To do so, we first study *in vitro* the response of human astrocytes (NHA) to HBMECs conditioned media *versus* plasmatic proteins from healthy donors. HBMEC used to produce the conditioned media were treated with either the osmotic agent Mannitol or the pro-permeability factor VegfA to induce BBB breakdown through various methods.

We demonstrated that Gfap (Figure 5, A, E-I) Aldh1l1 (Figure 5, B) (markers of astrocyte reactivity) and Cldn4 expression (Figure 5, D, A-H, J) are up regulated, in the NHA treated with HBMEC conditioned media but not in the NHA treated with plasma from healthy donors. Vim (marker of astrocyte reactivity) expression level was not modulated in any condition (Figure 5, C).

To confirm this observation *in vivo*, we delivered murine VegfA or murine plasmatic proteins into the left cerebral cortex of adult mice and evaluated the consequences on Cldn4 expression by astrocytes. PBS stereotactic administration was used as a control.

In vivo, Gfap (Figure 5, K-N) and Cldn4 (Figure 5, K-M, O) are induced in the mice cortex, after murine VegfA and murine plasmatic protein treatments, VegfA having a much stronger effect than plasmatic proteins.

We concluded that permeable endothelial monolayers produce signals that can drive astrocyte reactivity and tight junction expression. Plasmatic protein involvement in controlling astrocyte barrier behavior is however less clear as astrocyte reactivity and tight junction expression are up regulated *in vivo* but not *in vitro* when treated with plasma and further investigations will be necessary to identify the mechanisms involved.

Mice with endothelial Dhh inactivation display reduced disability in a model of multiple sclerosis during the onset of the disease.

To examine the impact of these findings on disease severity, we investigated the phenotype of induced-experimental multiple sclerosis (EAE) in Dhh^{ECKO} and control mice.

We observed that in control mice, neurologic deficit is observed from day 9, and increases in severity until day 18, when clinical score stabilizes at a mean of 3.2, representing hind limb paralysis. In contrast, the onset of clinical signs in Dhh^{ECKO} mice is first seen 4 days later, and the clinical course is much milder. In Dhh^{ECKO} mice, disease reached a plateau at day 21 at a mean of 2.3, indicating hind limb weakness and unsteady gait, a mild phenotype (Figure 6, A). The EAE peak score (Figure 6, B) and average score during the time of disability (Figure 6, C) are both decreased in Dhh^{ECKO} mice but there are no significant changes in survival and mortality rates (Figure 6, D). Importantly, the clinical course in the Dhh^{ECKO} is correlated to strikingly decreased areas of demyelination compared to the control cohort (Figure 6, E-F). Critically, these studies revealed that the clinical course and pathology of EAE are strongly reduced in Dhh^{ECKO} mice during the onset of the disease.

We concluded that endothelial Dhh knockdown-induced BBB opening is associated to a clinical protective effect in a model of multiple sclerosis.

Mice with endothelial Dhh inactivation display a reinforced barrier at the Glia Limitans restraining access to the parenchyma to inflammation in a model of multiple sclerosis.

Although Dhh^{ECKO} mice display equivalent Fgb densities (Figure 7, A) as well as numbers of inflammatory cells (Figure 7, B) in lesions, at 28 dpi, compared to that in control mice, neuropathology in both cohorts appeared very different. We showed that while the BBB is permeable in both groups with plasmatic protein extravasation associated to equivalent Cdh5 densities, astrocyte reactivity in EAE lesions in Dhh^{ECKO} mice is greatly increased with Gfap

immunoreactivity strongest at the Glia Limitans (Figure 7 C, D, E). Moreover, infiltrating plasmatic proteins and inflammatory cells in Dhh^{ECKO} mice show less CNS parenchymal dispersion (Figure 7, E-G), with 69.0 % of Fgb trapped into the Glia Limitans in the Dhh^{ECKO} cohort versus 29.8 % in the control cohort (Figure 7, E-G) and 77.1 % of Cd45+ T cells trapped into the Glia Limitans in the Dhh^{ECKO} cohort versus 25.1 % in the control cohort (Figure 7, H-J). Altogether, these data suggest less access through the Glia Limitans in the Dhh^{ECKO} mice compared to the littermate control mice. Finally we demonstrated that Cldn4 expression in spinal cord EAE lesion lysates is up regulated in Dhh^{ECKO} mice compared to control mice (Figure 7, K-L).

Collectively, data from Figure 4 to 7 reveal that conditional loss of a key structural component of endothelial integrity at the BBB in Dhh^{ECKO} mice leads to increased astrocyte reactivity and implementation of barrier properties at the Glia Limitans, allowing for less diffusion of plasmatic proteins and immune cells into the CNS parenchyma than in control mice. Therefore, in Dhh^{ECKO} mice, astrocytic endfeet at the Glia Limitans are « preconditioned » to form a barrier which explains their ability during neuropathology, to protect the parenchyma more efficiently than in the controls, leading to the protective effect observed clinically. Thus we identify BBB leakage, induced by the down regulation of Dhh endothelial expression, as an important mechanism controlling Glia Limitans reactivity and barrier properties and subsequently tissue damage and clinical deficit in a model of human disease.

Discussion

Presently, it is accepted that the BBB is the sole line of defense of the CNS, restricting access to the parenchyma to inflammatory infiltration notably in the context of chronic neuro-inflammation. However, in our study, we brought a different perspective on CNS barrier organization, unveiling the existence of two independent, dissociable states of the astrocyte and endothelial barriers in the gliovascular unit. Indeed we confirmed that, just like the BBB, the Glia Limitans can form a protective barrier. For the first time, we demonstrated for the first time that BBB breakdown is sufficient to induce chronic barrier properties at the Glia Limitans and we highlighted a crosstalk from endothelial cells to astrocytes which restrict access to the parenchyma to plasmatic proteins and inflammatory cells during multiple sclerosis. Indeed we demonstrated that in the Dhh^{ECKO} mice which display an open BBB, there is astrocytic Cldn4 expression under resting condition, before EAE induction; therefore, with neuro-inflammation, Glia Limitans in Dhh^{ECKO} mice responds faster and more efficiently in term of barrier properties which explain that the EAE symptoms are less severe in the Dhh^{ECKO} mice compared to control littermates.

The critical role of the Hh signaling in CNS neuro-inflammation has first been highlighted in 2011 by Prat's laboratory; this study revealed that during multiple sclerosis development, the morphogen Shh is expressed by reactive astrocytes and participates to the maintenance of BBB integrity⁴. Following this discovery, our group published in 2018 that Dhh is physiologically expressed at the BBB in adults⁸, result supported by the Betsholtz's group study of brain mouse single cell RNA sequencing²⁵. Here we demonstrated for the first time that Dhh is down regulated at the BBB during multiple sclerosis and that Dhh knockdown is sufficient to induce BBB permeability by inhibiting Cdh5 and Cldn5 expression through the modulation of FoxO1 activity, strengthening the idea that the Hh signaling is essential to control BBB integrity both physiologically and in multiple sclerosis condition. Based on our results and the literature, we may hypothesized that Dhh is necessary to maintain BBB tightness under physiological conditions and that Dhh down regulation under inflammatory conditions might be offset by astrocytic Shh secretion to maintain BBB homeostasis during disease progression.

Over the past years, the literature started to acknowledge the fact that BBB is not the sole line of defense of the CNS and that the glia that abut the vasculature might play a role in restricting access to the parenchyma. Indeed, Sofroniew's lab first described that in spinal cord injury, astrocyte

scar borders have structural similarities to the Glia Limitans borders and that functionally, astrocyte scar borders corral inflammatory cells within areas of damaged tissue^{28,29}. Moreover, in 2017, we published that, during EAE multiple sclerosis development, reactive astrocytes, at the Glia Limitans, form tight junctions of their own, notably Cldn4²⁰, a junction protein also expressed in tightly sealed epithelia^{30,31}. Noteworthy is the fact that down regulation or reorganization of Cldns and other tight junctions has been implicated in permeability in various tissues, notably the gut³²⁻³⁴; however, reports of dynamic tight junction protein induction resulting in functional barrier formation have been rare^{35,36}. Here, we highlighted for the first time that disruption of endothelial junctions is sufficient to induce Cldn4 expression at the Glia Limitans and subsequently plasmatic protein entrapment in the PVS, identifying an astrocyte inducible barrier dependent on signals transmitted by the open BBB.

It has already been described, by our group and others, that astrocytes can send signals, notably VegfA¹⁸, Timp¹⁷ and Shh⁴, to the BBB to modulate its state (tight *versus* permeable). In this study, we acknowledge the existence of a dialogue going the opposite way, by showing that BBB endothelial junction disruption leads to Cldn4 expression at the Glia Limitans. Interestingly, endothelial cell capacity to send signals to neighboring cells has been previously identified notably in the context of pericyte (mural cells associated to arterioles, capillaries and venules) recruitment at the vascular wall³⁷. Specifically, it has been shown that Pdgfr is secreted from angiogenic sprout endothelium where it serves as an attractant for co-migrating pericytes, which in turn express Pdgfr β ³⁸. Based on these arguments and our results, it appears strongly consistent that endothelial signals can be sent to astrocytes. Identifying such signals will be the aim of future studies by our group.

We then showed that in animals which exhibit an open BBB (Dhh^{ECKO} mice), astrocytic endfeet at the Glia Limitans form a barrier more efficiently than in the littermate controls, leading to the protective effect observed clinically in the model of multiple sclerosis. This is somehow reminiscent of what is observed in brain ischemic preconditioning where a mild non-lethal ischemic episode (preconditioning) can produce resistance to a subsequent more severe ischemic insult^{39,40}. Here, inducing BBB opening and PVS plasmatic protein accumulation produce resistance to the subsequent massive inflammatory infiltration induced by multiple sclerosis development. This may explain why multiple sclerosis relapse/lesion formation rarely occurs at the same location in the CNS. Interestingly, among neurons and non-neuronal cells, astrocytes are considered increasingly important in regulating cerebral ischemic tolerance⁴¹ and a parallel can be easily drawn between these results and ours showing a major role for “preconditioned” astrocytes in the control of “chronic neuro-inflammation tolerance” and protection against further relapse.

In light of the above observations, we may assume that the CNS has the ability to protect itself against isolated BBB leakage episodes through a secondary barrier at the Glia Limitans that takes over once the BBB is open. Moreover, it suggests that manipulation of the BBB and Glia Limitans in combination may have greater potential than either alone to control CNS entry of leukocytes and pro-inflammatory soluble factors, in conditions such as multiple sclerosis and perhaps more widely. Indeed, taking into account both components of the gliovascular unit is of translational interest notably to limit CNS parenchymal access to pathogenic agents by strengthening the Glia Limitans once the BBB is open, in cardiovascular diseases such as brain ischemic strokes⁴², neuro-infections⁴³ and neuro-degeneration (Parkinson’s/Alzheimer’s diseases, vascular dementia)⁴⁴ or to facilitate parenchymal access to drugs, by opening the BBB and Glia Limitans together, in CNS tumor treatment⁴⁵. Along similar lines, it is unknown how the barrier properties of the Glia Limitans may impact the pharmacokinetics of drugs that must enter the CNS parenchyma in conditions such as multiple sclerosis, which may account for treatment failure.

In summary, our study first demonstrates the critical role of Dhh in maintaining BBB integrity. We prove that Dhh is down regulated during multiple sclerosis and that Dhh knockdown leads to BBB opening. Using Dhh knockdown as a tool to cause BBB opening, we then show that BBB permeability

is sufficient to induce a secondary barrier at the Glia Limitans characterized by the expression of the tight junction *Cldn4* and astrocyte reactivity. Thus highlights a double barrier system within the CNS relying on a crosstalk going from the endothelial BBB to the astrocytic Glia Limitans. Finally our study provides evidence to a novel concept of “chronic neuro-inflammation tolerance”, as stimulation of Glia Limitans barrier properties by BBB opening, upstream of multiple sclerosis development, leads to a protective effect against disease progression.

Methods

Human tissues: cortical sections from multiple sclerosis patients (active lesions) and healthy controls (frontal cortex) were obtained from the Neuro-CEB bio bank (<https://www.neuroceb.org/fr>). The sections were 30 μm thick and obtained from fresh frozen samples.

Mice: Dhh Floxed (Dhh^{FloX}) mice 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 and described before⁸. 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 $\text{Cdh5-Cre}^{\text{ERT2}}$ mice was activated by intraperitoneal injection of 1 mg tamoxifen (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) for 5 consecutive days at 8 weeks of age. Mice were phenotyped 2 weeks later. Successful and specific activation of the Cre recombinase has been verified before⁸. C57BL/6 mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, USA).

Isolation of neurovascular units from mouse CNS: Mouse was sacrificed by cervical dislocation and its head cut and rinsed with 70 % ethanol. Brain and spinal cord were then harvested and cerebellum, olfactory bulb and white matter removed from the brain with sterile forceps. Additionally, meninges were eliminated by rolling a sterile cotton swab at the surface of the cortex. The cortex and spinal cord were then transferred in a potter containing 2 mL of buffer A (HBSS 1X w/o phenol red (Gibco, Waltham, MA, USA), 10 mM HEPES (Gibco, Waltham, MA, USA) and 0,1 % BSA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and the CNS tissue was pounded to obtain an homogenate which was collected in a 15 mL tube. The potter was rinsed with 1 mL of buffer A which was added to the 2 mL homogenate. Cold 30 % dextran solution was then added to the tube (V:V) to obtain a 15 % dextran working solution centrifuged for 25 minutes at 3000 g, 4 °C without brakes. After centrifugation, the pellet (neurovascular components and red cells) was collected and the supernatant (dextran solution and neural components) was centrifuged again to get the residual vessels. Neurovascular components were then pooled and re-suspended in 4 mL of buffer B (HBSS 1X Ca^{2+} / Mg^{2+} free with phenol red (Gibco, Waltham, MA, USA), 10 mM HEPES (Gibco, Waltham, MA, USA) and 0,1 % BSA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)).

Isolation of neurovascular units for RT-PCR, western blots or immunohistochemistry: after centrifugation of the cell suspension, the pellet was washed 3 times with the buffer B and filtered through a 100 μm nylon mesh (Millipore Corporation, Burlington, MA, USA). The nylon mesh was washed with 7 mL of buffer B to collect the retained neurovascular units. The suspension was then centrifuged for 10 minutes at 1000 g and the pellet suspended in 300 μL of RIPA lysis buffer for western blot analysis or 1000 μL of Tri-Reagent (MRC, Cincinnati, OH, USA) for RTqPCR analysis. For immunohistochemistry, the pellet was suspended in 3 mL of a solution of matrigel (Corning, Steubenville, NY, USA)-DMEM 1 g/L glucose, Mg^{+} , Ca^{2+} (Gibco, Waltham, MA, USA) 1:80, distributed on a labtek (Starstedt, Nümbrecht, Germany) (one mouse brain is needed to seed 1 labtek) and incubated for 30

minutes at 37 °C. Finally the neurovascular units embedded in the matrigel (Corning, Steuben, NY, USA) solution were fixed with 10 % formalin for 10 minutes.

Primary culture of mouse CNS micro vascular endothelial cells (CNS MECs): after centrifugation of the cell suspension, the pellet was washed 3 times with the buffer B and transferred in an enzyme solution (2 mg/mL Collagenase/Dispase (Roche, Bale, Switzerland), 0,147 µg/mL TLCK (Lonza, Bäle, Switzerland) and 10 µg/mL DNase 1 (Roche, Bäle, Switzerland)), pre-warmed at 37 °C, before being placed on a shaking table at maximum speed agitation at 37 °C. After 30 minutes, the digestion was stopped by adding 10 mL of buffer B, the cell suspension centrifuged and the digested neurovascular pellet washed 3 times with 3 mL of buffer B. After the 3 washing steps, the digested neurovascular pellet was re-suspended in 1 mL of Mouse Brain Endothelial Cell Culture Medium (DMEM 1 g/L glucose, Mg⁺, Ca²⁺ (Gibco, Waltham, MA, USA), FBS 20 % (Gibco, Waltham, MA, USA), sodium pyruvate 2 % (Gibco, Waltham, MA, USA), non-essential amino acids 2 % (Lonza, Bäle, Switzerland), FGF 1 ng/mL (PeproTech, Rocky hill, NJ, USA) and gentamycin 10 mg/mL (Gibco, Waltham, MA, USA)) and plated on a labtek (Starstedt, Nümbrecht, Germany) (1 mouse brain is needed to seed 1 labtek) previously coated with 2 % matrigel (Corning, Steuben, NY, USA) diluted in DMEM 1 g/L glucose, Mg⁺, Ca²⁺ (Gibco, Waltham, MA, USA). **Cell culture:** Human Brain Microvascular Endothelial Cells (HBMECs) (Alphabio Regen-CliniSciences, Nanterre, France) were cultured in endothelial basal medium-2 (EBM-2) supplemented with EGM™-2 BulletKits™ (Lonza, Bäle, Switzerland). Cell from passage 3 to passage 6 were used. Before any treatment, cells were serum starved in 0.5 % fetal bovine serum EGM-2 medium for 24 hours. Normal Human Astrocytes (NHA) (Lonza, Bäle, Switzerland) were cultured in astrocyte basal medium (ABM) supplemented with AGM™ BulletKits™ (Lonza, Bäle, Switzerland). Cell from passage 2 to passage 4 were used. Before any treatment, cells were serum starved in DMEM 1 g/L glucose, Mg⁺, Ca²⁺ (Gibco, Waltham, MA, USA) without serum for 24 hours.

Cytokines/Growth Factors/Chemicals: Human IL-1β was purchased from PeproTech (Rocky Hills, NJ, USA) and Human and mouse Vegf-165 (VegfA) were purchased from CliniSciences (Nanterre, France). Based on previous studies, Human IL-1β and Human Vegf-165 were routinely used at 10 ng/mL^{19,21}. Mouse Vegf-165 was used at a concentration of 20 ng/µL. The inhibitor of FoxO1 total (AS1842856) was purchased from Merck (Kenilworth, NJ, USA) and was used at 100 nM²². D-Mannitol was purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MI, USA) and was used at 100 mM²³.

Antibodies: Anti-Cldn4 (mouse), anti-Cldn5 (mouse (tissues) and rabbit (cell culture)), anti-human Zo1 (rabbit) and anti-Gfap (rat) were from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Anti-Cdh5 (goat) and anti-Podxl (goat) were from R&D systems (Minneapolis, MN, USA). Anti-human Cdh5 (mouse) and anti-human Dhh (H-85) (rabbit) were from Santa Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA). Anti-Fgb (rabbit) and anti-human Pecam1 (mouse) were from Dako (Carpinteria, CA, USA). Anti-Alb (sheep) and anti-Mbp (rat) were from Abcam (Cambridge, MA, USA). Anti-Cd4, Cd11b, and Cd45 (rat) were from eBioscience (San Diego, CA, USA). Anti-NeuN (rabbit) was from Millipore (Billerica, MA, USA). Anti-Lam (rabbit) was from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Anti-Zo1 (rabbit) was from Life Technologies (Grand Island, NY, USA). Anti-FoxO1 (rabbit) anti-p-FoxO1 (rabbit) and anti-β-actin (rabbit) were from cell signaling (Danvers, MA, USA).

Quantitative RT-PCR: RNA was isolated using Tri Reagent® (Molecular Research Center Inc) as instructed by the manufacturer, from 3x10⁵ cells or from isolated mouse CNS neurovascular units. For quantitative RT-PCR analyses, total RNA was reverse transcribed with M-MLV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA) and amplification was performed on a DNA Engine Opticon®2 (MJ Research Inc, St Bruno, Canada) using B-R SYBER® Green SuperMix (Quanta Biosciences, Beverly, MA, USA). Primer sequences are reported in Supplementary table 1.

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

Western Blots: Protein expression was evaluated by SDS-PAGE. Protein loading quantity was controlled using the rabbit monoclonal anti- β -actin antibody (cell signaling, Danvers, MA, USA). Secondary antibodies were from Invitrogen. The signal was then revealed by using an Odyssey Infrared imager (LI-COR, Lincoln, NE, USA). For quantification, the mean pixel density of each band was measured using Image J software (NIH, Bethesda, MD, USA) and data were standardized to β -actin, and fold change versus control calculated.

Stereotactic injection: 10 weeks old C57BL/6 mice (4 mice per condition) were anesthetized and secured into a stereotactic frame (Stoelting Co., IL, USA). 3 μ l of murine VegfA (20 ng/ μ L), 3 μ L of healthy mouse plasma or 3 μ L of vehicle control (PBS) were delivered at 0.1 μ l/s into the frontal cortex at coordinates of 1 μ m posterior to bregma, 2 μ m left of the midline and 1.5 μ m below the surface of the cortex. Mice were sacrificed by pentobarbital (Richter Pharma, Wels, Austria) overdose at 24h post injection (dpi). For histological assessment, the brain of each animal was harvested.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): 10 week old female mice were immunized by subcutaneous injection of 300 μ g myelin oligodendrocyte glycoprotein-35-55 (MOG₃₅₋₅₅) (Hooke laboratories, Lawrence, MA, USA) in 200 μ l Freund's Adjuvant containing 300 μ g/mL mycobacterium tuberculosis H37Ra (Hooke laboratories, Lawrence, MA, USA) in the dorsum. Mice were administered with 500 ng pertussis toxin (PTX) intra-peritoneously on day of sensitization and 1 day later (Hooke laboratories). The emulsion provides antigen which initiates expansion and differentiation of MOG-specific autoimmune T cells. PTX enhances EAE development by providing additional adjuvant. EAE will develop in mice 7-14 days after immunization (Day 0): animals which develop EAE will become paralyzed. Disease was scored (0, no symptoms; 1, floppy tail; 2, hind limb weakness (paraparesis); 3, hind limb paralysis (paraplegia); 4, fore- and hind limb paralysis; 5, death)²⁴ from day 7 post immunization until day 32 post immunization. At Day 32, all the animals were euthanized by pentobarbital (Richter Pharma, Wels, Austria) overdose. For histological assessment, cervical, lumbar and dorsal sections of each animal spinal cord, as well as the spleen, were harvested.

Immunohistochemistry: prior to staining, brain and spinal cord samples were either fixed in 10 % formalin for 3 hours, incubated in 30 % sucrose overnight, OCT embedded and cut into 9 μ m thick sections or directly OCT embedded and cut into 9 μ m thick sections. Cultured cells were fixed with 10 % formalin for 10 minutes. Human frozen sections were used directly without any prior treatment. Concerning the fixed sections, for Cldn4, prior to blocking, sections were soaked in Citrate (pH 7.5; 100 °C). For Cldn5, prior to blocking, sections were soaked in EDTA (pH 6.0; 100 °C). For Cd4, Cd11b, and Cd45, sections were treated with 0.5 mg/mL protease XIV (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) at 37 °C for 5 minutes. Primary antibodies were used at 1:100 except Cldn4 (1:50), Fgb (1:1,000), and Alb (1:1,000). Samples were examined using a Zeiss Microsystems confocal microscope (Oberkochen, Germany), and stacks were collected with z of 1 μ m.

For immunofluorescence analyzes, primary antibodies were resolved with Alexa Fluor®-conjugated secondary polyclonal antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and nuclei were counterstained with DAPI (1:5000) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For all immunofluorescence analyzes, negative controls using secondary antibodies only were done to check for antibody specificity.

Morphometric analysis: Morphometric analyses were carried out using NIH ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

BBB permeability was evaluated by measuring tight junction integrity and plasmatic protein extravasation. Brain and spinal cord sections were immunostained for the expression of Cldn5/Cdh5

and Fgb/IgG/Alb respectively. For each brain or spinal cord section, Cldn5+, Cdh5+, Fgb+, IgG+ and Alb+ areas were quantified in 20 pictures taken at the margins of the lesion area under 40x magnification. One section was quantified per spinal cord (3 different zones are displayed on the same section: one cervical, one lumbar and one dorsal to get a global vision of the lesion) (per mouse).

Leukocyte, lymphocyte and macrophage densities were evaluated in sections stained for the expression of Cd45, Cd4 and Cd11b respectively. For each brain or spinal cord section, Cd45+ leukocytes, Cd4+ lymphocytes and CD11b+ macrophages were counted in 20 pictures randomly taken under 40x magnification. One section was quantified per spinal cord (3 different zones are displayed on the same section: one cervical, one lumbar and one dorsal to get a global vision of the inflammatory lesion) (per mouse).

Demyelination was evaluated in spinal cord sections stained for the expression of Mbp. For each spinal cord section, Mbp+ area was quantified in 10 pictures taken in and around inflammatory lesion sites under 20X magnification. One section was quantified per spinal cord (3 different zones are displayed on the same section: one cervical, one lumbar and one dorsal to get a global vision of the lesion) (per mouse).

Plasmatic protein and leukocyte infiltrate distribution at the gliovascular unit were evaluated in spinal cord sections triple-stained for Cdh5 or Podxl (markers of the BBB), Fgb, IgG (plasmatic proteins) or Cd45 (leukocyte infiltrate) and Gfap (marker of astrocyte reactivity). For each spinal cord section, the distribution (between the lumen, the PVS and the parenchyma) of the Fgb/IgG or the leukocyte infiltrate was quantified for 2 gliovascular units in 5 pictures randomly taken under 40x magnifications. One section was quantified per spinal cord (3 different zones are displayed on the same section: one cervical, one lumbar and one dorsal to get a global vision of the lesion) (per mouse).

Statistical analyses: Results are reported as mean \pm SEM. Comparisons between groups were analyzed for significance with the non-parametric Mann-Whitney test, the non parametric Kruskal Wallis test followed by the Dunn's multiple comparison test when we have more than 2 groups or a nonlinear regression test (Boltzmann sigmoidal) for the EAE scoring analysis using GraphPad Prism v8.0.2 (GraphPad Inc, San Diego, CA, USA). Differences between groups were considered significant when $p \leq 0.05$ (*: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$).

Author contributions

P.-L. H. and S. G. conducted experiments, acquired data, analyzed data P.M., A. D. and L.C. conducted experiments, acquired data. A.-P. G., T. C. and M.-A. R. critically revised the manuscript. C.C. designed research studies, conducted experiments, acquired data, analyzed data, provided reagents, and wrote the manuscript

Acknowledgments

We thank Annabel Reynaud, Sylvain Grolleau, and Maxime David for their technical help. We thank Christelle Boullé for administrative assistance.

This study was supported by grants from the European Council (Marie Skłodowska-Curie Actions, Individual fellowship 2019 (MSCA-IF-2019)) and the Fondation ARSEP (Fondation pour la Recherche

sur la Sclérose En Plaques). This study was also co-funded by the “Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale” and by the University of Bordeaux.

Bibliography

1. McConnell, H. L., Kersch, C. N., Woltjer, R. L. & Neuwelt, E. A. The Translational Significance of the Neurovascular Unit. *J. Biol. Chem.* **292**, 762–770 (2017).
2. Bartholomäus, I. *et al.* Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* **462**, 94–98 (2009).
3. Brück, W. *et al.* Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Ann. Neurol.* **42**, 783–793 (1997).
4. Alvarez, J. I. *et al.* The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* **334**, 1727–1731 (2011).
5. Singh, V. B., Singh, M. V., Gorantla, S., Poluektova, L. Y. & Maggirwar, S. B. Smoothed Agonist Reduces Human Immunodeficiency Virus Type-1-Induced Blood-Brain Barrier Breakdown in Humanized Mice. *Sci. Rep.* **6**, 26876 (2016).
6. Xia, Y. *et al.* Recombinant human sonic hedgehog protein regulates the expression of ZO-1 and occludin by activating angiopoietin-1 in stroke damage. *PLoS One* **8**, e68891 (2013).
7. Chapouly, C., Guimbal, S., Hollier, P.-L. & Renault, M.-A. Role of Hedgehog Signaling in Vasculature Development, Differentiation, and Maintenance. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
8. Caradu, C. *et al.* Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults. *Circ. Res.* **123**, 1053–1065 (2018).
9. Bitgood, M. J. & McMahon, A. P. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* **172**, 126–138 (1995).
10. Robbins, D. J., Fei, D. L. & Riobo, N. A. The Hedgehog signal transduction network. *Sci. Signal.* **5**, re6 (2012).
11. Iadecola, C. The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron* **96**, 17–42 (2017).
12. Sweeney, M. D., Ayyadurai, S. & Zlokovic, B. V. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat. Neurosci.* **19**, 771–783 (2016).
13. Cheslow, L. & Alvarez, J. I. Glial-endothelial crosstalk regulates blood-brain barrier function. *Curr. Opin. Pharmacol.* **26**, 39–46 (2016).
14. Engelhardt, B. & Coisne, C. Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle. *Fluids Barriers CNS* **8**, 4 (2011).
15. Engelhardt, B. & Ransohoff, R. M. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.* **33**, 579–589 (2012).
16. Colombo, E. & Farina, C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends Immunol.* **37**, 608–620 (2016).
17. Chapouly, C. *et al.* Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. *Brain J. Neurol.* **138**, 1548–1567 (2015).
18. Argaw, A. T. *et al.* Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* **122**, 2454–2468 (2012).
19. Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zhang, Y., Zameer, A. & John, G. R. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1977–1982 (2009).

20. Horng, S. *et al.* Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J. Clin. Invest.* **127**, 3136–3151 (2017).
21. Liu, J., Zhao, M. L., Brosnan, C. F. & Lee, S. C. Expression of type II nitric oxide synthase in primary human astrocytes and microglia: role of IL-1beta and IL-1 receptor antagonist. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **157**, 3569–3576 (1996).
22. Karki, S. *et al.* Forkhead box O-1 modulation improves endothelial insulin resistance in human obesity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1498–1506 (2015).
23. Hess, D. C. *et al.* Hypertonic mannitol loading of NF-kappaB transcription factor decoys in human brain microvascular endothelial cells blocks upregulation of ICAM-1. *Stroke* **31**, 1179–1186 (2000).
24. Gurfein, B. T. *et al.* IL-11 regulates autoimmune demyelination. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 4229–4240 (2009).
25. He, L. *et al.* Single-cell RNA sequencing of mouse brain and lung vascular and vessel-associated cell types. *Sci. Data* **5**, 180160 (2018).
26. Taddei, A. *et al.* Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. *Nat. Cell Biol.* **10**, 923–934 (2008).
27. Davalos, D. & Akassoglou, K. Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease. *Semin. Immunopathol.* **34**, 43–62 (2012).
28. Wanner, I. B. *et al.* Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **33**, 12870–12886 (2013).
29. Sofroniew, M. V. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nat. Rev. Neurosci.* **16**, 249–263 (2015).
30. Hewitt, K. J., Agarwal, R. & Morin, P. J. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer* **6**, 186 (2006).
31. Acharya, P. *et al.* Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **287**, F305-318 (2004).
32. Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zhang, Y., Zameer, A. & John, G. R. VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 1977–1982 (2009).
33. Bruewer, M. *et al.* Proinflammatory Cytokines Disrupt Epithelial Barrier Function by Apoptosis-Independent Mechanisms. *J. Immunol.* **171**, 6164–6172 (2003).
34. Kebir, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* **13**, 1173–1175 (2007).
35. Kinugasa, T., Sakaguchi, T., Gu, X. & Reinecker, H. Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators. *Gastroenterology* **118**, 1001–1011 (2000).
36. Fujita, H. *et al.* Claudin-1 expression in airway smooth muscle exacerbates airway remodeling in asthmatic subjects. *J. Allergy Clin. Immunol.* **127**, 1612-1621.e8 (2011).
37. Gaengel Konstantin, Genové Guillem, Armulik Annika & Betsholtz Christer. Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 630–638 (2009).
38. Lindahl, P., Johansson, B. R., Levéen, P. & Betsholtz, C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**, 242–245 (1997).
39. Yunoki, M. *et al.* Ischemic Tolerance of the Brain and Spinal Cord: A Review. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **57**, 590–600 (2017).

40. Kirino, T., Tsujita, Y. & Tamura, A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* **11**, 299–307 (1991).
41. Koizumi, S., Hirayama, Y. & Morizawa, Y. M. New roles of reactive astrocytes in the brain; an organizer of cerebral ischemia. *Neurochem. Int.* **119**, 107–114 (2018).
42. Cai, W. *et al.* Dysfunction of the neurovascular unit in ischemic stroke and neurodegenerative diseases: An aging effect. *Ageing Res. Rev.* **34**, 77–87 (2017).
43. Hou, J., Baker, L. A., Zhou, L. & Klein, R. S. Viral interactions with the blood-brain barrier: old dog, new tricks. *Tissue Barriers* **4**, e1142492 (2016).
44. Zlokovic, B. V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**, 178–201 (2008).
45. Chacko, A.-M. *et al.* Targeted delivery of antibody-based therapeutic and imaging agents to CNS tumors: crossing the blood-brain barrier divide. *Expert Opin. Drug Deliv.* **10**, 907–926 (2013).

Figures

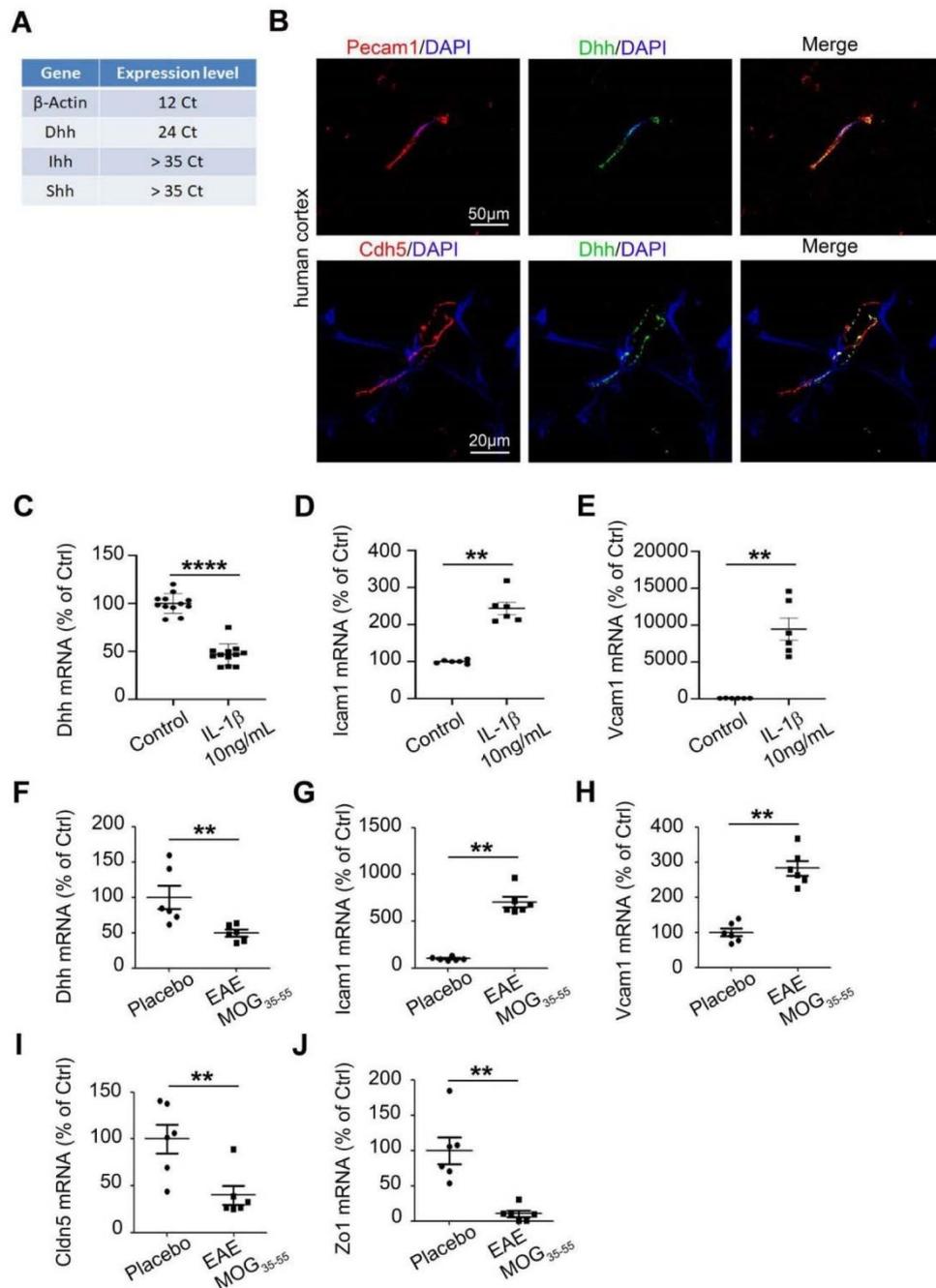


Figure 1: Desert Hedgehog is expressed by CNS microvascular endothelial cells and downregulated during chronic neuro-inflammation: (A) Primary Brain Microvascular Endothelial Cells (BMECs) were isolated from 12 weeks old C57Bl/6 mice and Dhh, Ihh and Shh expression were quantified by RT-qPCR (cycle threshold mean values). β -Actin is used as a reference. (B) Human

cortical sections from healthy donors were obtained from the NeuroCEB biobank and immunostained with anti-Cdh5 (in red), anti-Pecam1 (in red) and anti-Dhh (in green) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). **(C-E)** HBMECs were cultured until confluency and starved for 24h. HBMECs were then treated with PBS (control condition) or IL1 β 10 ng/mL for 24h and **(C)** Dhh, **(D)** Icam1 and **(E)** Vcam1 expression were quantified by RT-qPCR. **(F-H)** 12 weeks old C57Bl/6 females (6 animals per group) were induced with MOG₃₅₋₅₅ EAE versus Placebo. At day 16 post induction, mice were sacrificed and Spinal Cord Microvascular Endothelial Cells were isolated. **(F)** Dhh, **(G)** Icam1, **(H)** Vcam1 **(I)** Cldn5 and **(J)** Zo1 expression were measured via RT- qPCR in both groups (MOG₃₅₋₅₅ versus placebo).

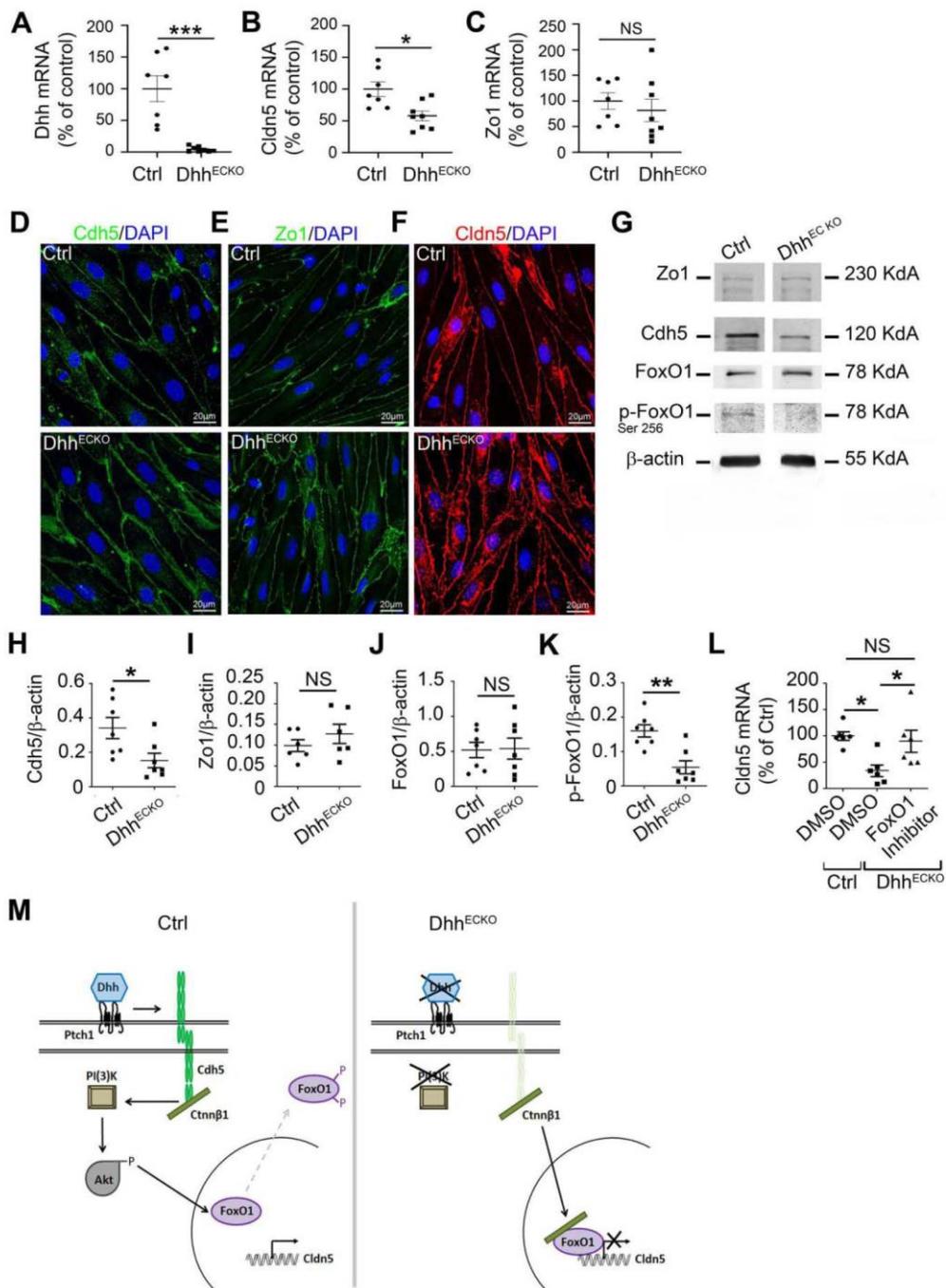


Figure 2: Endothelial-specific Dhh inactivation induces adherens and tight junction downregulation through stimulation of FoxO1 transcriptional activity: (A-C) CNS MECs were isolated from Dhh^{ECKO} and control mice and (A) Dhh, (B) Cldn5 and (C) Zo1 expression were quantified by RT-qPCR. (D-F) primary BMECs from Dhh^{ECKO} and control mice were isolated and

19

cultured on Lab-Tek®. **(D)** Cdh5 (in green), **(E)** Zo1 (in green) and **(F)** Cldn5 (in red) localizations were evaluated by immunofluorescent staining of a confluent cell monolayer. Nuclei were stained with DAPI (in blue). The experiment was repeated 3×. **(G-L)** CNS MECs were isolated from Dhh^{ECKO} and control mice and **(G, H)** Cdh5, **(G, I)** Zo1, **(G, J)** FoxO1, **(G, K)** and p-FoxO1 expression were quantified by western blot. **(L)** BMECs were isolated from Dhh^{ECKO} mice and control mice, cultured until confluency and starved for 24h. Control BMECs were then treated with DMSO and Dhh^{ECKO} BMECs with DMSO versus an inhibitor of FoxO1 (AS1842856). **(L)** Cldn5 expression was then quantified by RT-qPCR. **(M)** Summary outline of the up regulation of endothelial junctions by the morphogen Dhh through the inhibition of FoxO1 transcriptional activity.

* $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ Mann-Whitney U test. * $P \leq 0.05$ Kruskal Wallis test

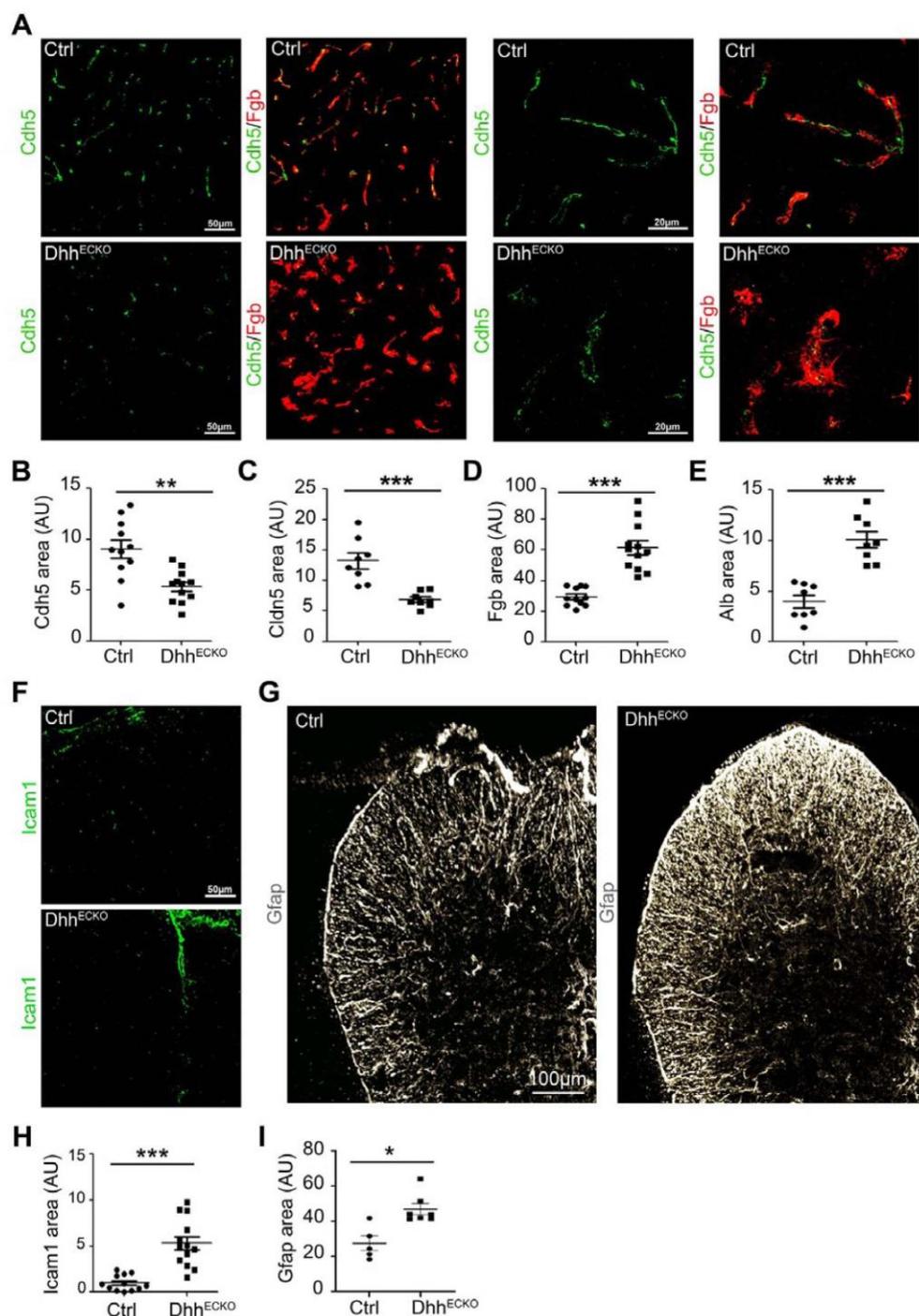


Figure 3: Endothelial-specific Dhh inactivation induces BBB permeability associated to endothelial and astrocytic activation *in vivo*: (A-E) Spinal cord sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and immunostained with anti-Cdh5, anti-Cldn5, anti-Fgb and anti-Alb antibodies. (A) Representative Cdh5 and Fgb staining were shown. (B) Cdh5 (C) Cldn5 (D) Fgb

21

and **(E)** Alb positive areas were quantified (Dhh^{ECKO} $n = 11$, WT $n = 11$). **(F-I)** Spinal cord sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and immunostained with anti-Icam1 (in green) and anti-Gfap (in grey) antibodies. **(F-G)** representative Icam1 and Gfap staining were shown. **(H)** Icam1 and **(I)** Gfap positive areas were quantified. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$ Mann-Whitney U test.

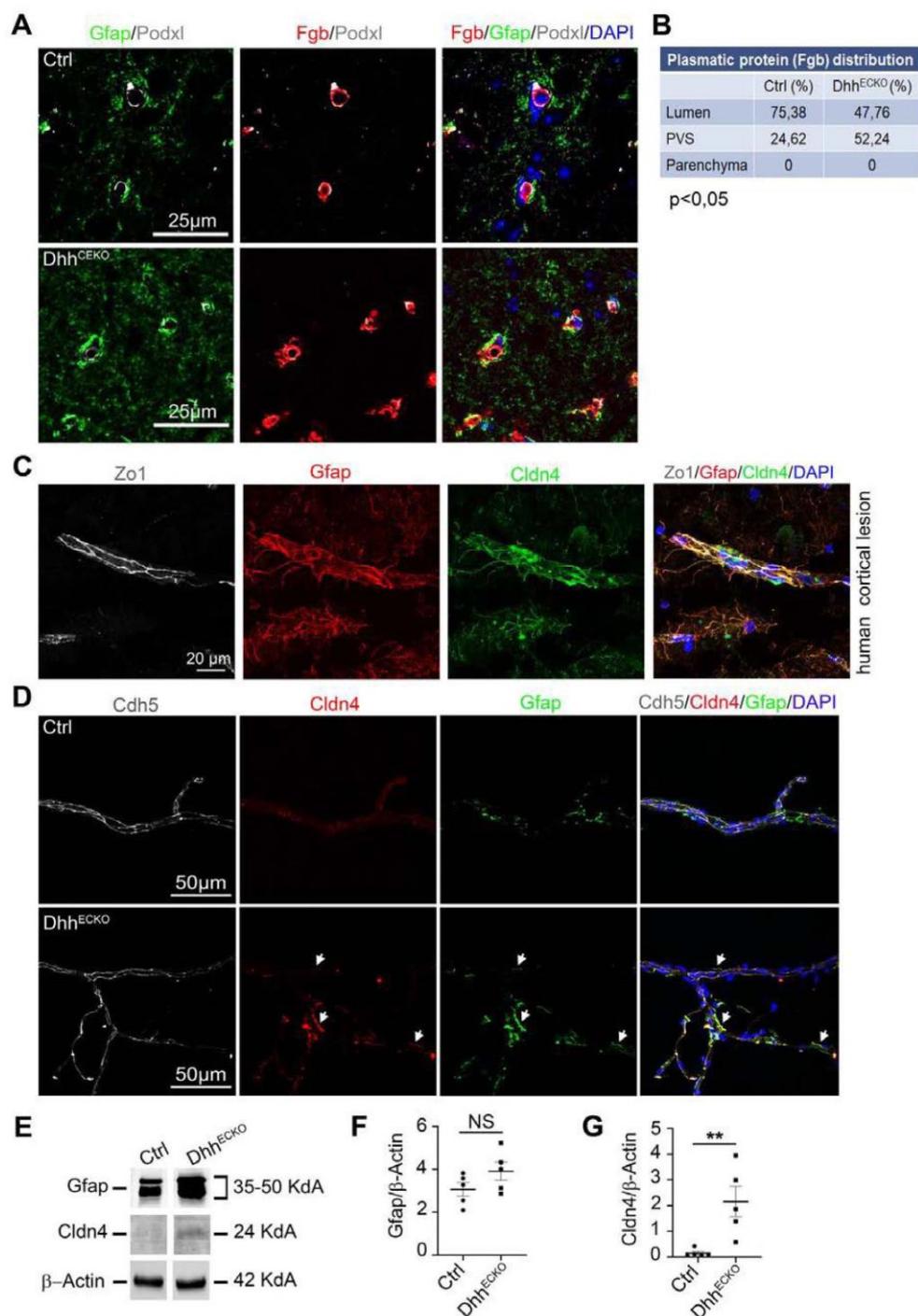


Figure 4: BBB breakdown is sufficient to induce a secondary CNS protective barrier at the Glia Limitans. (A-B) Spinal cord sections were harvested from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls and (A) immunostained with anti-podxl (in grey), anti-gfap (in green) and anti-Fgb (in red) antibodies (nuclei were stained with DAPI (in blue)) and (B) the distribution of Fgb within the lumen, PVS and

parenchyma, was quantified. We quantified the amount of Fgb in the PVS and parenchyma and inferred from it the amount of Fgb contained in the lumen. **(C)** Human active multiple sclerosis cortical lesions were obtained from the NeuroCEB biobank and immunostained with anti-Zo1 (in grey), anti-Gfap (in red) and anti-Cldn4 (in green) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (in blue). **(D-G)** Neurovascular units were isolated from Dhh^{ECKO} and control mouse CNS and **(D)** immunostained with anti-Cdh5 (in grey), anti-Cldn4 (in red) and anti-Gfap (in green) antibodies (nuclei were stained with DAPI (in blue)). **(E-G)** Gfap and Cldn4 expression level were quantified by western blot on Dhh^{ECKO} and control mouse neurovascular unit lysates. (Dhh^{ECKO} $n = 5$, WT $n = 5$). * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, Mann-Whitney U test.

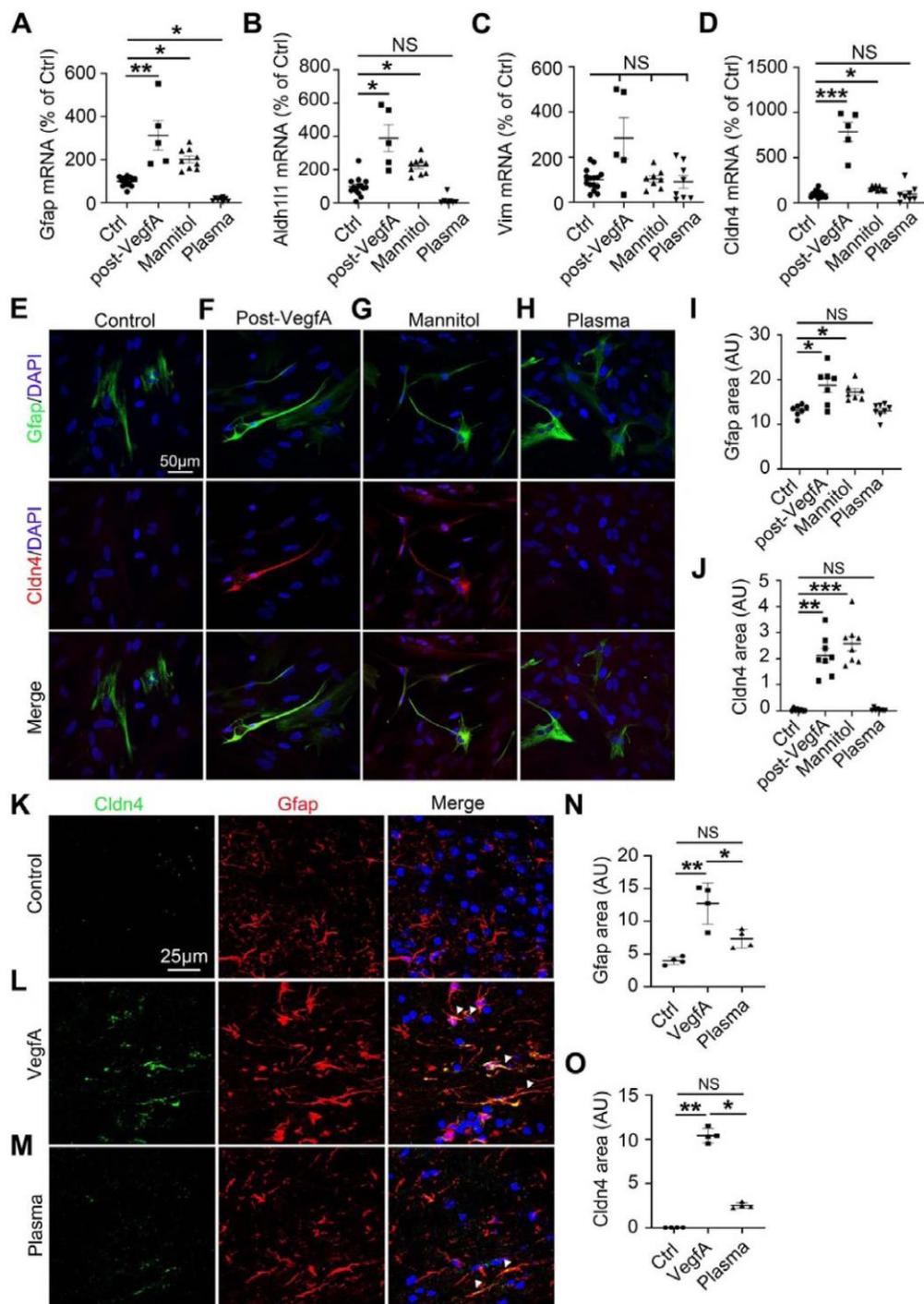


Figure 5: Endothelial signals can drive astrocyte barrier properties at the Glia Limitans: (A-K) NHA were cultured until confluency and starved for 24h. NHA were then treated for 24h with HBMEC medium from untreated cells (control condition), conditioned media from HBMECs treated with VegfA, conditioned media from HBMECs treated with Mannitol or HBMEC medium with 20% plasma from

healthy donors (Mannitol and VegfA were washed out of the HBMEC cultures before the medium was used to treat the NHA cultures). **(A)** Gfap, **(B)** Aldh111, **(C)** Vim and **(D)** Cldn4 expression were quantified by RT-qPCR. **(E-H)** Gfap (in green) and **(E)** Cldn4 (in red) localizations were evaluated by immune-fluorescent staining of a confluent NHA monolayer. Nuclei were stained with DAPI (in blue). The experiment was repeated 3×. **(I-J)** Gfap and Cldn4 positive areas were then quantified. **(K-O)** Cerebral cortices of 10 week-old C57BL/6 mice were harvested 24h following stereotactic microinjection of murine VegfA (60 ng in 3 μ L PBS) or C57BL/6 healthy mouse plasma (3 μ L) or vehicle control (3 μ L PBS). **(K-M)** Cortical lesions were immunostained with anti-Gfap and anti-Cldn4 antibodies. **(N)** Gfap positive areas and **(O)** Cldn4 positive areas were quantified (VegfA $n= 4$, C57BL/6 healthy mouse plasma $n=4$, Vehicle control $n=4$).

* $P\leq 0.05$, ** $P\leq 0.01$, *** $P\leq 0.001$ Kruskal Wallis test.

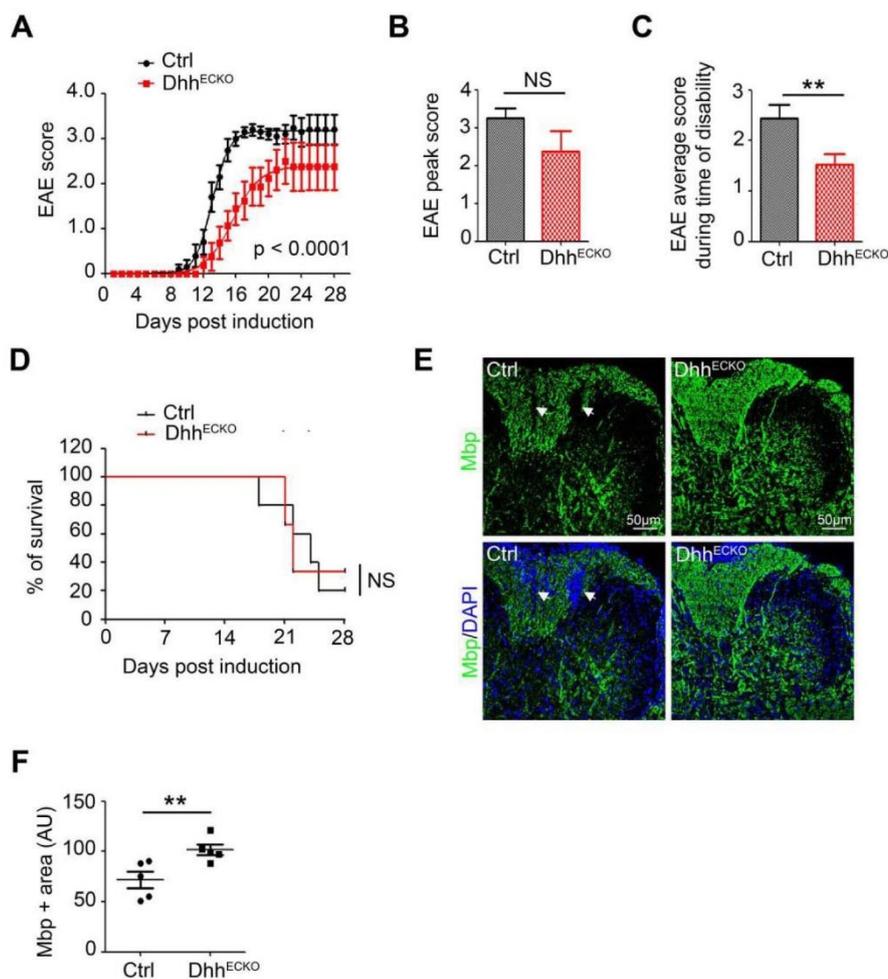


Figure 6: Dhh^{ECKO} mice display reduced disability in a model of multiple sclerosis during the onset of the disease: (A) Dhh^{ECKO} and control mice induced with EAE were scored daily on a standard 5-point scale, nonlinear regression (Boltzmann sigmoidal). (B) Dhh^{ECKO} and control mice EAE peak score, (C) EAE average score during time of disability and (D) mortality rate was quantified over the course of the disease. (E-F) Spinal cord EAE lesions from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls were harvested at 28 days post induction or at the time of euthanasia. (E) Dhh^{ECKO} and control lesions were immunostained with an anti-Myelin Basic Protein (Mbp) (in green) antibody; arrows indicate white matter loss areas. Nuclei were stained with DAPI (in blue). (F) Mbp positive areas were quantified ((Dhh^{ECKO} $n = 5$, WT $n = 5$). ** $P \leq 0.01$, Mann-Whitney U test.

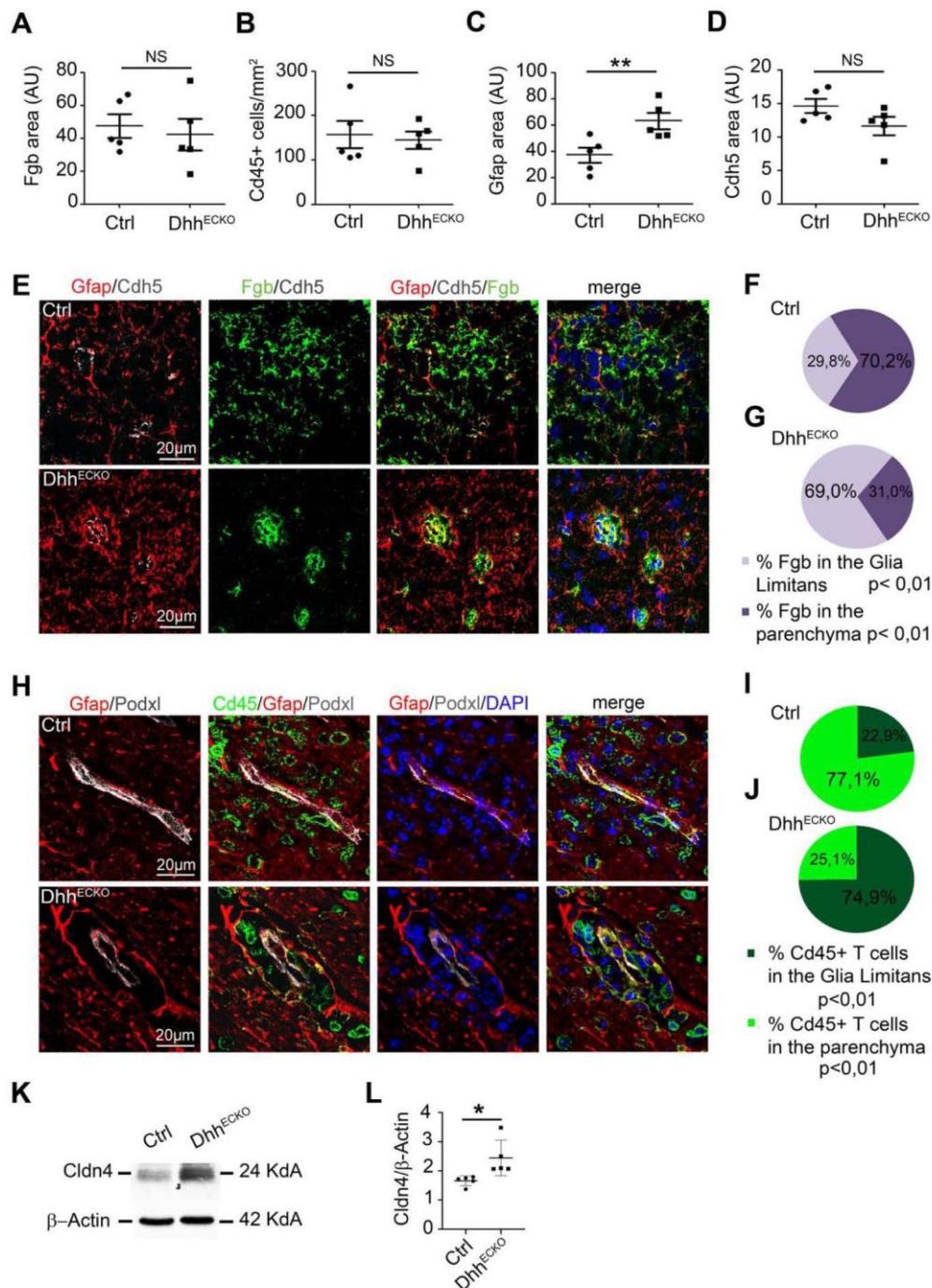


Figure 7: Mice with endothelial Dhh knockdown display a reinforced barrier at the Glia Limitans restraining access to the parenchyma to inflammation in a model of multiple sclerosis: (A-I) Spinal cord EAE lesions from Dhh^{ECKO} mice and littermate controls were harvested at 28 days post induction or at the time of euthanasia. **(A-D)** Dhh^{ECKO} and control lesions were immunostained with anti Fgb, anti-Cd45, anti-Gfap and anti-Cdh5 antibodies. **(A)** Fgb positive areas, **(B)** the number of

28

Cd45+ T cells per mm², **(C)** Gfap positive areas and **(D)** Cdh5 positive area were quantified (Dhh^{ECKO} *n* = 5, WT *n* = 5). **(E-G)** Dhh^{ECKO} and control lesions were immunostained with anti-Cdh5 (in grey), anti-Fgb (in green) and anti-Gfap (in red) antibodies (Nuclei were stained with DAPI (in blue)) and **(F-G)** the distribution of Fgb within the Glia Limitans and the parenchyma was quantified. **(H-J)** Dhh^{ECKO} and control lesions were immunostained with anti-Podxl (in grey), anti-Cd45 (in green) and anti-Gfap (in red) antibodies (Nuclei were stained with DAPI (in blue)) and **(I-J)** the distribution of Cd45+ T lymphocytes within the Glia Limitans and the parenchyma was quantified. **(K)** Cldn4 expression level was quantified by western blot on Dhh^{ECKO} and control spinal cord EAE lesion lysates. (Dhh^{ECKO} *n* = 5, WT *n* = 5). **P*≤0.05, ***P*≤0.01, Mann-Whitney U test.

mDhh	F	5' -CTTGACATCACCACGTCTG- 3'
	R	5' -ATGTAGTTCCTCAGCCCCT- 3'
mIcam1	F	5' -TGGCCTGGGGGATGCACACT- 3'
	R	5' -CCACCGGGCTGTAGGTGGGT-3'
mVcam1	F	5' -CGTACACCATCCGCCAGGCA- 3'
	R	5' -TAGAGTGCAAGGAGTTCGGGCG- 3'
mCldn5	F	5' -GCAAGGTGTATGAATCTGTGCT- 3'
	R	5' -GTCAAGGTAACAAAGAGTGCCA- 3'
mZo1	F	5' -GCTAAGAGCACAGCAATGGA- 3'
	R	5' -GCATGTTCAACGTTATCCAT- 3'
m18S	F	5' -CGCGTTCTATTTTGTGGT- 3'
	R	5' -AGTCGGCATCGTTTATGGTC- 3'
hGfap	F	5' -TGGGTCAAAGGAAACCGGAA- 3'
	R	5' -GAAAGTCCCAAGCCATCAGC- 3'
hDhh	F	5' -AACAGCTTACTCCGGCTCC- 3'
	R	5' -CGACTCTGTGGGCTCTGT- 3'
hIcam1	F	5' -ACGCCGAGGACAGGGCATT- 3'
	R	5' -GGGGCTATGTCTCCCCACCA- 3'
hVcam1	F	5' -GGCCAGTTGAAGGATGCGGG- 3'
	R	5' -AGAGCACGAGAAGCTCAGGAGAA- 3'
hAldh1L1	F	5' -CCAGGGTCTTCTTTGAGCCA- 3'
	R	5' -CACCAGAAGCCAGGCCAAAT- 3'
hVim	F	5' -CAGTTTTTCAGGAGCGCAAGA- 3'
	R	5' -CAAGTTGGTTGGATACTTGCTGG- 3'
hCldn4	F	5' -GACACTAATGAGCCTGGGAGG- 3'
	R	5' -GTGCACAGGTCCATTTATTGTAG- 3'
h18S	F	5' -CGCCGCTAGAGGTGAAATTC- 3'
	R	5' -TCTTGGCAAATGCTTTCGC- 3'

F forward, R reverse

β -actin was used as the household gene

Table I: List of primers used for reverse transcription (RT) quantitative polymer chain reaction (qPCR)

IV/ Résultats & interprétation

1) Dhh endothélial participe au maintien de la BHE

Il a été démontré au sein de l'INSERM U1034 que les cellules endothéliales expriment Dhh, et que cette protéine est nécessaire au maintien de l'intégrité endothéliale (Caradu Caroline et al., 2018). Afin de vérifier le rôle Dhh dans les CE sur la régulation de l'intégrité de la BHE, nous avons utilisé les souris Dhh-CEKO pour étudier l'effet de la délétion de Dhh dans les CE sur l'état de la BHE *in vivo*, puis afin de restreindre notre étude aux effets sur la cellule endothéliale seule, nous avons travaillé *in vitro*, à l'aide de cellules primaires isolées à partir des cerveaux de nos souris (BMEC), ou d'HUVEC transfectées par un ARNsi anti-Dhh.

A) Dhh endothélial est nécessaire au maintien de la BHE

Pour évaluer l'intégrité de la BHE *in vivo*, nous avons choisi 2 types de marqueurs immunohistologiques :

- L'expression et l'intégrité des protéines de jonction claudin-5 et VE-cadhérine
- L'extravasation des protéines plasmatiques albumine et fibrinogène, normalement circonscrites dans le vaisseau par la BHE en physiologie

Les souris Dhh-CEKO ont été sacrifiées à 1 mois après injection de tamoxifène, et les cerveaux ont été prélevés pour fixation, congélation et immunomarquage.

Ainsi, chez les souris Dhh-CEKO, nous avons pu détecter un état ouvert de la BHE, se traduisant par une discontinuation de la morphologie des jonctions, ainsi qu'une fuite extravasculaire des protéines plasmatiques (Art.1, Fig. 2).

Afin de déterminer si ces effets dépendent d'une signalisation propre à la CE, nous avons transposé ces travaux *in vitro*. En premier lieu, nous avons démontré qu'un knockdown de Dhh dans les HUVEC provoque une perturbation de l'organisation de la VE-cadhérine, identifiée comme un épaissement de la morphologie de la VE-cadhérine en immunofluorescence. Nous avons également pu isoler et cultiver des

BMEC de souris Dhh-CEKO. Chez ces souris, nous avons constaté une réduction de l'expression de deux protéines de jonctions : la claudin-5, et l'occludine (Art. 1, Fig S1).

Ces résultats indiquent donc que Dhh est nécessaire au maintien de la BHE, puisque sa délétion perturbe l'organisation des jonctions adhérentes et réduit l'expression des protéines de jonctions serrées.

B) Dhh endothélial agit sous sa forme full-length

Sachant que les ligands Hh peuvent exister sous leur forme non autoclivée, dite « full-length » ou FL-Hh, ou sous une forme « mature » N-Hh, nous avons souhaité savoir sous quelle forme Dhh endothélial assure le maintien de la BHE. Nous avons notamment démontré que Dhh est majoritairement produit sous sa forme FL, et est bien actif sous cette forme dans la CE.

Nous avons voulu alors savoir s'il est nécessaire que le Dhh soit palmitoylé, et montré, à l'aide d'un inhibiteur de la HhAT, le RU-SKI 43, que la palmitoylation de Dhh n'est pas nécessaire à son effet protecteur sur la BHE. Nous avons ensuite montré que le traitement par du FL-Dhh soluble permet de restaurer l'intégrité jonctionnelle de l'endothélium lorsqu'elle est déstabilisée par l'ARNsi anti-Dhh (Art.1, Fig. 4).

Ces résultats indiquent donc que Dhh, dans la CE, est actif sous sa forme full-length pour induire ses effets stabilisateurs de la BHE.

C) Les souris Dhh-CEKO développent, à long terme, des troubles cognitifs

Nous avons étudié quelles sont les conséquences à long terme, de la déficience en Dhh dans les CE, sur la physiologie de la BHE et du parenchyme cérébral. Nous avons donc suivi les capacités cognitives des souris Dhh-Ctrl et Dhh-CEKO au cours de leur vieillissement et prélevé les cerveaux à 1 an pour analyse immunohistologique.

a) L'ouverture de la BHE persiste jusqu'à 1 an chez les souris Dhh-CEKO

Afin de connaître les conséquences de la délétion de Dhh sur la physiopathologie du cerveau à long terme, nous avons commencé par vérifier l'état de cette BHE à 1 an. Nous avons évalué l'extravasation de protéines plasmatiques que sont l'albumine et le fibrinogène, par immunomarquage (Figure 15).

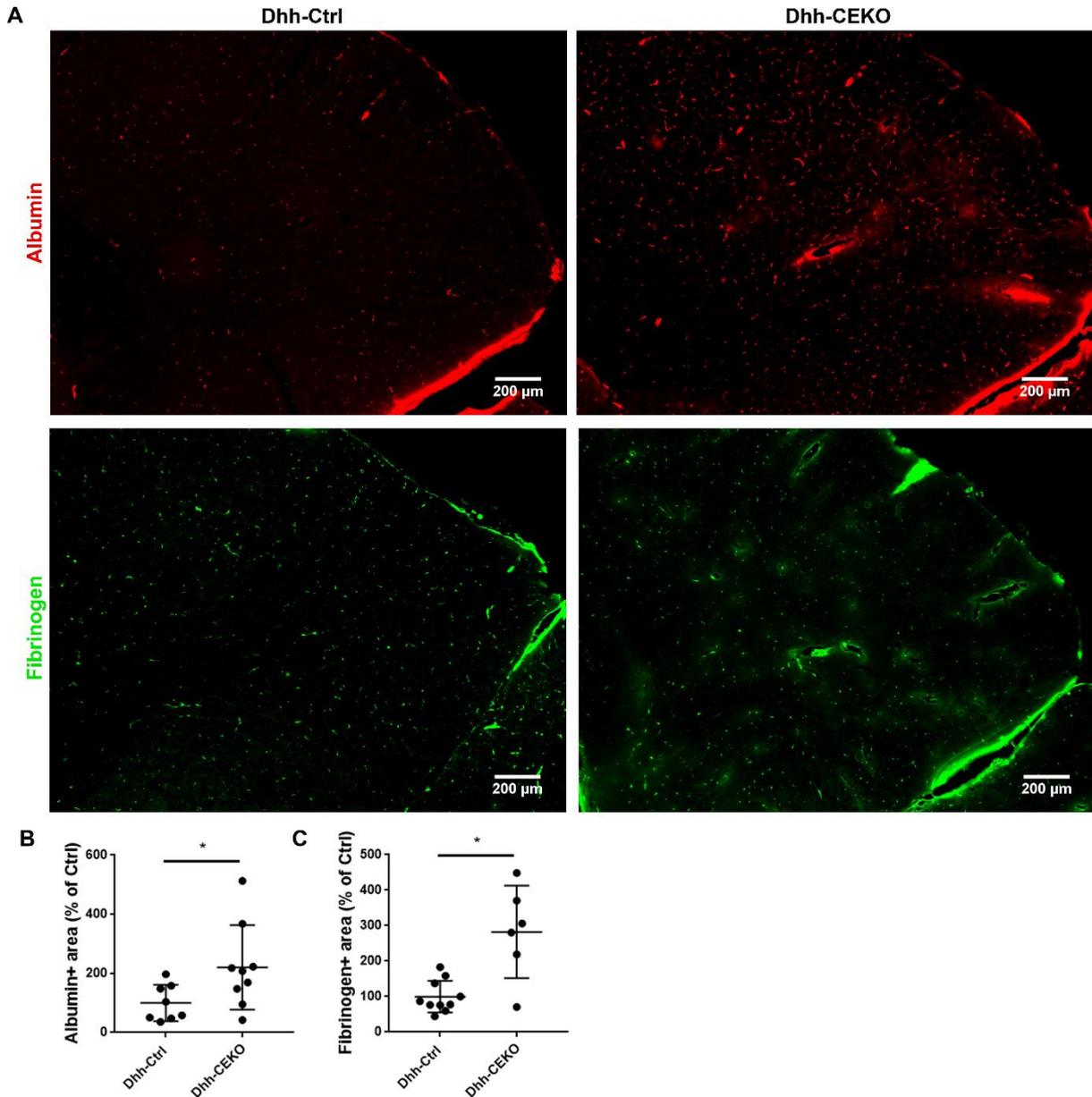


Figure 15 : Les vaisseaux sanguins des souris Dhh-CEKO ont une perméabilité accrue à 12 mois. A 12 mois, les souris Dhh-CEKO et Dhh-Ctrl ont été sacrifiées, les cerveaux prélevés et coupés en sections sagittales de 20 μ m. (A) Afin d'évaluer la perméabilité vasculaire, des immunomarquages fluorescents de l'albumine (rouge) et du fibrinogène (vert) ont été réalisés. La perméabilité vasculaire a été quantifiée en mesurant l'aire positive pour les marquages (B) anti-albumine et (C) anti-fibrinogène. Analyse statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$.

A 1 an, on remarque toujours une ouverture de la BHE chez les souris Dhh-CEKO, reflétée par l'extravasation de l'albumine et du fibrinogène. Dans notre étude de paramètres neurovasculaires chez ces souris, nous nous sommes aussi intéressés à la perfusion du cerveau et l'état d'autres cellules de l'UNV.

b) La délétion de Dhh n'affecte pas la perfusion du cerveau ni la couverture péricytaire des CE.

Afin de déterminer si la délétion de Dhh et l'ouverture de la BHE s'accompagne d'une raréfaction vasculaire dans le cerveau, ou d'une affection des pérycites, nous avons dans un premier temps mesuré ce flux dans le cortex cérébral à différents intervalles jusqu'à un an d'âge à l'aide d'un Laser Doppler trans-crânial. Cette méthode n'étant toutefois pas optimale quant à sa sensibilité, nous avons également évalué la densité vasculaire dans le cortex de ces souris à 1 an par immunomarquage de la podocalyxine, un marqueur de la surface interne des CE, ce qui reflète la capacité de perfusion d'un tissu. Nous avons, par la même occasion, réalisé un co-marquage de PDGFRb, afin d'évaluer si la délétion de Dhh dans les CE provoque une altération de la couverture péricytaire des vaisseaux cérébraux (Figure 16).

Les souris Dhh-CEKO ne montrent pas de différence de flux sanguin cérébral détectable à la mesure au Laser Doppler par rapport aux souris Dhh-Ctrl. Nous avons également pu nous assurer que la densité vasculaire est la même entre ces deux groupes et que la couverture péricytaire des vaisseaux n'est pas affectée. La délétion de Dhh induit donc à long terme une perméabilité vasculaire cérébrale mais pas d'hypoperfusion, est ne semble pas délétère pour les péricytes. Toutefois, le laser Doppler transcrânial ayant une sensibilité limitée et le marquage réalisé ne reflétant que la densité vasculaire et non pas la perfusion *per se* du cerveau, d'autres méthodes plus adaptées sont à envisager pour pouvoir confirmer qu'une hypoperfusion n'est pas présente dans le phénotype des souris Dhh-CEKO.

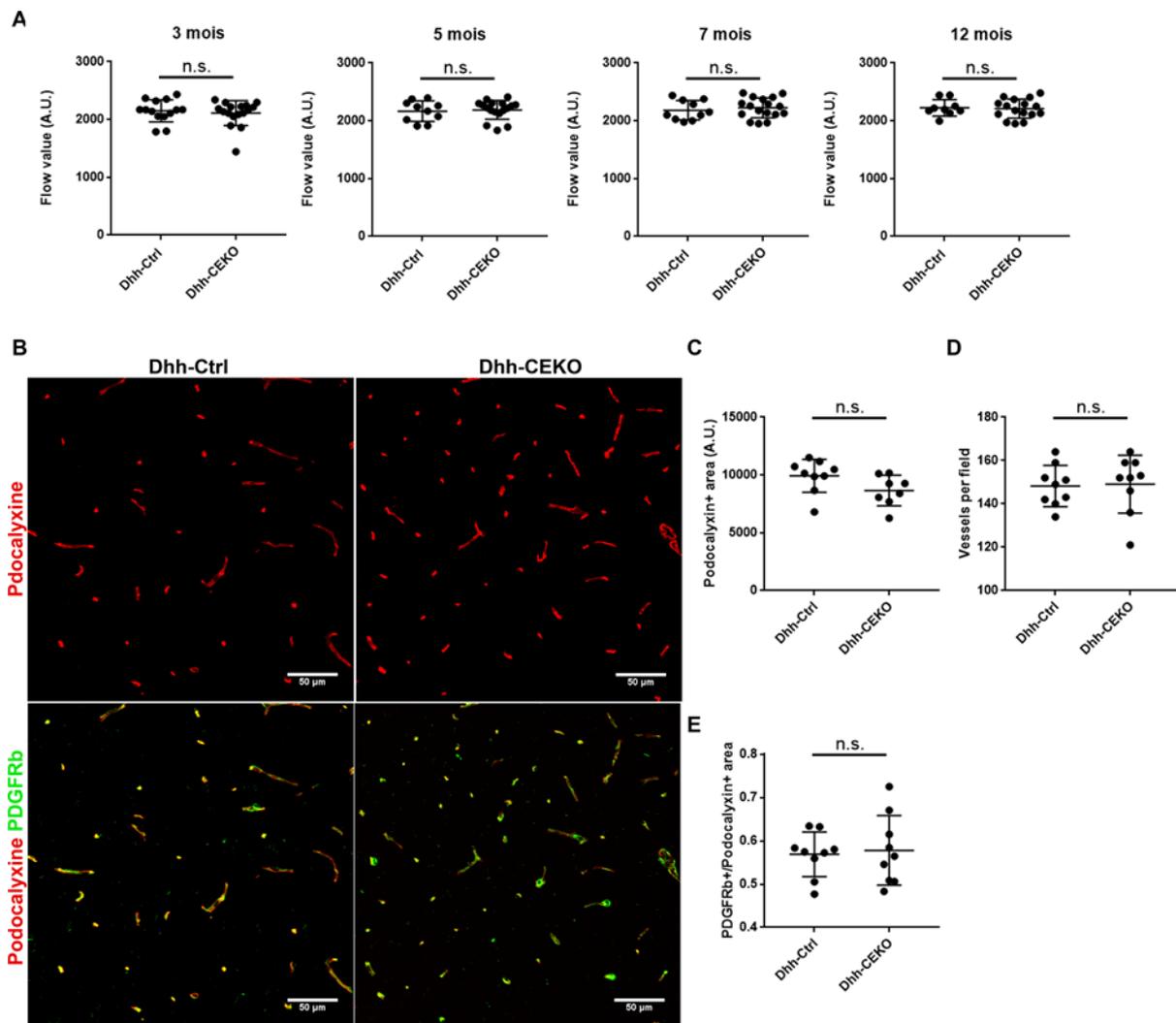


Figure 16 : Les souris Dhh-CEKO ne développent de réduction du flux sanguin cérébral ni de densité vasculaire. (A) A 3, 5, 7, 12 mois, les souris ont été soumises à une mesure du flux sanguin cérébral cortical par laser Doppler trans-crânial. (B) Les vaisseaux sanguins ont été marqués par un immunomarquage anti-podocalyxine afin de marquer les CE et anti-PDGFRb afin de marquer les péricytes. La densité vasculaire a été évaluée en mesurant l'aire positive pour le marquage podocalyxine (C) ou le nombre d'objets marqués par champs (D). (E) La couverture péricytaire a été mesurée par le ratio de l'aire positive pour PDGFRb sur l'aire positive pour la podocalyxine. Analyses statistiques : Mann-Whitney. n.s. : non significatif.

la suite de déterminer quel est le phénotype de ces astrocytes activés, et notamment savoir s'ils ont un effet plutôt protecteur ou délétère sur le parenchyme cérébrale ou la fonction vasculaire.

d) Une activation microgliale modérée existe chez les souris Dhh-CEKO à 1 an

L'autre élément de l'UNV dont nous évalué l'activation est la microglie. Pour cela, nous avons réalisé un marquage anti-IBA1, un marqueur de l'activation microgliale (Figure 18).

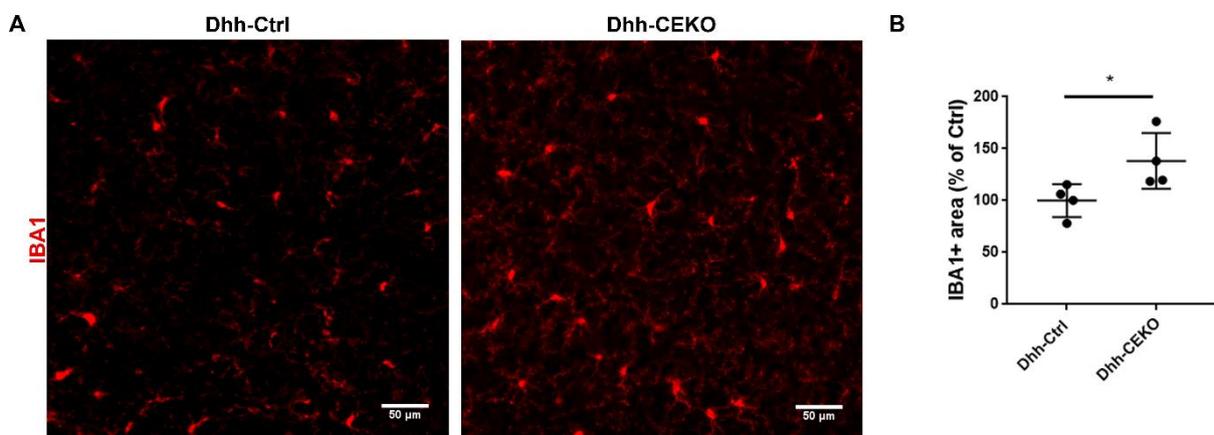


Figure 18 : La microglie est activée dans le cortex des souris Dhh-CEKO à 1 an. A 1 an, les souris Dhh-CEKO et Dhh-Ctrl ont été sacrifiées, les cerveaux prélevés et coupés en sections sagittales de 20µm. (A) Afin d'évaluer l'activation microgliale, un immunomarquage fluorescent anti-IBA1 a été réalisé. Les images sont prises dans des régions similaires. (B) L'activation microgliale a été quantifiée en mesurant l'aire de marquage IBA1 dans le cortex. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$

Nous avons observé une immunoréactivité légèrement plus importante pour IBA1 dans le cortex cérébral de souris Dhh-CEKO que dans celui des souris Dhh-Ctrl. Cette expérience démontre donc une activation plus importante de la microglie chez les souris Dhh-CEKO. Tout comme pour les astrocytes, l'état et le rôle de la microglie dans le phénotype des souris Dhh-CEKO reste à éclaircir.

e) Les souris Dhh-CEKO présentent des signes de troubles cognitifs à partir de 8 mois

Après injection de tamoxifène, les souris ont été soumises au test d'alternance spontanée à différents temps, pendant une durée d'un an. Les souris ont été habituées à la manipulation pendant plusieurs jours avant le jour du test. Le jour du

test, les souris sont placées dans un ordre aléatoire dans le labyrinthe en Y, et les déplacements dans les différents bras sont enregistrés pendant 5 minutes (Figure 19).

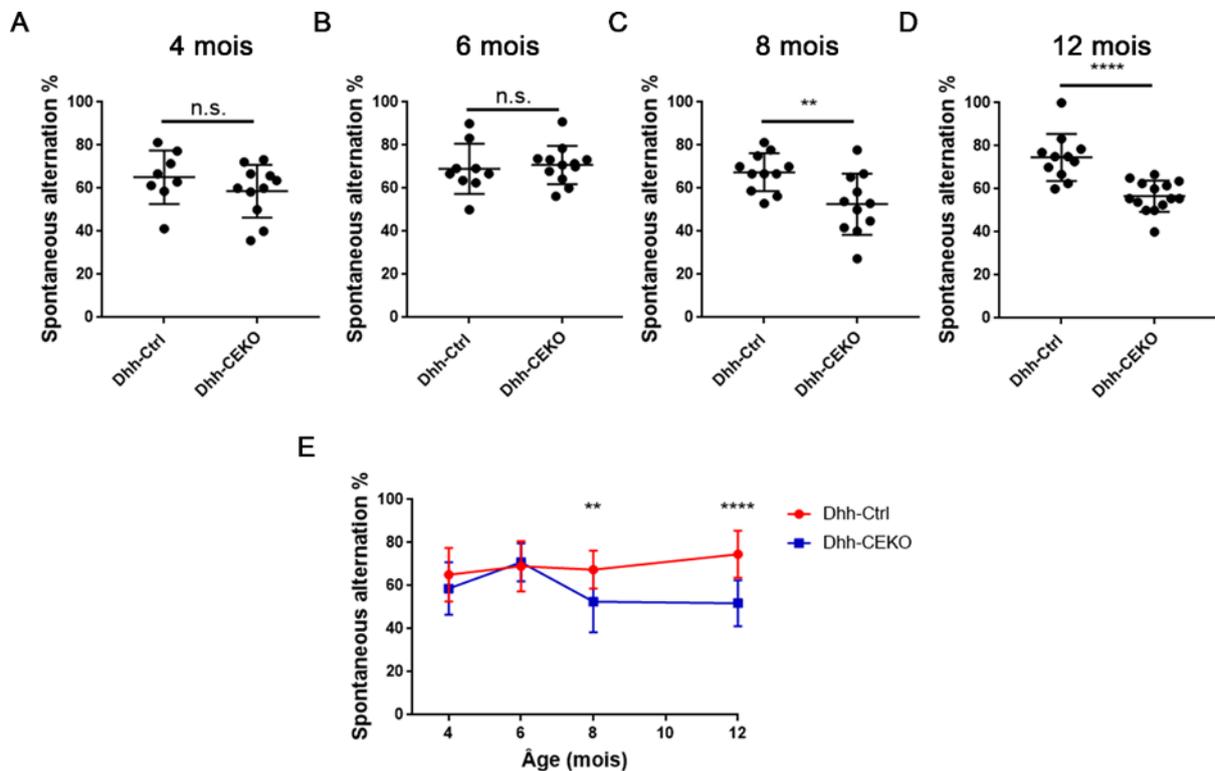


Figure 16 : Le score des souris Dhh-CEKO dégénère avec le temps par rapport aux souris Dhh-Ctrl : Les souris Dhh-Ctrl et Dhh-CEKO ont été habitués à la manipulation pendant au moins 4 jours avant le jour de test, puis ont été placées dans un ordre aléatoire dans le labyrinthe en Y. Les déplacements ont été enregistrés pendant 5 minutes. Le score d'alternance spontanée a été mesuré à (A) 4, (B) 6, (C) 8 et (D) 12 mois. (E) Représentation des scores des souris Dhh-Ctrl et Dhh-CEKO sur un axe temporel. Le score obtenu par les souris Dhh-CEKO est significativement moins bon à partir de 8 mois. Analyses statistiques : Mann-Whitney. n.s. : non significatif ; ** : $p < 0,01$; **** : $p < 0,0001$

Le test d'alternance dans le labyrinthe en Y nous a donc permis de mettre en évidence l'apparition de troubles cognitifs chez les souris Dhh-CEKO dès 8 mois (6 mois après injection de tamoxifène). Il semble donc que la délétion de Dhh dans les CE, et la dysfonction neurovasculaire qui s'ensuit suffisent à induire à long terme l'apparition de troubles cognitifs.

f) Les souris Dhh-CEKO présentent des signes de mort neuronale

Nous avons vérifié en histologie l'existence chez les souris Dhh-CEKO d'une pathologie neuronale. Pour ce faire, nous avons réalisé un immunomarquage anti-Neun, un marqueur neuronal utilisé pour évaluer la survie neuronale, et pour rechercher des zones de mort neuronale, souvent associée aux troubles cognitifs (Figure 20).

L'immunomarquage anti-Neun a permis de révéler des zones de mort neuronale dans le cortex cérébral des souris Dhh-CEKO. Cependant, aucun signe de mort neuronale n'a pu être détecté dans l'hippocampe, région cérébrale où les lésions sont le plus souvent associées à un déficit de la mémoire.

Ces résultats confirment l'existence d'une pathologie neuronale chez les souris Dhh-CEKO âgées.

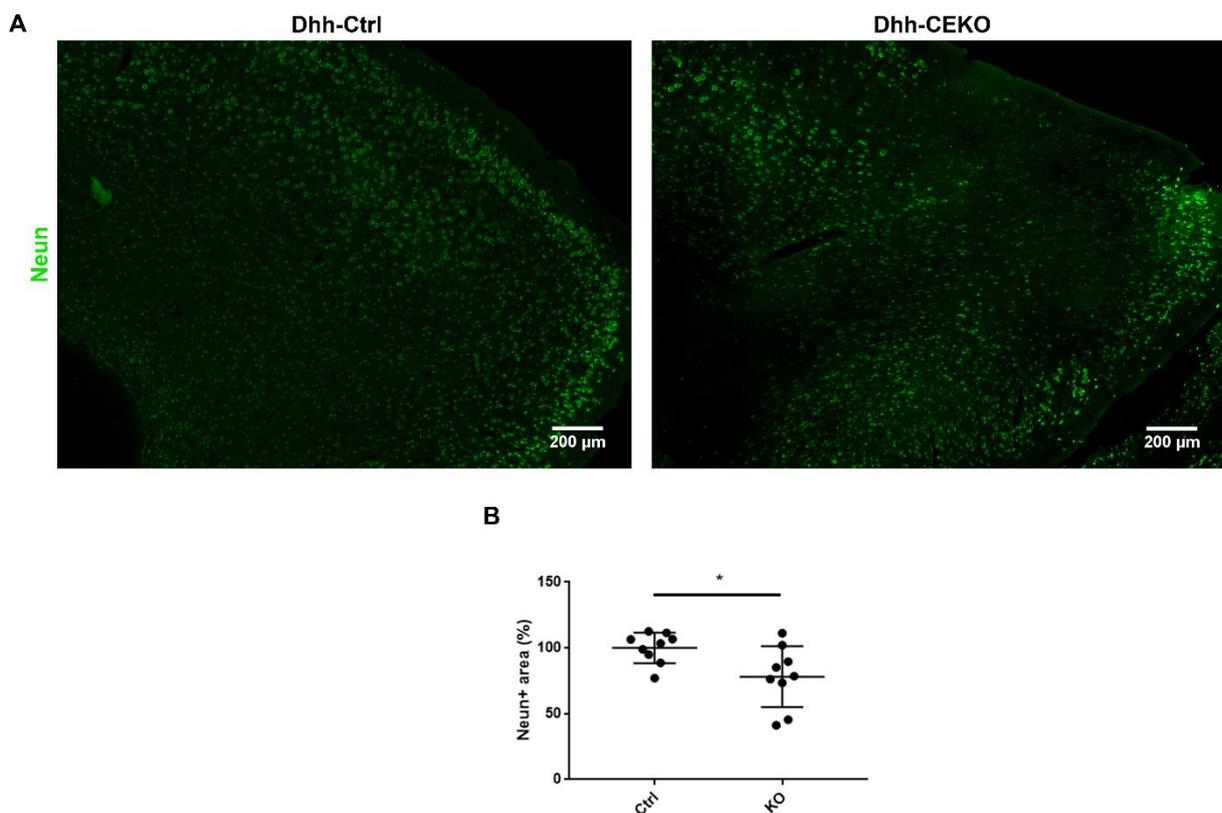


Figure 20 : Les souris Dhh-CEKO présentent des signes de mort neuronale à 12 mois. A 1 an, les souris Dhh-CEKO et Dhh-Ctrl ont été sacrifiées, les cerveaux prélevés et coupés en sections sagittales de 20µm. (A) Afin d'évaluer la survie neuronale, un immunomarquage fluorescent anti-Neun a été réalisé. (B) Le marquage a été quantifié en mesurant l'aire positive pour le marquage Neun dans le cortex. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$.

D) Conclusion

Nous avons donc montré que dans les CE, Dhh est nécessaire au maintien de la BHE en conditions physiologiques. En effet, la perte endothéliale de Dhh provoque l'ouverture de la BHE, ce qui à long terme, amène à l'apparition de troubles cognitifs et d'une pathologie neurovasculaire. De tels résultats renforcent l'intérêt de cibler la voie de signalisation Hh endothéliale pour le traitement des pathologies neurovasculaire. Il est particulièrement intéressant de noter que les souris Dhh-CEKO ne présentent pas d'hypoperfusion, ou de réduction de la fonction péricytaire. Ces résultats suggèrent qu'une perméabilité de la BHE suffit à induire à long terme l'apparition de troubles cognitifs. En effet, d'autres travaux ont mis en lumière la synergie entre l'hypoperfusion et l'ouverture de la BHE dans l'apparition d'une neuropathie (Bell *et al.*,2010), mais nous avons ici démontré que l'ouverture de la BHE, indépendamment d'une réduction de la perfusion sanguine du cerveau, permet l'apparition de troubles cognitifs. Nous avons aussi relevé une activation astrocytaire et microgliale dans le cortex des souris Dhh-CEKO, et le rôle de ces cellules reste à éclaircir dans la pathologie neuronale de ces souris.

2) Les ligands Hh participent à l'ouverture de la BHE dans les pathologies neurodégénératives

A) L'expression des ligands Hh est modulée dans l'UNV dans les pathologies neurodégénératives

a) La pathologie amyloïde réprime l'expression endothéliale de Dhh

Nos résultats précédents ont montré que le Dhh endothélial est nécessaire au maintien de la BHE et que sa délétion entraîne à long terme l'apparition de troubles cognitifs. Nous avons posé la question de savoir si la signalisation Hh joue un rôle dans l'ouverture de BHE mise en jeu dans les pathologies neurodégénératives. Nous avons tout d'abord voulu savoir si l'expression de Dhh est modulée par l'A β . En effet, l'AB1-42 recombinant humain réduit l'expression de KLF-2 dans les CE, d'une façon

dépendante de la dose et de la durée du traitement (Fang et al., 2017) et KLF-2 est un régulateur transcriptionnel de Dhh (Caradu Caroline et al., 2018). Aussi avons-nous voulu déterminer si le traitement de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (HBMEC) avec du peptide A β 1-42 réduit l'expression de Dhh.

Après 96 heures de traitement, nous avons bien retrouvé une réduction de l'expression de KLF-2 mais aussi de Dhh (Figure 21).

Ces résultats suggèrent que l'accumulation d'A β , dans la MA, pourrait provoquer une réduction de l'expression endothéliale de Dhh, et donc une ouverture consécutive de la BHE. Nous nous sommes donc intéressés par la suite à l'effet d'une délétion de Dhh sur le développement de la MA.

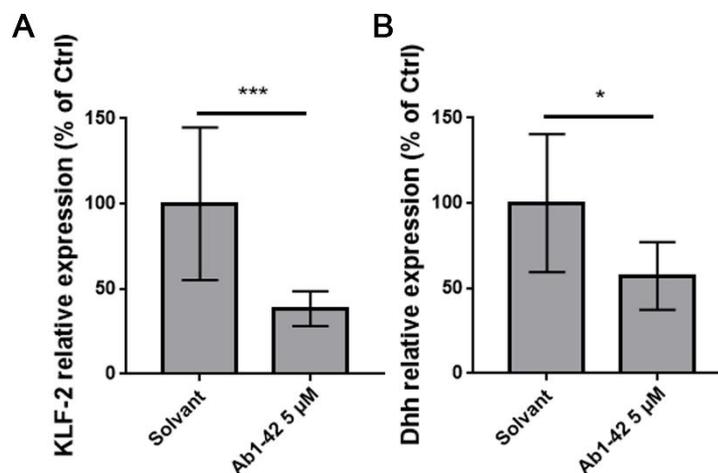


Figure 21 : L'A β 1-42 réduit l'expression de KLF-2 et Dhh dans les HBMEC. Les cellules ont été traitées pendant 96h par l'A β 1-42 (5 μ M) ou par le solvant correspondant, puis les ARN ont été extraits et rétro-transcrits. L'expression de KLF-2 (A) et de Dhh (B) a été évaluée par PCR quantitative. Groupe Solvant : n=8 ; groupe Ab1-42 5 μ M : n=7. Analyses statistiques : Mann-Whitney. * :p<0,05 ; *** :p<0,001

b) L'expression des Ligands Hh est modulée dans l'UNV dans la SEP

Il a été démontré précédemment dans le laboratoire que le TNF α réprime l'expression de Dhh dans les HUVEC (Caradu Caroline et al., 2018). Nous avons obtenu un résultat similaire en traitant des HBMEC par la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β . Ce résultat suggère que l'inflammation réduit l'expression de Dhh dans les CE de la BHE. Nous avons également montré *in vivo* que dans un modèle expérimental de SEP (l'EAE décrite en section matériel & méthodes), dans lequel l'inflammation

est exacerbée, l'expression de Dhh est réduite dans les CE (Art. 2, Fig.1). Ceci suggère que Dhh pourrait jouer un rôle dans l'ouverture de BHE dans la SEP.

Shh pourrai lui aussi jouer un rôle important. En effet, il a été montré que Shh est exprimé dans les astrocytes en conditions inflammatoires (Alvarez et al., 2011). Nous avons vérifié ce résultat dans l'EAE, et avons effectivement observé une activation de l'expression de Shh dans les astrocytes activés (Art. 1, Fig. S9B). Le rôle du Shh astrocytaire étant mal connu dans la neuroinflammation, nous avons étudié le développement de la pathologie de la SEP chez des souris dont les astrocytes sont mutés pour l'expression de Shh (souris Shh-ACKO).

B) Impact de la délétion de Dhh dans la pathologie de la MA

Afin d'étudier l'effet de la délétion endothéliale de Dhh sur l'évolution de la MA, nous avons créé une lignée de souris par croisement des souris Dhh-Ctrl et Dhh-CEKO avec des souris développant spontanément la MA (souris APP/PS1) et avons obtenu les souris APPD-Ctrl et APPD-KO (décrites en section matériel et méthodes).

a) La délétion endothéliale de Dhh accélère l'apparition de troubles cognitifs dans la MA

Nous avons suivi l'évolution des capacités cognitives de souris APPD-Ctrl et APPD-KO au cours de leur vieillissement.

Les souris APPD-Ctrl et APPD-KO ont régulièrement été soumises au test du labyrinthe en Y (Figure 22). Pour chacun de ces tests, des souris Dhh-Ctrl ont été utilisé en guise de contrôle « sain » pour vérifier la validité du test.

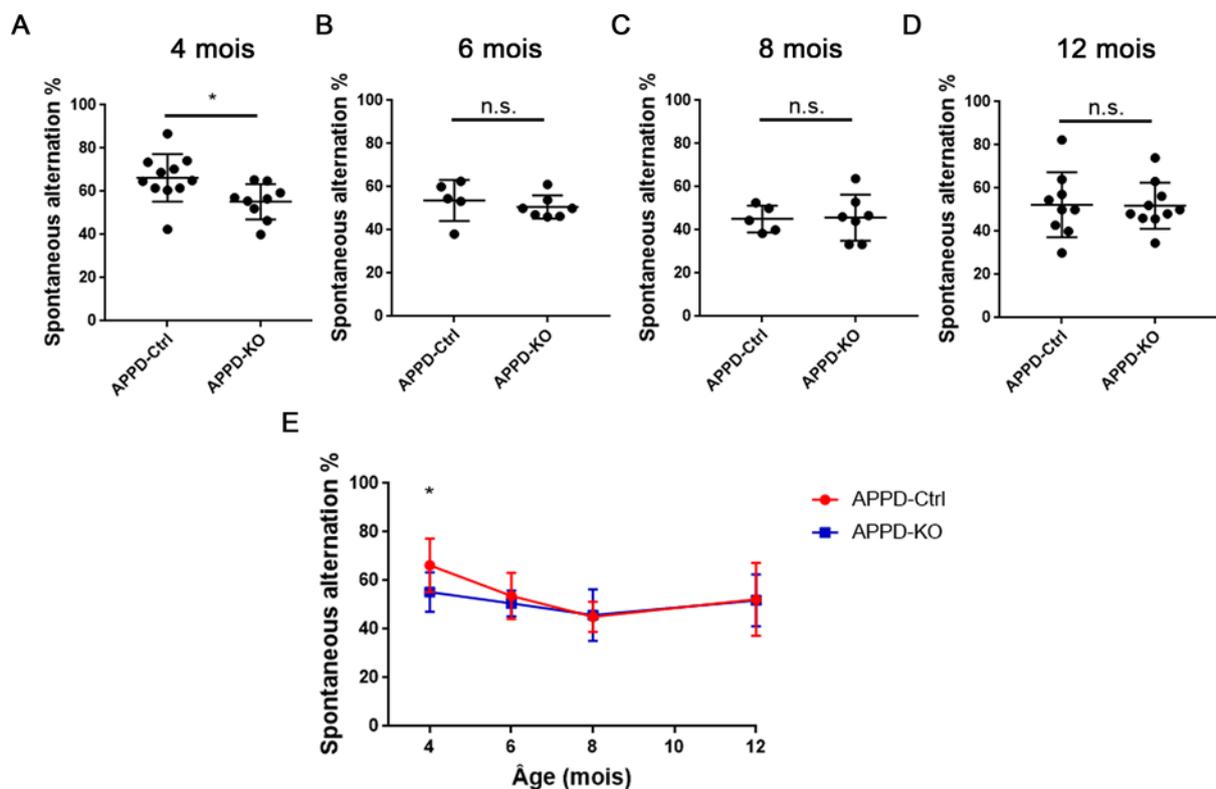


Figure 22 : Le score des souris APPD-KO dégénère plus vite que celui des souris APPD-Ctrl: Les souris APPD-Ctrl et APPD-KO ont été habitués à la manipulation pendant au moins 4 jours avant le jour de test, puis ont été placées dans un ordre aléatoire dans le Y-maze. Les déplacements ont été enregistrés pendant 5 minutes. Le score d'alternance spontanée a été mesuré à (A) 4, (B) 6, (C) 8 et (D) 12 mois. (E) Représentation des scores des souris APPD-Ctrl et APPD-KO sur un axe temporel. Le score obtenu par les souris APPD-KO est significativement plus bas à 4 mois. Analyse statistiques : Mann-Whitney. * : $p < 0,05$.

Les résultats indiquent une baisse de score pour les souris APPD-KO dès 4 mois (2 mois après injection de tamoxifène). Aucune différence significative n'a été relevée pour les temps suivants entre les 2 groupes. Ces résultats suggèrent que la déficience en Dhh dans les CE accélère le développement de la MA, en accord avec la littérature décrivant l'ouverture de BHE comme un facteur aggravant la MA. Nous avons voulu savoir comment cette délétion de Dhh affecte la pathologie amyloïde, c'est-à-dire, si la déposition d'A β est augmentée chez les souris Dhh-CEKO

b) La déposition de peptide β -amyloïde n'est pas affectée à 1 an par la délétion de Dhh dans les CE

Nous étudie si la déficience en Dhh aggrave la pathologie amyloïde à long terme chez les souris APPD-KO. Le dépôt d'A β dans le cerveau a été évalué par immunomarquage anti-A β (Figure 23).

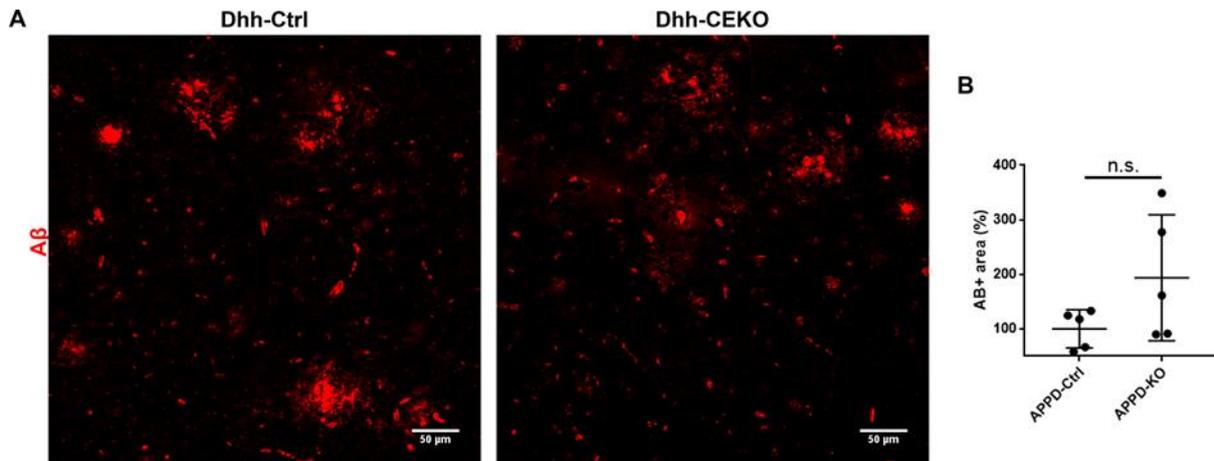


Figure 23 : L'accumulation d'A β est similaire entre les groupes APPD-Ctrl et APPD-KO. A 1 an, les souris APPD-Ctrl et APPD-KO ont été sacrifiées, les cerveaux prélevés et coupés en sections sagittales de 20 μ m. (A) Afin d'évaluer l'accumulation d'A β dans le cortex cérébral, un immunomarquage fluorescent A β a été réalisé. (B) L'accumulation a été quantifiée en mesurant l'aire positive pour le marquage anti-A β dans le cortex. Analyse statistiques : Mann-Whitney . n.s. : non significatif

Contrairement à ce que nous attendions, nous n'avons pas relevé d'aggravation de la pathologie amyloïde : les souris, avec ou sans déficience en Dhh, présentent un niveau de dépôt similaire. Considérant les résultats précédents, et le fait que l'A β 1-42 réduit l'expression de Dhh dans les CE, nous avons émis l'hypothèse suivante : la délétion de Dhh dans les CE accélère le développement de la maladie d'Alzheimer dans un premier temps, provoquant la survenue de troubles cognitifs à 4 mois ; cependant, la pathologie amyloïde entraînant elle-même une réduction de l'expression de Dhh dans les CE cérébrales, le phénotype des souris APPD-Ctrl « rattrape » celui des souris APPD-KO, expliquant l'absence de différence observée à 12 mois.

c) L'activation astrocytaire est similaire entre les groupes APPD-Ctrl et APPD-KO à 1 an
 Puisque nous avons pu relever une activation astrocytaire plus importante chez les souris Dhh-CEKO par rapport aux souris Dhh-CEKO, nous avons voulu vérifier si ce paramètre varie entre les souris APPD-Ctrl et APPD-KO (Figure 24)

L'activation astrocytaire ne paraît pas augmentée chez les souris APPD-KO. Il y a déjà une activation extrêmement importante à 1 an chez les souris APP/PS1, il est probable que la délétion de Dhh n'induit pas un effet suffisamment important pour détecter une différence.

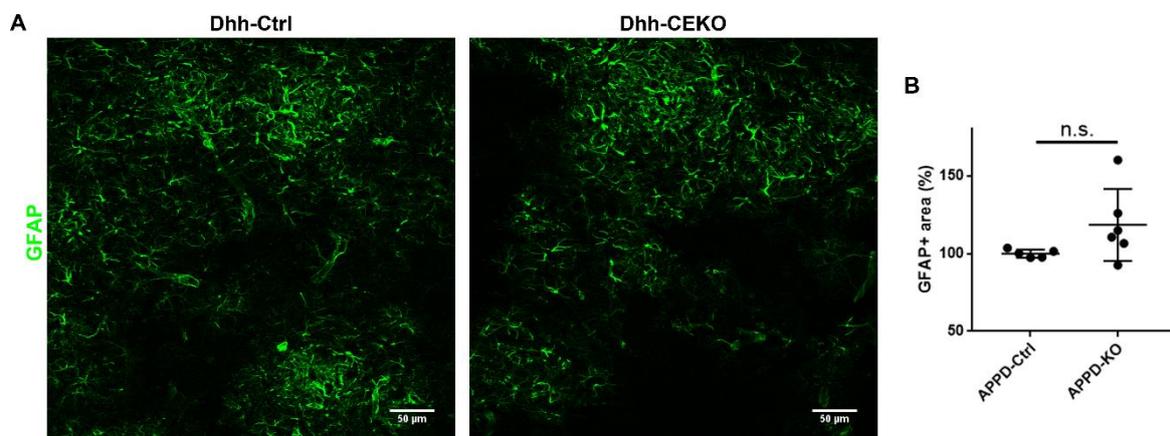


Figure 24 : L'activation astrocytaire est similaire entre les groupes APPD-Ctrl et APPD-KO.
 A 1 an, les souris APPD-Ctrl et APPD-KO ont été sacrifiées, les cerveaux prélevés et coupés en sections sagittales de 20μm. (A) Afin d'évaluer l'activation des astrocytes dans le cortex cérébral, un immunomarquage fluorescent anti-GFAP a été réalisé. (B) L'activation a été quantifiée en mesurant l'aire positive pour le marquage anti-GFAP dans le cortex. n.s. : non significatif

d) Conclusion

Nos résultats indiquent qu'à long terme, la délétion de Dhh dans les CE ne semble pas affecter la pathologie du cerveau dans la MA. Cependant, le test de comportement indique qu'il semble y avoir une apparition précoce de troubles cognitifs chez les souris APPD-KO par rapport aux souris APPD-Ctrl. Notre hypothèse est qu'initialement, la mutation de Dhh provoque une accélération de l'apparition des symptômes de la MA chez les souris APPD-KO. Cependant, l'Aβ1-42 entraînant une diminution de l'expression de Dhh dans les HBMEC, il est possible que le développement de la MA chez les souris APPD-Ctrl provoque la diminution de

l'expression endothéliale de Dhh, ce qui expliquerait l'absence de différence à un âge plus avancé. Une étude histologique des cerveaux des souris APPD-KO et APPD-Ctrl à 4 mois, ainsi que la mesure de l'expression de Dhh dans les CE chez les souris APP/PS1 semble nécessaire pour vérifier cette hypothèse.

C) Shh astrocytaire déstabilise la BHE dans la neuroinflammation

Afin d'étudier l'effet du Shh astrocytaire sur l'ouverture de la BHE dans la neuroinflammation et la SEP, nous avons utilisé des souris déficientes pour Shh dans les astrocytes (Shh-ACKO).

Dans un contexte de neuroinflammation aiguë induite par injection d'un adénovirus IL-1 β dans le parenchyme cérébral, nous avons pu constater une expression plus importante des protéines de jonction chez les souris Shh-ACKO (Art. 1, Fig. S9). De la même façon, dans le modèle d'EAE, l'ouverture de la BHE est drastiquement réduite chez les souris Shh-ACKO (Art.1, Fig. 7,S9). Ces résultats démontrent que l'expression de Shh par les astrocytes participe à l'ouverture de BHE dans la sclérose en plaques.

Ces résultats sont d'autant plus intéressants que pour la première fois, il est suggéré que Shh, au moins en conditions pathologiques, déstabilise la BHE, contrairement à ce qui est généralement accepté. L'assertion que les différents ligands Hh agissent de la même manière est mise en cause puisque nous démontrons que Dhh endothélial, lui, stabilise la BHE. Nous faisons ici l'hypothèse que cette différence d'effet s'expliquerait par les formes respectives des deux ligands. En effet, nous avons évoqué plus tôt que Dhh existe majoritairement sous sa forme FL, et qu'il stabilise l'intégrité jonctionnelle endothéliale sous cette forme. En revanche, Shh est essentiellement produit sous sa forme N-Shh, notamment dans les astrocytes activés (Art. 1, Fig S9A). Nous nous sommes donc attachés à étudier l'effet de N-Shh sur la BHE hors contexte inflammatoire.

3) N-Shh inhibe Dhh endothélial et déstabilise la BHE.

A) N-Shh déstabilise la BHE *in vivo*

Afin d'étudier l'effet de N-Shh sur la BHE chez le sujet sain, nous avons injecté dans le cortex de souris WT un lentivirus induisant l'expression de N-Shh (LV-NShh), et comparé son effet à l'administration d'un lentivirus contrôle (LV-GFP) sur l'intégrité et la perméabilité de la BHE au niveau du site d'injection (Art. 1, Fig. 3).

De façon cohérente à ce que nous avons observé dans l'EAE chez les souris Shh-Ctrl et Shh-ACKO, nous avons constaté une ouverture plus importante de la BHE au niveau du site d'injection du LV-NShh. Il semble effectivement que N-Shh, chez l'adulte, déstabilise la BHE, et a donc un effet opposé au Dhh endothélial sur la régulation de la BHE.

Nous avons alors déterminé si de tels effets existent au niveau de la CE elle-même par des approches *in vitro*.

B) N-Shh recombinant déstabilise l'intégrité jonctionnelle endothéliale *in vitro*

Afin d'évaluer l'effet de N-Shh recombinant (rec N-Shh) sur les jonctions des CE, nous avons procédé de la même façon que pour l'étude *in vitro* des effets de Dhh endothélial. Le traitement d'HUVEC par du rec N-Shh provoque une désorganisation de la VE-Cadhérine identique à celle obtenue après déprivation de Dhh par l'ARNsi anti-Dhh. Dans les BMEC isolées à partir de souris WT, rec N-Shh réduit l'expression de la claudin-5 de la même façon que la déficience en Dhh.

Ces résultats et les précédents indiquent donc que N-Shh déstabilise l'intégrité jonctionnelle endothéliale, et provoque une ouverture de la BHE *in vivo*. De plus, ces résultats confirment que N-Shh et FL-Dhh régulent de façon opposée la BHE.

C) N-Shh et FL-Dhh sont en compétition pour leur récepteur Ptc

Afin d'en savoir plus sur les mécanismes opposants FL-Dhh et N-Shh, nous avons fait co-exprimer les deux ligands et leur récepteur commun, Ptch-1 dans des HeLa, afin d'observer, dans un premier temps, leur liaison respective au récepteur. Dans un second temps, puisque nous manquons d'un marqueur fiable de la voie Hh dans les CE, nous avons observé leurs effets respectifs sur le récepteur Ptch-1, et vérifié l'existence de résultats similaires avec des HUVEC (Art.1, Fig. 5,S8)

Tout d'abord, nous avons vérifié par co-immunoprécipitation que les deux ligands interagissent avec leur récepteur Ptch-1, puis que ces ligands sont en compétition pour ce récepteur. En effet, en présence de N-Shh, la liaison de FL-Dhh à Ptch-1 est drastiquement réduite. De plus, il apparaît qu'en fonction du ligand, la localisation du complexe ligand-récepteur diffère dans la cellule. Notamment, N-Shh prévient l'effet de FL-Dhh sur la localisation de Ptch-1, et des résultats similaires sont obtenus avec des HUVEC. Nous avons également remarqué que FL-Dhh et N-Dhh n'induisent pas le même effet dans les HeLa.

Ces résultats suggèrent donc que N-Shh et FL-Dhh sont bien en compétition pour le récepteur Ptch-1. De plus, ils indiquent qu'en fonction de leur forme, FL-Hh ou N-Hh, les ligands induisent des effets distincts.

D) Conclusion

Nous avons donc démontré que N-Shh déstabilise la BHE, *in vivo* et *in vitro*. Ces effets sont opposés à ceux de Dhh endothélial. D'après les résultats obtenus, il semble que cette différence d'effet soit due au niveau de maturation post-traductionnelle du ligand. En effet, les trois ligands Hh sous leur forme N-Hh ont une très forte homologie, et nous avons observé des effets distincts pour FL-Dhh et N-Dhh. Il faudra par la suite éclaircir les mécanismes respectifs mis en jeu par les différents ligands en aval du récepteur Ptch-1 dans les CE.

V/ Conclusion, Perspectives

1) Effet des ligands Hh sur la BHE

Les résultats obtenus pendant ces 3 années ont permis d'éclaircir le rôle des ligands Hh dans la régulation de l'intégrité de la BHE. Notamment nous avons démontré que Dhh, un ligand Hh exprimé dans la CE même, est nécessaire au maintien de la BHE, suggérant qu'agir sur la signalisation Hh endothéliale peut permettre d'agir sur la BHE. D'autres travaux ont rapporté que Shh est nécessaire à la mise en place de la BHE chez l'embryon de souris (Alvarez et al., 2011). Notamment, Ces travaux indiquent aussi, de façon cohérente avec nos résultats, que l'inhibition pharmacologique de la voie Hh déstabilise la BHE. De ce fait, il est généralement accepté que Shh est aussi un stabilisateur de la BHE. Cependant, de façon surprenante, nous avons ici démontré que Shh, ou plutôt N-Shh, produit par les astrocytes dans la neuroinflammation, a pour effet de déstabiliser la BHE chez l'adulte. Nous avons ensuite pu constater que cet effet de N-Shh se vérifie hors d'un contexte inflammatoire, et *in vitro*. Nos résultats indiquent donc, de façon inattendue, que N-Shh peut agir sur les CE comme un déstabilisateur de la BHE.

2) Signalisation Hh et CE

Il est généralement accepté que les différents ligands Hh ont des effets redondants, et que les différences de fonction *in vivo* sont essentiellement liées à leurs territoires d'expression respectifs. Or, nous avons relevé des effets opposés sur les CE en fonction du ligand utilisé. Notamment, nos résultats suggèrent que cette différence d'effet est dépendante du niveau de maturation post-traductionnelle de la protéine. N-Shh perturbe l'intégrité jonctionnelle, tandis que FL-Dhh endothélial est nécessaire à son maintien. C'est la première fois que des résultats suggèrent que différents ligands peuvent induire des effets non seulement distincts mais opposés sur une même cible cellulaire. Ces résultats apportent une information critique dans l'élaboration d'une thérapie ciblant la voie Hh endothéliale : l'administration d'un ligand, en tout cas sous sa forme N-Hh ne semble pas être une option viable pour restaurer la fonction de Dhh dans les CE.

Il reste cependant un travail considérable à réaliser quant à la compréhension de la signalisation Hh dans les CE. Notamment, quels sont les mécanismes intracellulaires respectifs mis en jeu par les ligands Hh en fonction de leur nature, leur structure, leur mode de signalisation ? Notamment, nous avons démontré *in vitro*, par co-immunoprécipitation que FL-Dhh est capable d'une interaction directe avec Smo si les protéines sont co-exprimés dans des HeLa (données non montrées). Sachant que des effets dépendants et indépendants de Smo existent dans la CE, et qu'une cellule est capable d'une signalisation indépendamment de Ptch-1 et Ptch-2 si elle co-exprime Smo et un ligand Hh (Pettigrew et al., 2014), il semble intéressant d'étudier le potentiel rôle de cette interaction Dhh-Smo dans les CE.

L'identification d'autres marqueurs d'activation de la voie de signalisation Hh dans les CE offrirait un outil crucial dans l'étude de cette voie de signalisation. Puisque nous avons la possibilité d'isoler les CE des souris Dhh-CEKO, l'étude transcriptomique et protéomique de ces cellules constitue une approche pertinente dans l'identification de tels marqueurs.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la réduction de l'expression de la Claudin-5 suite à la délétion de Dhh met en jeu la régulation de la phosphorylation de FoxO1. Sachant que cette phosphorylation est affectée par l'état des jonctions adhérentes (VE-Cadhérine) et que Dhh est nécessaire au maintien de ces jonctions, il serait également intéressant de déterminer si la régulation de FoxO1 est consécutive à la déstabilisation de la VE-Cadhérine ou si Dhh régule de façon plus directe cette phosphorylation.

3) Ouverture de la BHE et démence

Nos souris Dhh-CEKO développent à long terme des troubles cognitifs et une pathologie neuronale. L'impact de l'ouverture de la BHE a été étudié à de multiples reprises sur le développement de la MA ou de la DV. Cependant, cette ouverture est généralement traitée comme un facteur synergique avec l'hypoperfusion ou l'AVC, et n'est pas traitée comme un facteur causal suffisant de la démence. Les travaux de l'équipe de B.V. Zlokovic par exemple indique que l'ouverture de BHE potentialise l'impact de l'hypoperfusion sur la pathologie du cerveau (Bell et al., 2010). Nos souris ne faisant pas d'AVC et ne montrant pas de signes d'une hypoperfusion cérébrale,

nos résultats suggèrent qu'une ouverture seule de la BHE suffit à induire à long terme l'apparition de troubles cognitifs.

4) Perspectives thérapeutiques

Dhh endothélial est nécessaire au maintien de la BHE. Plus encore, sa délétion à long terme provoque l'apparition d'une pathologie neuronale et de troubles cognitifs. De même, la délétion de Dhh dans les CE dans un modèle de MA accélère l'apparition des troubles cognitifs, et nous avons démontré qu'*in vitro*, l'A β 1-42 réprime l'expression endothéliale de Dhh. Ces résultats, pris ensembles, soulignent l'intérêt de cibler la voie de signalisation Hh dans la thérapie de la démence.

Il pourrait être intéressant de poursuivre les recherches quant à l'effet des ligands Hh dans la maladie d'Alzheimer. Notamment, le traitement d'animaux développant la maladie d'Alzheimer par un agoniste de Smoothed avant l'apparition de troubles cognitifs peut sembler pertinente, d'autant plus qu'une telle thérapie a déjà été prouvée efficace dans un modèle d'AVC chez le rat. Par ailleurs, il nous faut également vérifier qu'une réduction de l'expression endothéliale de Dhh est bien présente chez les souris APP/PS1, et cette information serait également intéressante en ce qui concerne les patients humains. S'il y a bien une répression de l'expression de Dhh, il faut également déterminer quelle est la cinétique de cette répression par rapport à l'évolution de la maladie et de la pathologie amyloïde.

Dans le cas de la SEP, ou l'EAE, il serait intéressant de tester l'effet d'une inhibition de Shh sur l'évolution de la pathologie. Un inhibiteur de Shh ciblant directement la protéine existe, la robotnikine (Stanton et al., 2009), mais la liaison de cette molécule aux autres ligands Hh n'a pas été testée. Il existe cependant des anticorps avec des affinités distinctes pour les différents ligands. Cependant, notre étude s'est concentrée sur la BHE et nous n'avons pas exploré le rôle de Shh dans d'autres types cellulaires du parenchyme cérébral. A ce sujet, d'autres travaux rapportent que Shh est exprimé dans les oligodendrocytes et que la protéine est un facteur nécessaire à la remyélinisation (Ferent et al., 2013). Il serait donc nécessaire d'inhiber la protéine Shh périvasculaire sans altérer la fonction de Shh produits par les oligodendrocytes.

VI/ Bibliographie

Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., van Rooijen, N., Ivars, F., Opdenakker, G., and Sorokin, L.M. (2006). Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* *203*, 1007–1019.

Alvarez, J.I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P.J., Terouz, S., Sabbagh, M., Wosik, K., Bourbonnière, L., Bernard, M., et al. (2011). The Hedgehog Pathway Promotes Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Immune Quiescence. *Science* *334*, 1727–1731.

Andriopoulou, P., Navarro, P., Zanetti, A., Lampugnani, M.G., and Dejana, E. (1999). Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *19*, 2286–2297.

Apalla, Z., Papageorgiou, C., Lallas, A., Sotiriou, E., Lazaridou, E., Vakirlis, E., Kyrgidis, A., and Ioannides, D. (2017). Spotlight on vismodegib in the treatment of basal cell carcinoma: an evidence-based review of its place in therapy. *Clin Cosmet Investig Dermatol* *10*, 171–177.

Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., et al. (2010). Pericytes regulate the blood–brain barrier. *Nature* *468*, 557–561.

Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell* *21*, 193–215.

Azzi, S., Treppe, L., Leclair, H.M., Ngo, H.-M., Harford-Wright, E., and Gavard, J. (2015). Desert Hedgehog/Patch2 Axis Contributes to Vascular Permeability and Angiogenesis in Glioblastoma. *Front Pharmacol* *6*, 281.

Balaskas, N., Ribeiro, A., Panovska, J., Dessaud, E., Sasai, N., Page, K.M., Briscoe, J., and Ribes, V. (2012). Gene regulatory logic for reading the Sonic Hedgehog signaling gradient in the vertebrate neural tube. *Cell* *148*, 273–284.

Barnes, E.A., Kong, M., Ollendorff, V., and Donoghue, D.J. (2001). Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J.* *20*, 2214–2223.

Barnes, E.A., Heidtman, K.J., and Donoghue, D.J. (2005). Constitutive activation of the shh-ptc1 pathway by a patched1 mutation identified in BCC. *Oncogene* *24*, 902–915.

Bateman, R.J., Munsell, L.Y., Morris, J.C., Swarm, R., Yarasheski, K.E., and Holtzman, D.M. (2006). Human amyloid-beta synthesis and clearance rates as measured in cerebrospinal fluid in vivo. *Nat. Med.* *12*, 856–861.

Belgacem, Y.H., and Borodinsky, L.N. (2011). Sonic hedgehog signaling is decoded by calcium spike activity in the developing spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 4482–4487.

- Bell, R.D., Winkler, E.A., Sagare, A.P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., and Zlokovic, B.V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 68, 409–427.
- Berezowski, V., Landry, C., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2004). Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood–brain barrier. *Brain Research* 1018, 1–9.
- Bernabeu-Zornoza, A., Coronel, R., Palmer, C., Monteagudo, M., Zambrano, A., and Liste, I. (2019). Physiological and pathological effects of amyloid- β species in neural stem cell biology. *Neural Regen Res* 14, 2035–2042.
- Betz, A.L., and Goldstein, G.W. (1978). Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science* 202, 225–227.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., et al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385, 729–733.
- Briscoe, J., and Théron, P.P. (2013). The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 416–429.
- Byrd, N., Becker, S., Maye, P., Narasimhaiah, R., St-Jacques, B., Zhang, X., McMahon, J., McMahon, A., and Grabel, L. (2002). Hedgehog is required for murine yolk sac angiogenesis. *Development* 129, 361–372.
- Caradu Caroline, Couffinhal Thierry, Chapouly Candice, Guimbal Sarah, Hollier Pierre-Louis, Ducasse Eric, Bura-Rivière Alessandra, Dubois Mathilde, Gadeau Alain-Pierre, and Renault Marie-Ange (2018). Restoring Endothelial Function by Targeting Desert Hedgehog Downstream of Klf2 Improves Critical Limb Ischemia in Adults. *Circulation Research* 123, 1053–1065.
- Cardoso, F.L., Brites, D., and Brito, M.A. (2010). Looking at the blood–brain barrier: Molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Research Reviews* 64, 328–363.
- Carrano, A., Hoozemans, J.J.M., van der Vies, S.M., Rozemuller, A.J.M., van Horsen, J., and de Vries, H.E. (2011). Amyloid Beta Induces Oxidative Stress-Mediated Blood–Brain Barrier Changes in Capillary Amyloid Angiopathy. *Antioxidants & Redox Signaling* 15, 1167–1178.
- Carvey, P.M., Hendey, B., and Monahan, A.J. (2009). The blood–brain barrier in neurodegenerative disease: a rhetorical perspective. *Journal of Neurochemistry* 111, 291–314.
- Casillas, C., and Roelink, H. (2018). Gain-of-function Shh mutants activate Smo cell-autonomously independent of Ptch1/2 function. *Mechanisms of Development* 153, 30–41.

- Chapouly, C., Yao, Q., Vandierdonck, S., Larrieu-Lahargue, F., Mariani, J.N., Gadeau, A.-P., and Renault, M.-A. (2016). Impaired Hedgehog signalling-induced endothelial dysfunction is sufficient to induce neuropathy: implication in diabetes. *Cardiovasc. Res.* *109*, 217–227.
- Chechneva, O.V., Mayrhofer, F., Daugherty, D.J., Krishnamurty, R.G., Bannerman, P., Pleasure, D.E., and Deng, W. (2014). A Smoothed receptor agonist is neuroprotective and promotes regeneration after ischemic brain injury. *Cell Death Dis* *5*, e1481.
- Checler, F. (1995). Processing of the β -Amyloid Precursor Protein and Its Regulation in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry* *65*, 1431–1444.
- Chen, J.K., Taipale, J., Cooper, M.K., and Beachy, P.A. (2002). Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev* *16*, 2743–2748.
- Chen, M.-H., Wilson, C.W., Li, Y.-J., Law, K.K.L., Lu, C.-S., Gacayan, R., Zhang, X., Hui, C., and Chuang, P.-T. (2009). Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev* *23*, 1910–1928.
- Chinchilla, P., Xiao, L., Kazanietz, M.G., and Riobo, N.A. (2010). Hedgehog proteins activate pro-angiogenic responses in endothelial cells through non-canonical signaling pathways. *Cell Cycle* *9*, 570–579.
- Chistiakov, D.A., Orekhov, A.N., and Bobryshev, Y.V. (2015). Endothelial Barrier and Its Abnormalities in Cardiovascular Disease. *Front Physiol* *6*.
- Conway, D.E., and Schwartz, M.A. (2014). Mechanotransduction of shear stress occurs through changes in VE-cadherin and PECAM-1 tension: Implications for cell migration. *Cell Adh Migr* *9*, 335–339.
- Cristofaro, B., and Emanuelli, C. (2009). Possible novel targets for therapeutic angiogenesis. *Curr Opin Pharmacol* *9*, 102–108.
- Cui, D., Chen, X., Yin, J., Wang, W., Lou, M., and Gu, S. (2012). Aberrant activation of Hedgehog/Gli1 pathway on angiogenesis in gliomas. *Neurol India* *60*, 589–596.
- Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C.J., and Barres, B.A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 641–646.
- Debette, S., and Markus, H.S. (2010). The clinical importance of white matter hyperintensities on brain magnetic resonance imaging: systematic review and meta-analysis. *BMJ* *341*, c3666.
- Dichgans, M., Mayer, M., Uttner, I., Brüning, R., Müller-Höcker, J., Rungger, G., Ebke, M., Klockgether, T., and Gasser, T. (1998). The phenotypic spectrum of CADASIL: clinical findings in 102 cases. *Ann. Neurol.* *44*, 731–739.

- Dickson, D.W. (1997). The Pathogenesis of Senile Plaques. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 321–339.
- Dubois, B., Feldman, H.H., Jacova, C., DeKosky, S.T., Barberger-Gateau, P., Cummings, J., Delacourte, A., Galasko, D., Gauthier, S., Jicha, G., et al. (2007). Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS–ADRDA criteria. *The Lancet Neurology* 6, 734–746.
- Dunaeva, M., and Waltenberger, J. (2017). Hh signaling in regeneration of the ischemic heart. *Cell. Mol. Life Sci.* 74, 3481–3490.
- Ebnet, K. (2017). Junctional Adhesion Molecules (JAMs): Cell Adhesion Receptors With Pleiotropic Functions in Cell Physiology and Development. *Physiological Reviews* 97, 1529–1554.
- Esiri, M.M., Nagy, Z., Smith, M.Z., Barnettson, L., and Smith, A.D. (1999). Cerebrovascular disease and threshold for dementia in the early stages of Alzheimer's disease. *Lancet* 354, 919–920.
- Esser, S., Lampugnani, M.G., Corada, M., Dejana, E., and Risau, W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J. Cell. Sci.* 111 (Pt 13), 1853–1865.
- Fagan, A.M., Roe, C.M., Xiong, C., Mintun, M.A., Morris, J.C., and Holtzman, D.M. (2007). Cerebrospinal Fluid tau/ β -Amyloid42 Ratio as a Prediction of Cognitive Decline in Nondemented Older Adults. *Arch Neurol* 64, 343–349.
- Fang, X., Zhong, X., Yu, G., Shao, S., and Yang, Q. (2017). Vascular protective effects of KLF2 on A β -induced toxicity: Implications for Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1663, 174–183.
- Fenstermacher, J., Gross, P., Sposito, N., Acuff, V., Pettersen, S., and Gruber, K. (1988). Structural and Functional Variations in Capillary Systems within the Brain. *Annals of the New York Academy of Sciences* 529, 21–30.
- Ferent, J., Zimmer, C., Durbec, P., Ruat, M., and Traiffort, E. (2013). Sonic Hedgehog Signaling Is a Positive Oligodendrocyte Regulator during Demyelination. *J. Neurosci.* 33, 1759–1772.
- Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373–376.
- Furuse, M. (2010). Molecular Basis of the Core Structure of Tight Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.
- Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* 8, 1223–1234.
- Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2008). VE-cadherin and claudin-5: it takes two to tango. *Nat Cell Biol* 10, 883–885.

Geng, L., Cuneo, K.C., Cooper, M.K., Wang, H., Sekhar, K., Fu, A., and Hallahan, D.E. (2007). Hedgehog signaling in the murine melanoma microenvironment. *Angiogenesis* 10, 259–267.

Goldmann, E.E. (Edwin E. (1913). *Vitalfärbung am Zentralnervensystem : Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexus chorioideus und der Hirnhäute* (Berlin: Königl. Akademie der Wissenschaften).

Gordon, G.R.J., Howarth, C., and MacVicar, B.A. (2011). Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. *Experimental Physiology* 96, 393–399.

Gorelick Philip B., Furie Karen L., Iadecola Costantino, Smith Eric E., Waddy Salina P., Lloyd-Jones Donald M., Bae Hee-Joon, Bauman Mary Ann, Dichgans Martin, Duncan Pamela W., et al. (2017). Defining Optimal Brain Health in Adults: A Presidential Advisory From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 48, e284–e303.

Gupta, R., Mackie, A.R., Misener, S., Liu, L., Losordo, D.W., and Kishore, R. (2018). Endothelial Smoothed-muscle-dependent Hedgehog Signaling is Not Required for Sonic Hedgehog Induced Angiogenesis or Ischemic Tissue Repair. *Lab Invest* 98, 682–691.

Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 297, 353–356.

Hardy, J., Duff, K., Hardy, K.G., Perez-Tur, J., and Hutton, M. (1998). Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat. Neurosci.* 1, 355–358.

Hattori, Y., Enmi, J., Iguchi, S., Saito, S., Yamamoto, Y., Tsuji, M., Nagatsuka, K., Kalaria, R.N., Iida, H., and Ihara, M. (2016). Gradual Carotid Artery Stenosis in Mice Closely Replicates Hypoperfusive Vascular Dementia in Humans. *J Am Heart Assoc* 5.

Hawkins, R.A., O'Kane, R.L., Simpson, I.A., and Viña, J.R. (2006). Structure of the Blood–Brain Barrier and Its Role in the Transport of Amino Acids. *J Nutr* 136, 218S–226S.

He, L., Vanlandewijck, M., Mäe, M.A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., et al. (2018). Single-cell RNA sequencing of mouse brain and lung vascular and vessel-associated cell types. *Scientific Data* 5, 180160.

Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., and Betsholtz, C. (2001). Lack of Pericytes Leads to Endothelial Hyperplasia and Abnormal Vascular Morphogenesis. *J Cell Biol* 153, 543–554.

Hilal, S., Sikking, E., Shaik, M.A., Chan, Q.L., van Veluw, S.J., Vrooman, H., Cheng, C.-Y., Sabanayagam, C., Cheung, C.Y., Wong, T.Y., et al. (2016). Cortical cerebral microinfarcts on 3T MRI: A novel marker of cerebrovascular disease. *Neurology* 87, 1583–1590.

Hofman, A., Ott, A., Breteler, M.M., Bots, M.L., Slooter, A.J., van Harskamp, F., van Duijn, C.N., Van Broeckhoven, C., and Grobbee, D.E. (1997). Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 349, 151–154.

Hornig, S., Therattil, A., Moyon, S., Gordon, A., Kim, K., Argaw, A.T., Hara, Y., Mariani, J.N., Sawai, S., Flodby, P., et al. (2017). Astrocytic tight junctions control inflammatory CNS lesion pathogenesis. *J Clin Invest* 127, 3136–3151.

Incardona, J.P., Gaffield, W., Kapur, R.P., and Roelink, H. (1998). The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits sonic hedgehog signal transduction. *Development* 125, 3553–3562.

Ivan, C.S., Seshadri, S., Beiser, A., Au, R., Kase, C.S., Kelly-Hayes, M., and Wolf, P.A. (2004). Dementia after stroke: the Framingham Study. *Stroke* 35, 1264–1268.

Jaeger, L.B., Dohgu, S., Hwang, M.C., Farr, S.A., Murphy, M.P., Fleegal-DeMotta, M.A., Lynch, J.L., Robinson, S.M., Niehoff, M.L., Johnson, S.N., et al. (2009). Testing the Neurovascular Hypothesis of Alzheimer's Disease: LRP-1 Antisense Reduces Blood-brain Barrier Clearance, Increases Brain Levels of Amyloid- β Protein, and Impairs Cognition. *Journal of Alzheimer's Disease* 17, 553–570.

Jiang, X., Andjelkovic, A.V., Zhu, L., Yang, T., Bennett, M.V.L., Chen, J., Keep, R.F., and Shi, Y. (2018). Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Progress in Neurobiology* 163–164, 144–171.

Jones, R.S., Minogue, A.M., Connor, T.J., and Lynch, M.A. (2013). Amyloid- β -induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol* 8, 301–311.

Joutel, A., Corpechot, C., Ducros, A., Vahedi, K., Chabriat, H., Mouton, P., Alamowitch, S., Domenga, V., Cécillion, M., Marechal, E., et al. (1996). Notch3 mutations in CADASIL, a hereditary adult-onset condition causing stroke and dementia. *Nature* 383, 707–710.

Kedzierski, R.M., and Yanagisawa, M. (2001). Endothelin System: The Double-Edged Sword in Health and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41, 851–876.

Kim, K.-A., Kim, D., Kim, J.-H., Shin, Y.-J., Kim, E.-S., Akram, M., Kim, E.-H., Majid, A., Baek, S.-H., and Bae, O.-N. (2020). Autophagy-mediated occludin degradation contributes to blood–brain barrier disruption during ischemia in bEnd.3 brain endothelial cells and rat ischemic stroke models. *Fluids and Barriers of the CNS* 17, 21.

Kim, Y.S., Choi, D.H., Block, M.L., Lorenzl, S., Yang, L., Kim, Y.J., Sugama, S., Cho, B.P., Hwang, O., Browne, S.E., et al. (2007). A pivotal role of matrix metalloproteinase-3 activity in dopaminergic neuronal degeneration via microglial activation. *FASEB J.* 21, 179–187.

Kolominsky-Rabas, P.L., Weber, M., Gefeller, O., Neundoerfer, B., and Heuschmann, P.U. (2001). Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria:

incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke* 32, 2735–2740.

Konstantoulaki, M., Kouklis, P., and Malik, A.B. (2003). Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and β -catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 285, L434–L442.

Kuhnke, D., Jedlitschky, G., Grube, M., Krohn, M., Jucker, M., Mosyagin, I., Cascorbi, I., Walker, L.C., Kroemer, H.K., Warzok, R.W., et al. (2007). MDR1-P-Glycoprotein (ABCB1) Mediates Transport of Alzheimer's Amyloid- β Peptides—Implications for the Mechanisms of A β Clearance at the Blood–Brain Barrier. *Brain Pathology* 17, 347–353.

Kuroda, H., Kurio, N., Shimo, T., Matsumoto, K., Masui, M., Takabatake, K., Okui, T., Ibaragi, S., Kunisada, Y., Obata, K., et al. (2017). Oral Squamous Cell Carcinoma-derived Sonic Hedgehog Promotes Angiogenesis. *Anticancer Res.* 37, 6731–6737.

Kusano, K.F., Pola, R., Murayama, T., Curry, C., Kawamoto, A., Iwakura, A., Shintani, S., Ii, M., Asai, J., Tkebuchava, T., et al. (2005). Sonic hedgehog myocardial gene therapy: tissue repair through transient reconstitution of embryonic signaling. *Nat. Med.* 11, 1197–1204.

de Leeuw, F.E., de Groot, J.C., Achten, E., Oudkerk, M., Ramos, L.M., Heijboer, R., Hofman, A., Jolles, J., van Gijn, J., and Breteler, M.M. (2001). Prevalence of cerebral white matter lesions in elderly people: a population based magnetic resonance imaging study. The Rotterdam Scan Study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 70, 9–14.

Li, H., Gao, A., Feng, D., Wang, Y., Zhang, L., Cui, Y., Li, B., Wang, Z., and Chen, G. (2014). Evaluation of the protective potential of brain microvascular endothelial cell autophagy on blood-brain barrier integrity during experimental cerebral ischemia-reperfusion injury. *Transl Stroke Res* 5, 618–626.

Liao, J.K. (2013). Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J Clin Invest* 123, 540–541.

Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C.J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., et al. (2008). Wnt/ β -catenin signaling controls development of the blood–brain barrier. *J Cell Biol* 183, 409–417.

Mille, F., Thibert, C., Fombonne, J., Rama, N., Guix, C., Hayashi, H., Corset, V., Reed, J.C., and Mehlen, P. (2009). The Patched dependence receptor triggers apoptosis through a DRAL-caspase-9 complex. *Nat Cell Biol* 11, 739–746.

Miller, L.-A.D., Wert, S.E., Clark, J.C., Xu, Y., Perl, A.-K.T., and Whitsett, J.A. (2004). Role of Sonic hedgehog in patterning of tracheal-bronchial cartilage and the peripheral lung. *Dev. Dyn.* 231, 57–71.

Montagne, A., Barnes, S.R., Sweeney, M.D., Halliday, M.R., Sagare, A.P., Zhao, Z., Toga, A.W., Jacobs, R.E., Liu, C.Y., Amezcua, L., et al. (2015). Blood-Brain Barrier Breakdown in the Aging Human Hippocampus. *Neuron* 85, 296–302.

Montaner, J., Molina, C.A., Monasterio, J., Abilleira, S., Arenillas, J.F., Ribó, M., Quintana, M., and Alvarez-Sabín, J. (2003). Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 107, 598–603.

Nachtergaele, S., Whalen, D.M., Mydock, L.K., Zhao, Z., Malinauskas, T., Krishnan, K., Ingham, P.W., Covey, D.F., Siebold, C., and Rohatgi, R. (2013). Structure and function of the Smoothed extracellular domain in vertebrate Hedgehog signaling. *ELife* 2, e01340.

Nelson, A.R., Sweeney, M.D., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2016). Neurovascular dysfunction and neurodegeneration in dementia and Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1862, 887–900.

Neuhaus, J., Risau, W., and Wolburg, H. (1991). Induction of Blood-Brain Barrier Characteristics in Bovine Brain Endothelial Cells by Rat Astroglial Cells in Transfilter Coculture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 633, 578–580.

Ogunshola, O.O., and Antoniou, X. (2009). Contribution of hypoxia to Alzheimer's disease: is HIF-1alpha a mediator of neurodegeneration? *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3555–3563.

Oldendorf, W.H., Cornford, M.E., and Brown, W.J. (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.* 1, 409–417.

Orlova, V.V., Economopoulou, M., Lupu, F., Santoso, S., and Chavakis, T. (2006). Junctional adhesion molecule-C regulates vascular endothelial permeability by modulating VE-cadherin-mediated cell-cell contacts. *J. Exp. Med.* 203, 2703–2714.

Ozaki, M., Kawashima, S., Hirase, T., Yamashita, T., Namiki, M., Inoue, N., Hirata Ki, K., and Yokoyama, M. (2002). Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Am. J. Pathol.* 160, 1335–1344.

Palmer, R.M.J., Ashton, D.S., and Moncada, S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333, 664–666.

Panman, L., and Zeller, R. (2003). Patterning the limb before and after SHH signalling. *Journal of Anatomy* 202, 3–12.

Pantoni, L. (2010). Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet Neurology* 9, 689–701.

Pathi, S., Pagan-Westphal, S., Baker, D.P., Garber, E.A., Rayhorn, P., Bumcrot, D., Tabin, C.J., Blake Pepinsky, R., and Williams, K.P. (2001). Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mechanisms of Development* 106, 107–117.

Pepinsky, R.B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D.P., Williams, K.P., Bixler, S.A., Ambrose, C.M., Garber, E.A., Miatkowski, K., et al. (1998). Identification of a

palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273, 14037–14045.

Petersen, M.A., Ryu, J.K., and Akassoglou, K. (2018). Fibrinogen in neurological diseases: mechanisms, imaging and therapeutics. *Nat Rev Neurosci* 19, 283–301.

Pettigrew, C.A., Asp, E., and Emerson, C.P. (2014). A new role for Hedgehogs in juxtacrine signaling. *Mech Dev* 131, 137–149.

Pola, R., Ling, L.E., Silver, M., Corbley, M.J., Kearney, M., Pepinsky, R.B., Shapiro, R., Taylor, F.R., Baker, D.P., Asahara, T., et al. (2001). The morphogen Sonic hedgehog is an indirect angiogenic agent upregulating two families of angiogenic growth factors. *Nature Medicine* 7, 706–711.

Pola Roberto, Ling Leona E., Aprahamian Tamar R., Barban Elena, Bosch-Marce Marta, Curry Cynthia, Corbley Michael, Kearney Marianne, Isner Jeffrey M., and Losordo Douglas W. (2003). Postnatal Recapitulation of Embryonic Hedgehog Pathway in Response to Skeletal Muscle Ischemia. *Circulation* 108, 479–485.

Polizio, A.H., Chinchilla, P., Chen, X., Kim, S., Manning, D.R., and Riobo, N.A. (2011). Heterotrimeric Gi proteins link Hedgehog signaling to activation of Rho small GTPases to promote fibroblast migration. *J. Biol. Chem.* 286, 19589–19596.

Porter, J.A., Young, K.E., and Beachy, P.A. (1996). Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science* 274, 255–259.

Preston, J.E., Joan Abbott, N., and Begley, D.J. (2014). Transcytosis of macromolecules at the blood-brain barrier. *Adv. Pharmacol.* 71, 147–163.

Prince, M.J. (2015). World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia.

Prince, M., Jackson, M.J., Ferri, D.C.P., Sousa, R., Albanese, D.E., Ribeiro, M.W.S., Honyashiki, D.M., Acosta, D., Blom, M., Dudgeon, S., et al. World Alzheimer Report 2009. 96.

Raleigh, D.R., Sever, N., Choksi, P.K., Sigg, M.A., Hines, K.M., Thompson, B.M., Elnatan, D., Jaishankar, P., Bisignano, P., Garcia-Gonzalo, F.R., et al. (2018). Cilia-associated oxysterols activate Smoothed. *Mol Cell* 72, 316-327.e5.

Rapoport, R.M., and Murad, F. (1983). Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ. Res.* 52, 352–357.

Rasmussen, M.K., Mestre, H., and Nedergaard, M. (2018). The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol* 17, 1016–1024.

Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). FINE STRUCTURAL LOCALIZATION OF A BLOOD-BRAIN BARRIER TO EXOGENOUS PEROXIDASE. *J Cell Biol* 34, 207–217.

Renault, M.-A., Chapouly, C., Yao, Q., Larrieu-Lahargue, F., Vandierdonck, S., Reynaud, A., Petit, M., Jaspard-Vinassa, B., Belloc, I., Traiffort, E., et al. (2013).

Desert hedgehog promotes ischemia-induced angiogenesis by ensuring peripheral nerve survival. *Circ. Res.* 112, 762–770.

Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., and Tsukita, S. (1997). Possible Involvement of Phosphorylation of Occludin in Tight Junction Formation. *J Cell Biol* 137, 1393–1401.

Sánchez-Camacho, C., and Bovolenta, P. (2009). Emerging mechanisms in morphogen-mediated axon guidance. *Bioessays* 31, 1013–1025.

Schoch, H.J., Fischer, S., and Marti, H.H. (2002). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain* 125, 2549–2557.

Selkoe, D.J. (2001). Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiological Reviews* 81, 741–766.

Sengillo, J.D., Winkler, E.A., Walker, C.T., Sullivan, J.S., Johnson, M., and Zlokovic, B.V. (2013). Deficiency in Mural Vascular Cells Coincides with Blood–Brain Barrier Disruption in Alzheimer's Disease. *Brain Pathology* 23, 303–310.

Sharp, C.D., Hines, I., Houghton, J., Warren, A., Jackson, T.H., Jawahar, A., Nanda, A., Elrod, J.W., Long, A., Chi, A., et al. (2003). Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H2592-2598.

Sharpe, H.J., Wang, W., Hannoush, R.N., and de Sauvage, F.J. (2015). Regulation of the oncoprotein Smoothed by small molecules. *Nat Chem Biol* 11, 246–255.

Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., et al. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid- β_{1-40} peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 106, 1489–1499.

Singh, V.B., Singh, M.V., Gorantla, S., Poluektova, L.Y., and Maggirwar, S.B. (2016). Smoothed Agonist Reduces Human Immunodeficiency Virus Type-1-Induced Blood-Brain Barrier Breakdown in Humanized Mice. *Sci Rep* 6.

Skoog, I., Lernfelt, B., Landahl, S., Palmertz, B., Andreasson, L.A., Nilsson, L., Persson, G., Odén, A., and Svanborg, A. (1996). 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia. *Lancet* 347, 1141–1145.

Soleti, R., Benameur, T., Porro, C., Panaro, M.A., Andriantsitohaina, R., and Martínez, M.C. (2009). Microparticles harboring Sonic Hedgehog promote angiogenesis through the upregulation of adhesion proteins and proangiogenic factors. *Carcinogenesis* 30, 580–588.

Stanton, B.Z., Peng, L.F., Maloof, N., Nakai, K., Wang, X., Herlihy, K.M., Duffner, J.L., Taveras, K.M., Hyman, J.M., Lee, S.W., et al. (2009). A small molecule that binds Hedgehog and blocks its signaling in human cells. *Nat Chem Biol* 5, 154–156.

- Takechi, R., Lam, V., Brook, E., Giles, C., Fimognari, N., Mooranian, A., Al-Salami, H., Coulson, S.H., Nesbit, M., and Mamo, J.C.L. (2017). Blood-Brain Barrier Dysfunction Precedes Cognitive Decline and Neurodegeneration in Diabetic Insulin Resistant Mouse Model: An Implication for Causal Link. *Front Aging Neurosci* 9.
- Tanaka, Y., Okada, Y., and Hirokawa, N. (2005). FGF-induced vesicular release of Sonic hedgehog and retinoic acid in leftward nodal flow is critical for left-right determination. *Nature* 435, 172–177.
- Thibert, C., Teillet, M.-A., Lapointe, F., Mazelin, L., Douarin, N.M.L., and Mehlen, P. (2003). Inhibition of Neuroepithelial Patched-Induced Apoptosis by Sonic Hedgehog. *Science* 301, 843–846.
- Torre, J.C. de la (2004). Is Alzheimer's disease a neurodegenerative or a vascular disorder? Data, dogma, and dialectics. *The Lancet Neurology* 3, 184–190.
- de la Torre, J.C. (2000). Critically attained threshold of cerebral hypoperfusion: the CATCH hypothesis of Alzheimer's pathogenesis. *Neurobiol. Aging* 21, 331–342.
- Torroja, C., Gorfinkiel, N., and Guerrero, I. (2004). Patched controls the Hedgehog gradient by endocytosis in a dynamin-dependent manner, but this internalization does not play a major role in signal transduction. *Development* 131, 2395–2408.
- Tran, K.A., Zhang, X., Predescu, D., Huang, X., Machado, R.F., Göthert, J.R., Malik, A.B., Valyi-Nagy, T., and Zhao, Y.-Y. (2016). Endothelial β -Catenin Signaling Is Required for Maintaining Adult Blood-Brain Barrier Integrity and CNS Homeostasis. *Circulation* 133, 177–186.
- Uldry, M., and Thorens, B. (2004). The SLC2 family of facilitated hexose and polyol transporters. *Pflugers Arch.* 447, 480–489.
- Vaillant, C., and Monard, D. (2009). SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum* 8, 291–301.
- Vangeison, G., and Rempe, D.A. (2009). The Janus-faced effects of hypoxia on astrocyte function. *Neuroscientist* 15, 579–588.
- Vanlandewijck, M., He, L., Mäe, M.A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., et al. (2018). A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature* 554, 475–480.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D.W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics* 3, 281–290.
- Vestweber, D. (2012). Relevance of endothelial junctions in leukocyte extravasation and vascular permeability. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257, 184–192.
- Vogel, C., Bauer, A., Wiesnet, M., Preissner, K.T., Schaper, W., Marti, H.H., and Fischer, S. (2007). Flt-1, but not Flk-1 mediates hyperpermeability through activation of the PI3-K/Akt pathway. *J. Cell. Physiol.* 212, 236–243.

- Vokes, S.A., Yatskievych, T.A., Heimark, R.L., McMahon, J., McMahon, A.P., Antin, P.B., and Krieg, P.A. (2004). Hedgehog signaling is essential for endothelial tube formation during vasculogenesis. *Development* 131, 4371–4380.
- Wang, Y., Rattner, A., Zhou, Y., Williams, J., Smallwood, P.M., and Nathans, J. (2012). Norrin/Frizzled4 signaling in retinal vascular development and blood brain barrier plasticity. *Cell* 151, 1332–1344.
- Wang, Y., Lu, P., Zhao, D., and Sheng, J. (2017). Targeting the hedgehog signaling pathway for cardiac repair and regeneration. *Herz* 42, 662–668.
- Wardlaw, J.M., Valdés Hernández, M.C., and Muñoz-Maniega, S. (2015). What are white matter hyperintensities made of? Relevance to vascular cognitive impairment. *J Am Heart Assoc* 4, 001140.
- Weidenfeller, C., Svendsen, C.N., and Shusta, E.V. (2007). Differentiating Embryonic Neural Progenitor Cells Induce Blood-Brain Barrier Properties. *J Neurochem* 101, 555–565.
- Wen, W., Sachdev, P.S., Li, J.J., Chen, X., and Anstey, K.J. (2009). White matter hyperintensities in the forties: their prevalence and topography in an epidemiological sample aged 44-48. *Hum Brain Mapp* 30, 1155–1167.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Fallier-Becker, P., Noell, S., and Mack, A.F. (2011). Chapter one - Structure and Functions of Aquaporin-4-Based Orthogonal Arrays of Particles. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, K.W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 1–41.
- Woodruff, T.M., Thundyil, J., Tang, S.-C., Sobey, C.G., Taylor, S.M., and Arumugam, T.V. (2011). Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke. *Mol Neurodegener* 6, 11.
- Wosik, K., Cayrol, R., Dodelet-Devillers, A., Berthelet, F., Bernard, M., Moundjian, R., Bouthillier, A., Reudelhuber, T.L., and Prat, A. (2007). Angiotensin II Controls Occludin Function and Is Required for Blood–Brain Barrier Maintenance: Relevance to Multiple Sclerosis. *J Neurosci* 27, 9032–9042.
- Yang, Y., Estrada, E.Y., Thompson, J.F., Liu, W., and Rosenberg, G.A. (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 697–709.
- Ye, X., Wang, Y., Cahill, H., Yu, M., Badea, T.C., Smallwood, P.M., Peachey, N.S., and Nathans, J. (2009). Norrin, frizzled-4, and Lrp5 signaling in endothelial cells controls a genetic program for retinal vascularization. *Cell* 139, 285–298.
- Zhou, Y., and Nathans, J. (2014). Gpr124 controls CNS angiogenesis and blood-brain barrier integrity by promoting ligand-specific canonical wnt signaling. *Dev. Cell* 31, 248–256.

Résumé

LA SIGNALISATION HEDGEHOG DANS LE MAINTIEN DE LA BARRIÈRE HEMATO-ENCEPHALIQUE ET LA PHYSIOPATHOLOGIE DES TROUBLES NEURODEGENERATIFS

Les maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la sclérose en plaques, sont des maladies chroniques progressives touchant le système nerveux central. La barrière hémato-encéphalique (BHE) joue un rôle critique dans la physiologie du système nerveux central et, de ce fait, sa perturbation participe à la pathogénèse des maladies neurodégénératives. Du fait de l'implication de la voie de signalisation Hedgehog (Hh) dans la régulation de la BHE, et de l'existence de résultats contradictoires dans la littérature, l'objectif de cette thèse est de revoir les mécanismes mis en jeu dans la régulation de l'intégrité de la BHE par les ligands de la voie Hh dans des conditions physiologiques et pathologiques (sclérose en plaque et maladie d'Alzheimer) chez l'adulte.

Nous avons montré que Desert Hedgehog (Dhh), exprimé par les cellules endothéliales (CE), est nécessaire au maintien de l'intégrité de la BHE. De plus, nous avons montré que la perte de Dhh dans les CE et l'ouverture de la BHE qui s'ensuit suffisent à induire l'apparition de troubles cognitifs. De plus, nos résultats suggèrent que l'expression endothéliale de Dhh est réduite dans la maladie d'Alzheimer et la sclérose en plaques.

Par ailleurs nous avons montré que dans la sclérose en plaque, une induction de l'expression de Sonic Hedgehog (Shh) dans les astrocytes participe à l'ouverture de la BHE. Ces résultats et d'autres nous ont finalement permis de montrer qu'en fonction de leur forme, les ligands de la voie Hh agissent différemment sur la BHE.

Dans l'ensemble, ces résultats renforcent l'idée déjà existante que la voie de signalisation Hh constitue une cible d'intérêt dans la thérapeutique des maladies neurodégénératives, et apportent de nouvelles informations à prendre en compte dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques.

Mots-clefs : Signalisation Hedgehog, barrière hémato-encéphalique, démence, sclérose en plaques, vaisseaux sanguins, cellules endothéliales

HEDGEHOG SIGNALLING IN THE MAINTENANCE OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER AND IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF NEURODEGENERATIVE DISEASES

Neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or Multiple Sclerosis are characterized by a progressive degeneration of the central or peripheral nervous system. The blood-brain barrier (BBB) plays a critical role in the pathophysiology of the central nervous system, and its disruption contributes to the pathogenesis of neurodegenerative disease. Since Hedgehog (Hh) signalling is implicated in the maintenance of the BBB, and since discrepancies exist in the literature, the objective of this PhD's thesis is to clarify the mechanisms underlying Hh ligands-dependent regulation of the BBB, in physiological and pathological (multiple sclerosis and Alzheimer's) conditions, in the adult.

We showed that Desert Hedgehog (Dhh) is expressed in endothelial cells (ECs), and is necessary to stabilize the BBB. Moreover, we showed that the deletion of Dhh in ECs, and the consequential opening of the BBB are sufficient to trigger the apparition of cognitive disorders. Our results also suggest that Dhh in ECs is downregulated in Alzheimer's and multiple sclerosis.

We also showed that in multiple sclerosis, Sonic Hedgehog (Shh) is induced in astrocytes and contributes to the opening of the BBB. Those results and other finally led us to demonstrate that depending on their post-translational maturation, Hh ligands have distinct effects on the BBB.

Taken together, those results strengthen the hypothesis of using Hh signalling as a therapeutic target in the treatment of neurodegenerative diseases, and unveil new insights to consider when it comes to conceiving such therapeutical strategies.

Keywords : Hedgehog Signalling, blood-brain barrier, dementia, multiple sclerosis, blood vessels, endothelial cells

INSERM U1034 – Biologie des maladies cardiovasculaires

1, avenue de Magellan, 33600 Pessac, France