

Aix Marseille Université - Faculté de Médecine

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE

Sciences de la Vie et de la Santé (ED 62)

Spécialité Neurosciences

Présenté par

**Yves Molino**

Mise en place de modèles *in vitro* de barrière hémato-encéphalique  
et étude du transfert transendothélial de vecteurs et conjugués  
ciblant le récepteur au LDL

Soutenue le 18 décembre 2015

Composition du jury :

Rapporteurs :

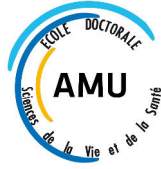
**Pr. Roméo Cecchelli** Université d'Artois, Lens

**Dr. Klaus Petry** Université de Bordeaux

Examineurs :

**Pr. Jean-Louis Mege** Aix Marseille Université (Président du Jury)

**Dr. Michel Khrestchatisky** Aix Marseille Université (Directeur de la thèse)



Aix Marseille Université, CNRS, UMR 7259, Neurobiologie des  
Interactions Cellulaires et Neurophysiopathologie (NICN),  
Faculté de Médecine Nord  
51, Bd Pierre Dramard, 13344, Marseille Cedex 15, France



Vect-Horus SAS,  
Faculté de Médecine Nord,  
51, Bd Pierre Dramard, 13344, Marseille Cedex 15, France

A ma famille, mes parents, ma fille - Laura

Papa, merci de m'avoir inculqué très tôt qu'avec le travail, tout paye un jour, tôt ou tard,  
alors persévère...

&

« Plus nous sentons le besoin d'agir, plus nous devons nous efforcer à la réflexion. Plus nous sommes tentés par le confort de la méditation, plus nous devons nous lancer dans l'action. »

Un exemple de dissonance cognitive d'Albert Jacquard (1925-2013)

&

## Remerciements

Réaliser une thèse au sein de la société VECT-HORUS et du laboratoire NICN a été une aventure humaine au delà de mes attentes. Pour cela, je tiens à remercier

### **Messieurs Le Pr. Roméo Cecchelli et le Dr. Klaus Petry,**

Je suis honoré de votre présence dans le jury et je vous exprime toute ma gratitude d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie pour les commentaires et corrections qui aideront à améliorer ce manuscrit et les articles scientifiques à venir.

### **Monsieur le Pr. Jean-Louis Mège,**

Je vous remercie d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail et Président du Jury, et de votre soutien en tant que Directeur de l'école Doctorale.

### **Monsieur le Dr. Michel Khrestchatisky,**

Michel, je tiens à t'exprimer toute ma reconnaissance. Puisse-tu trouver dans ce travail le témoignage de mon respect qui reflète la confiance que tu as bien voulu, un jour m'accorder. Ce travail représente une continuité de mon activité au sein de VECT-HORUS.

### **Madame Françoise Jabès,**

Françoise, ta constance et ta joie de vivre force le respect. C'est une réelle chance de pouvoir travailler avec toi au quotidien.

### **Monsieur le Président de la société VECT-HORUS, Alexandre Tokay,**

Je vous remercie pour tous vos efforts investis dans le développement de VECT-HORUS. L'argent est le nerf de la « science », pour cela je tiens à vous remercier d'avoir assuré et d'assurer encore aujourd'hui un apport fondamental à la réalisation des projets scientifiques.

**Tous les membres de l'équipe VECT-HORUS**, des plus anciens aux plus récents, merci pour les échanges et le partage des connaissances, certainement la base de la réussite d'une équipe, et tout le reste ! qui représente au delà de « la science » un moment de vie ensemble.

**Les membres du laboratoire NICN** avec qui nous avons collaboré, notamment dans le cadre des projets ANR, MEDUL, TIMPAD, PREVENTAD, ADHOC, VECtoBrain et VEC2Brain.

## TABLE DES MATIERES

Contexte & Objectifs .....	13
Résumé global .....	15
Global abstract.....	16
Liste des publications internationales, communications affichées-orales et brevets.....	17
1. Posters .....	17
2. Tables rondes.....	17
3. Publications scientifiques.....	17
4. Brevets.....	18
<b>A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>19</b>
<b>CHAPITRE I : LE SNC ET SON ENDOTHELIUM, CONCEPT DE BARRIERE.....</b>	<b>20</b>
<b>I. La BHE : historique d'une découverte jusqu'à 15 ans avant nos jours .....</b>	<b>21</b>
<b>II. L'homéostasie cérébrale et la BHE.....</b>	<b>21</b>
<b>III. L'hétérogénéité de l'arbre vasculaire du SNC.....</b>	<b>22</b>
<b>A. Hétérogénéité au niveau des zones cérébrales .....</b>	<b>22</b>
1. Les organes circumventriculaires (OCV).....	22
2. La barrière hémato-liquidienne (BHL) .....	22
3. La barrière hémato-encéphalique (BHE) .....	22
<b>B. Hétérogénéité au niveau de l'architecture des vaisseaux.....</b>	<b>24</b>
<b>IV. Le concept d'unité neuro-glio-vasculaire (UNGV) .....</b>	<b>25</b>
<b>A. Les cellules endothéliales .....</b>	<b>27</b>
<b>B. La membrane basale, impacts structurel et métabolique.....</b>	<b>27</b>
<b>C. Les péricytes, stabilisateurs de jonction serrées PDGF-B dépendantes.....</b>	<b>28</b>
<b>D. Les astrocytes, un lien majeur entre capillaires et neurones.....</b>	<b>29</b>
<b>E. Les neurones, rôles dans l'UNGV.....</b>	<b>31</b>
<b>V. La BHE, concept de barrière physique .....</b>	<b>32</b>
<b>A. Les protéines de jonctions intercellulaires endothéliales.....</b>	<b>32</b>
1. Les jonctions serrées.....	34
a) Les protéines transmembranaires.....	34
b) Les protéines intracytoplasmiques.....	35
2. Les jonctions adhérentes .....	35

3. Les vésicules transendothéliales limitantes .....	36
<b>VI. La BHE, concept de tri sélectif endothélial et neuroprotection .....</b>	<b>37</b>
<b>A. Les enzymes .....</b>	<b>37</b>
<b>B. Les pompes d'efflux : xénobiotiques et peptide <math>\beta</math> amyloid .....</b>	<b>38</b>
<b>CHAPITRE II : LE SNC ET SES BARRIERES, IMPACT DE L'INFLAMMATION .....</b>	<b>41</b>
<b>I. Activation de la microglie et invasion leucocytaire .....</b>	<b>42</b>
<b>A. Les cellules microgliales et les astrocytes .....</b>	<b>42</b>
<b>B. Protection et destruction locale : le recrutement leucocytaire .....</b>	<b>43</b>
<b>II. Les partenaires moléculaires de la neuroinflammation .....</b>	<b>43</b>
<b>A. Les Cytokines .....</b>	<b>43</b>
1. Cytokines pro-inflammatoires et transport à la BHE .....	44
a) IL-1 .....	44
b) IL-6 .....	44
c) TNF- $\alpha$ .....	45
(1) TNF- $\alpha$ : transport à travers la BHE via un processus RMT .....	45
(2) TNF- $\alpha$ : perte d'intégrité de la BHE et glucocorticoïdes protecteurs .....	45
(3) TNF- $\alpha$ : inducteur de transcytose à la BHE .....	46
(4) TNF- $\alpha$ : cible thérapeutique .....	46
2. IL-10: cytokine anti-inflammatoire .....	47
3. TGF- $\beta$ et NF- $\kappa$ B .....	47
a) La voie de signalisation TGF- $\beta$ .....	47
(1) Activité biologique et implication pathologique .....	47
(2) Mécanisme d'activation .....	47
(3) Le TGF- $\beta$ et la neuroprotection .....	49
(4) Le TGF- $\beta$ et la BHE .....	49
b) Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B .....	50
(1) Les activateurs .....	51
(2) Les mécanismes d'activation .....	51
c) TGF- $\beta$ : cible thérapeutique .....	52
<b>B. Les Chimiokines .....</b>	<b>53</b>
1. La sous famille CC .....	53
CCL-2 et son récepteur CCR-2 .....	53
2. La sous famille CXC .....	54
a) IL-8 (CXCL8) et son récepteur CXCR2 multiligand .....	55
3. Les 2 sous familles: C et CX3C .....	55
<b>C. La balance MMPs - TIMPs .....</b>	<b>56</b>

III. Hypoxie et ischémie cérébrale : exemple de cascade inflammatoire.....	58
CHAPITRE III : LA BHE ET L'INFLUX CEREBRAL NATUREL .....	60
I. La diffusion passive .....	62
II. La diffusion facilitée : transporteurs transcellulaires non vésiculaires.....	63
A. Le transport de l'eau et des ions .....	63
1. Le transport de l'eau .....	63
2. Le transport des ions.....	64
B. Le transport des acides aminés.....	65
C. Le transport des acides gras.....	66
1. Les acides gras essentiels .....	66
2. Rôle des AGPI au niveau du CNS : structure et métabolisme.....	66
3. Les transporteurs d'acides gras .....	68
D. Le transport du glucose .....	69
1. Le glucose, source énergétique cérébrale principale.....	69
2. Le couplage neuro-vasculaire : régulation de l'apport en glucose cérébral.....	69
3. Etat de repos et activation neuronale .....	70
4. Le glucose transporter-1 (GLUT-1).....	70
III. Les systèmes de trafic vésiculaires intracellulaires.....	71
A. Le glycocalix : impact sur l'AMT et le RMT .....	73
B. Les vésicules de clathrine .....	76
C. Les cavéoles et les radeaux lipidiques .....	78
IV. Les stratégies d'adressage cérébral basées sur le mécanisme de RMT .....	80
A. Le récepteur à l'insuline : IR.....	80
B. Le récepteur à la transferrine : TfR .....	81
C. Les récepteurs de la famille du LDLR .....	82
1. LDLR.....	84
2. LRP: sous-famille.....	87
D. Autres récepteurs impliqués dans des mécanismes de RMT à la BHE .....	88
1. Le récepteur à la leptine.....	88
2. Le récepteur nicotinique de l'acetylcholine.....	89
3. Le récepteur de la toxine diphtérique.....	89
4. Le récepteur de la glutathione.....	90
5. Le récepteur de la toxine tétanique.....	90
6. Le récepteur SR-BI.....	91



<b>B. RESULTATS</b> .....	<b>93</b>
<b>Article 1 (publié): Setting-up an <i>In vitro</i> Model of Rat Blood-brain Barrier (BBB): A Focus on BBB Impermeability and Receptor-Mediated Transport</b> .....	<b>94</b>
I. <b>Résumé</b> .....	<b>95</b>
II. <b>Article 1</b> .....	<b>96</b>
III. <b>Conclusion</b> .....	<b>115</b>
<b>Article 2 (publié): Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for delivery across the blood–brain barrier</b> .....	<b>116</b>
I. <b>Résumé</b> .....	<b>117</b>
II. <b>Article 2</b> .....	<b>118</b>
III. <b>Conclusion</b> .....	<b>133</b>
<b>Article 3 (soumis): The LDLR promotes transcytosis of LDL and peptide vectors developed for cargo delivery to the brain in an <i>in vitro</i> model of the blood-brain barrier</b> .....	<b>134</b>
I. <b>Résumé</b> .....	<b>135</b>
II. <b>Article 3</b> .....	<b>138</b>
III. <b>Conclusion</b> .....	<b>177</b>
<b>Article 4 (en préparation, rapport intermédiaire et perspectives) : Analyse comparative du transcriptome de cellules endothéliales microvasculaires des barrières hémato-encéphalique (BHE) et sang-moelle épinière (BSME) en situation inflammatoire</b> .....	<b>178</b>
I. <b>Contexte et Introduction</b> .....	<b>179</b>
II. <b>Résumé</b> .....	<b>182</b>
III. <b>Protocole expérimental</b> .....	<b>184</b>
<b>A. Extraction des ARN totaux</b> .....	<b>185</b>
<b>B. Analyse comparative des transcriptomes</b> .....	<b>186</b>
1. <i>Méthode du "fold change"</i> .....	<b>186</b>
2. <i>Protocole de RT-qPCR: sonde TaqMan</i> .....	<b>187</b>
3. <i>ELISAs</i> .....	<b>188</b>
4. <i>Western Blot</i> .....	<b>188</b>

<b>IV. Résultats.....</b>	<b>188</b>
<b>A. Analyse comparative des transcriptomes des CEMCs et CEMSs: état constitutif .....</b>	<b>188</b>
<b>B. Analyse comparative des transcriptomes des CEMCs et CEMSs enflammées.....</b>	<b>192</b>
1. <i>Les chémokines CCL-2 et IL-8 et la cytokine IL-6.....</i>	<i>192</i>
a) Analyse des données du transcriptome .....	192
b) Validation par RT-qPCR .....	193
c) Dosage ELISA: CCL-2 et IL-6 .....	195
2. <i>Analyse de l'intégrité des monocouches de CEMCs enflammées TNF-<math>\alpha</math>.....</i>	<i>196</i>
a) Quantification de la perméabilité au LY, Pe(LY).....	196
b) Analyse par Western Blot des taux d'occludine, de claudine-5 et de ZO-1.....	197
c) Observation par immunocytochimie de l'organisation des jonctions serrées .....	199
3. <i>Analyse des protéases et leur inhibiteurs.....</i>	<i>200</i>
a) Les MMPs.....	200
(1) Analyse des données du transcriptome.....	200
(2) Validation par RT-qPCR.....	203
b) Les Adamalysines et les TIMPs .....	204
(1) Analyse des données du transcriptome.....	204
(2) Validation par RT-qPCR.....	206
c) Analyse de l'expression protéique des MMPs et de l'activité enzymatique de MMP-9. ....	207
Western blot, gel zymographie et zymographie in situ (perspectives).....	207
<b>C. Traitement des CEMCs avec MMP-9, TNF-<math>\alpha</math> et inhibiteurs de protéases .....</b>	<b>207</b>
1. <i>Traitement des monocouches de CEMCs avec MMP-9.....</i>	<i>207</i>
2. <i>Traitement des monocouches de CEMCs avec TNF-<math>\alpha</math> et inhibiteurs de protéases.....</i>	<i>208</i>
a) Quantification de l'intégrité des barrières: mesure du Pe(LY) .....	209
b) Dosage ELISA CCL-2.....	210
<b>D. Les récepteurs impliqués dans le mécanisme de RMT .....</b>	<b>211</b>
<b>C. DISCUSSION GLOBALE &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>212</b>
<b>I. Les modèles <i>in vitro</i> de BHE et BSME.....</b>	<b>213</b>
<b>II. Les nanovecteurs : liposomes et nanoparticules .....</b>	<b>214</b>
<b>III. Le rôle du LDLR exprimé à la BHE et transport par RMT .....</b>	<b>215</b>
<b>IV. L'inflammation des barrières endothéliales du SNC.....</b>	<b>222</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>223</b>

## Abréviations

ABC	ATP binding cassette
ACM	astrocyte-conditioned medium
ADAM	A disintegrin and metalloproteinase
AMM	Autorisation de mise sur le marché
Apo	apolipoprotéine
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine tri-phosphate
BCRP	breast cancer resistance protein
b-FGF	basic fibroblast growth factor
BHE	barrière hémato-encéphalique
BHL	barrière hémato-liquidienne
BSA	bovine serum albumin
BSME	barrière sang-moelle épinière
CCL-2	CC chemokine ligand 2 (MCP-1)
CD	cluster of differentiation
CEMC	cellule endothéliale microvasculaire cérébrale
CEMS	cellule endothéliale microvasculaire spinale
CPP	cell penetrating peptide
DMSO	dimethyl sulfoxide
FACS	fluorescence activated cell sorting
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GLUT-1	glucose transporter 1
GMCSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
HBSS	hank's balanced salt solution
HDL	high density lipoprotein
HOX	homeobox
IgG	immunglobulin class G
IL	interleukine
IFN- $\gamma$	interferon- $\gamma$
kDa	kiloDalton
KO	knock out
LCR	liquide céphalo rachidien
LDL	low density lipoprotein

LDLR	low density lipoprotein receptor
LIF	leukaemia inhibitory factor
LRP	low density lipoprotein receptor related protein
LY	lucifer yellow
MET	microscopie électronique à transmission
MCP-1	monocyte chemoattractant protein 1
MDR	multi drug resistance associated protein
MMP	matrix metalloproteinase
MRP	multidrug resistance associated protein
MT1-MMP	membrane-type 1-MMP (ou MMP-14)
MW	molecular weight
NGF	nerve growth factor
PECAM	platelet cell adhesion molecule (CD31)
Pe <sub>(LY)</sub>	perméabilité de surface endothéliale du LY,
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor,
P-gp	phospho-glycoprotéine
R123	rhodamine 123
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SLC	solute carrier
SNC	système nerveux central
SD	standard deviation
TEER	transendothelial electric resistance
Tf	transferrine
TfR	récepteur à la Tf
TGF	transforming growth factor
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TJ	tight junctions
TNF	tumor necrosis factor
UNGV	unité neuro-glio-vasculaire
VEGF	vascular endothelial growth factor
vWF	von Willebrand factor,
ZO	zonula occludens

## Contexte & Objectifs

Les maladies du système nerveux central (SNC, cerveau et moelle épinière), dont la plupart sont directement liées à l'allongement de l'espérance de vie (Alzheimer, Parkinson, etc.) et/ou aux nouveaux modes de vie (tumeurs cérébrales, SIDA, maladies à prion, etc.), ont une incidence et un coût socio-économique qui augmentent de manière très alarmante. Tout individu présentera un jour des troubles du système nerveux (migraine, insomnie, dépression...) et un individu sur dix développera une maladie grave du système nerveux, sans traitement curatif. Aujourd'hui, les traitements des maladies du SNC, bien qu'essentiellement palliatifs, représentent le troisième poste des ventes de médicaments dans le monde (d'après IMS Health) derrière ceux de l'oncologie et des maladies cardiovasculaires, et sont en forte croissance par rapport à l'ensemble du marché des médicaments, toutes classes thérapeutiques confondues. Il est vraisemblable que ce taux de croissance se maintiendra voire augmentera encore à l'avenir. Pour illustrer cette dynamique, notons que le "pipeline" de cette classe thérapeutique aux USA contient plus de 1329 nouvelles molécules (PhRMA Report, 2015), en deuxième position derrière les traitements des cancers. Au niveau européen, le coût annuel des troubles et maladies du SNC a été estimé à €800 Mds par an (DiLuca et Olesen, 2014).

Les molécules à potentiel thérapeutique développées par l'industrie pharmaceutique pour traiter ces pathologies sont abandonnées après des développements très coûteux, notamment pour des problèmes d'inaccessibilité au parenchyme nerveux, protégé par la barrière hémato-encéphalique (BHE). De ce fait, la BHE contribue au taux d'attrition élevés, les plus élevés comparés à l'ensemble des aires thérapeutiques, des médicaments développés par l'industrie pharmaceutique pour traiter les pathologies et lésions du SNC. De nouvelles stratégies permettant le transfert de principes actifs vers le SNC, dont celles présentées dans ce manuscrit commencent à être exploitées par quelques sociétés au niveau mondial et les perspectives de marché sont considérables.

L'UMR 7259 et la société VECT-HORUS collaborent activement depuis plusieurs années sur cette problématique de l'adressage d'agents thérapeutiques vers le SNC. L'UMR 7259 est une Unité Mixte de Recherche, rattachée à Aix Marseille Université (AMU) et au CNRS, basée à Marseille, spécialisée dans l'étude des pathologies du SNC et dans l'évaluation d'approches thérapeutiques innovantes, sur le plan moléculaire et cellulaire. VECT-HORUS est une société de biotechnologies issue de ce laboratoire, créée fin 2005, dont la mission est de développer des stratégies permettant d'adresser des agents thérapeutiques ou d'imagerie vers le SNC. Les deux structures collaborent pour développer des molécules « vecteurs » qui facilitent le transfert de ces agents à travers la BHE en se liant à des récepteurs spécifiques impliqués dans le processus de transcytose.

C'est dans ce contexte qu'au cours de notre thèse, nous avons poursuivi trois objectifs.

**Notre premier objectif** a été de mettre en place et de valider des modèles *in vitro* de BHE de rat et souris, hautement reproductibles, basés sur une production de cultures primaires hebdomadaires, et indispensable à la poursuite des deux autres objectifs fixés. De tels modèles permettent d'adresser des questions fondamentales sur le fonctionnement des cellules endothéliales et des cellules partenaires de la BHE et sur le rôle des nombreuses protéines assurant sa spécificité. Ces modèles sont également utilisés par l'industrie pharmaceutique pour le screening de molécules à visée cérébrale.

**Notre deuxième objectif** a été d'utiliser les modèles *in vitro* de BHE mis en place pour étudier des stratégies de transport à visée cérébrale. A titre d'exemple, l'encapsulation de molécules dans des liposomes et nanoparticules est une stratégie qui est exploitée pour le transport de molécules à travers la BHE. Nous avons collaboré avec le laboratoire de neurobiologie de l'institut Nencki en Pologne qui exploite des nanoparticules de type poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) afin d'explorer leurs interactions avec les monocouches de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (CEMCs) du modèle *in vitro* de BHE et leur potentiel à traverser ces monocouches. Nous avons également utilisé les modèles *in vitro* de BHE pour approfondir nos connaissances sur le mécanisme de transcytose récepteur-dépendante au niveau de la BHE. Les voies de trafic intracellulaire des récepteurs et ligands sont encore relativement peu connues, voire quasiment non décrites pour certains des récepteurs ciblés dans nos projets. Dans le cadre de notre thèse, nous avons focalisé nos recherches sur le récepteur au LDL (LDLR) et sur des peptides vecteurs développés pour se lier à ce récepteur.

**Notre troisième objectif** a été de mettre en place des modèles *in vitro* de barrières endothéliales du SNC en situation inflammatoire, notamment la BHE et la barrière sang-moelle épinière (BSME). Peu d'études abordent les différences constitutives entre la BHE et la BSME. L'inflammation des barrières endothéliales serait une composante générale associée aux traumatismes, lésions aiguës du SNC liées à l'ischémie, notamment à l'accident vasculaire cérébral (AVC), et aux pathologies chroniques neurodégénératives du SNC. Nous avons tenté de mieux caractériser au niveau moléculaire les différences entre ces deux endothéliums dans le but de proposer à terme des stratégies de vectorisation adaptées à ces tissus, notamment en situation inflammatoire.

## Résumé global

La barrière hémato-encéphalique (BHE) protège le système nerveux central (SNC) des fluctuations plasmatiques des molécules endogènes, mais aussi exogènes, et notamment des molécules à potentiel thérapeutique. L'imperméabilité de la BHE est compensée par la présence de nombreux mécanismes spécifiques qui assurent le transport transendothélial des nutriments nécessaires au tissu nerveux, parmi lesquels la transcytose modulée par différents récepteurs. Dans le but d'améliorer le transfert d'agents thérapeutiques à travers la BHE, nous développons des « vecteurs » qui se lient à certains de ces récepteurs cibles.

Au cours de notre thèse, nous avons développé et optimisé des outils et approches cellulaires, notamment des modèles *in vitro* de BHE et barrière sang-moelle épinière (BSME) syngéniques de rat et souris, basés sur la co-culture de cellules endothéliales microvasculaires (CEMs) cérébrales (CEMCs) ou spinales (CEMSs) et d'astrocytes. Ces modèles sont hautement reproductibles, avec un contrôle qualité permettant de développer des projets avec des partenaires académiques et industriels, tels que l'évaluation du transport de différentes formes de nanovecteurs (liposomes ou nanoparticules), et l'étude de différents récepteurs potentiellement impliqués dans des processus de transcytose. En particulier, avec des modèles de BHE préparés à partir de rats ou souris, sauvages ou invalidés pour le LDLR (*ldlr*  $-/-$ ) et d'une approche de « pulse-chase » permettant le suivi du trafic intracellulaire du LDLR et du LDL, nous montrons que le LDLR est exprimé à la membrane plasmique apicale des CEMCs et confirmons qu'il est impliqué dans la transcytose du LDL à travers le compartiment vésiculaire, tout en évitant le compartiment lysosomal, confirmant l'intérêt de son ciblage dans nos approches. Nous montrons que nos vecteurs, conjugués à une molécule organique de type TAMRA ou un cargo protéique (fragment Fc d'un anticorps IgG1 humain), sont endocytés par les CEMCs de façon LDLR-dépendante, évitent le compartiment lysosomal et franchissent la monocouche de CEMCs. Cette étude au niveau cellulaire a permis de valider le potentiel de nos vecteurs et nous poursuivons leur conjugaison à des principes actifs ou à des agents d'imagerie présentant une faible exposition cérébrale.

Sachant que l'inflammation des CEMs est associée à des degrés divers à de nombreuses pathologies du SNC, nous avons mis en place et caractérisé, notamment par des approches transcriptomiques, des modèles *in vitro* de BHE et BSME en situation inflammatoire. L'utilisation de ces modèles sera poursuivie pour mieux comprendre les processus inflammatoires des cellules endothéliales du SNC et évaluer des stratégies de vectorisation ciblant préférentiellement les structures du SNC en situation pathologique.

# Setting-up of *in vitro* models of the blood-brain barrier and study of the transendothelial transfer of vectors and conjugates that target the LDL receptor

## Global abstract

The blood-brain barrier (BBB) protects the central nervous system (CNS) from plasma fluctuations of endogenous, but also exogenous molecules, including those with therapeutic potential. The BBB's restrictive properties are compensated by the presence of many specific mechanisms that provide transport of nutrients across the BBB, from bloodstream to the nervous tissue, including transcytosis of endogenous ligands mediated by receptors. Our objective is to improve drug delivery across the BBB and we develop "vectors" that target different receptors.

During our thesis we developed and optimized cellular tools and approaches, in particular syngeneic *in vitro* models of the BBB and blood-spinal cord barrier (BSCB) from both rat and mouse, based on the co-culture of brain (BMECs) or spinal cord (SCMECs) microvascular endothelial cells (MECs) and astrocytes. These models are highly reproducible, with high quality control standards, allowing us to develop projects with academic and industrial partners, such as the evaluation of transport of different forms of nanocarriers (liposomes and nanoparticles), and the study of different receptors potentially involved in transcytosis process. In particular, using models prepared from wild type or LDLR knock out (*ldlr* *-/-*) rat and mice and a "pulse-chase" approach, we show that the LDLR is expressed at the apical plasma membrane of the BBB-endothelial cells and confirmed that it is involved in transcytosis of LDL through the vesicular compartment, while avoiding the lysosomal compartment, further establishing its interest as a target receptor. We show that our vectors conjugated to a TAMRA organic molecule or to a protein cargo (Fc fragment of a human IgG1 antibody) are endocytosed by MECs in a LDLR-dependent manner, avoid the lysosomal compartment and cross the MEC monolayers. Our work at the cellular level confirmed the potential of our vectors and we are now involved in conjugating them with active compounds or imaging agents with low brain exposure.

Considering that vascular endothelium inflammation is associated with many CNS lesions and pathologies, using transcriptomic approaches, we have developed and characterized BBB and BSCB *in vitro* models in inflammatory conditions. These models will be useful to better understand the inflammatory processes of CNS endothelial cells and to evaluate vectorization strategies preferentially targeting CNS structures in pathological condition.



## Liste des publications internationales, communications affichées-orales et brevets

### 1. Posters

- Characterisation of peptides specific for receptor/transport systems of the blood brain barrier, as lead molecules for the development of drug delivery vectors. Molino Y, David M, Fortoul A, Khrestchatisky M. (Journées de l'IFR Jean-Roche, Marseille, **2011**).
- Setting up *in vitro* rat Blood Brain Barrier (BBB) and Blood Spinal Cord Barrier (BSCB) models: comparative analysis under pro-inflammatory treatment. Molino Y, Jabès F, Sbaï O, Bernard A, Vlieghe P, Khrestchatisky M. (10<sup>ième</sup> colloque de la Société des Neurosciences, Marseille, **2011**).
- Setting up an *in vitro* model of rat Blood-Brain Barrier (BBB): a focus on BBB impermeability and receptor-mediated transport. Molino Y, Jabès F, Lacassagne E, Gaudin N, Khrestchatisky M. (Journées de l'école doctorale, Marseille, **2013**).
- The LDLR promotes transcytosis of LDL and peptide vectors developed for cargo delivery to the brain in an *in vitro* model the Blood-Brain barrier. Molino Y, Varini K, Jabès F, David M, Gaudin N, Bernard A, Lécorché P, Jacquot G, Khrestchatisky M. (11<sup>th</sup> international conference of Cerebral Vascular Biology, CVB, Paris, **2015**).

### 2. Tables rondes

- Meeting annuel de l'école doctorale des sciences de la Vie et de la Santé (Marseille, **2014**).
- Société d'Etudes des Interfaces entre le Sang et le Cerveau (SEISC), table ronde animée par Jean-François Ghersi-Egea (Directeur de recherche, Blood-brain interfaces exploratory platform, INSERM U1028), Pierre-Olivier Couraud (Professeur et Directeur de l'Institut Cochin, Université Paris Descartes, INSERM U1016, CNRS UMR8104) et Roméo Cecchelli (Professeur et ancien Directeur du laboratoire de physiopathologie de la BHE, Université d'Artois, Lens) (Paris, **2014**).

### 3. Publications scientifiques

- Molino Y, Jabès F, Lacassagne E, Gaudin N, Khrestchatisky M. Setting-up an *in vitro* model of rat blood-brain barrier (BBB): a focus on BBB impermeability and receptor-mediated transport. *J Vis Exp.* **2014**, (88):e51278. doi: 10.3791/51278. **(article 1 de ce manuscrit)**
- Chaturvedi M\*, Molino Y\*, Sreedhar B, Khrestchatisky M, Kaczmarek L. Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for delivery across the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine* **2014**, 9:575-588. doi: 10.2147/IJN.S54750. (\* authors contributed equally to this work). **(article 2 de ce manuscrit)**

- van Gijssel-Bonnello M, Acar N, Molino Y, Bretillon L, Khrestchatisky M, de Reggi M, Gharib B. Pantethine Alters Lipid Composition and Cholesterol Content of Membrane Rafts, With Down-Regulation of CXCL12-Induced T Cell Migration. *J Cell Physiol* **2015**, 230(10):2415-2425. doi: 10.1002/jcp.24971.
- Molino Y\*, Varini K\*, Jabès F, David M, Gaudin N, Bernard A, Lécorché P, Jacquot G, Khrestchatisky M. The LDLR promotes transcytosis of LDL and peptide vectors developed for cargo delivery to the brain in an *in vitro* model the Blood-Brain barrier. (\* authors contributed equally to this work). **2015. (article 3 de ce manuscrit, soumis)**

#### 4. *Brevets*

- Khrestchatisky M, David M, Molino Y, Vlieghe P. Peptide derivatives and use thereof as carriers for molecules in the form of conjugates. **Patent Application WO 2010/046588** (Issued in the US, Europe and South Africa. Pending in other countries).
- Vlieghe P, David M, Molino Y, Khrestchatisky M. Peptide derivatives, their preparation and their uses. **Patent Application WO 2011/131896**. (Issued in France, USA and Eurasia. Pending in other countries).
- Jacquot G, Lécorché P, Malcor JD, Payrot N, David M, Molino Y, Khrestchatisky M. Compositions and methods for drug delivery. **Patent Application WO 2014/060601**.

## **A. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

## **CHAPITRE I : LE SNC ET SON ENDOTHELIUM, CONCEPT DE BARRIERE**

## I. La BHE : historique d'une découverte jusqu'à 15 ans avant nos jours

Le concept de barrière entre le sang et le cerveau apparaît pour la première fois avec les travaux du physiologiste Allemand Paul Ehrlich en 1885 (Erich, 1885). Ses études ont montré qu'après injection intraveineuse chez la souris d'un colorant vital dérivé de l'indigo, l'aniline, tous les organes se coloraient à l'exception du cerveau. Cette observation avait été interprétée par une faible affinité du colorant pour le tissu cérébral. Quelques années plus tard, en 1913, son étudiant Edwin Goldman constata qu'un autre colorant, le bleu Trypan, lorsqu'il était injecté dans le liquide céphalo-rachidien, teintait l'ensemble du cerveau mais ne diffusait pas dans le système périphérique (Goldmann, 1913). Cette absence de passage du colorant du sang vers la circulation sanguine démontrait sans équivoque l'existence d'une barrière limitant les échanges entre le sang et le cerveau. Le terme de BHE fut employé pour la première fois en 1922 par Stern et Gautier et sa localisation au niveau des capillaires fut établie lorsque les jonctions serrées ont été observées par microscopie électronique entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Reese et Karnovsky, 1967). Cette barrière est maintenant connue comme une interface dynamique dont le rôle de filtre sélectif vise à maintenir l'homéostasie cérébrale nécessaire au bon fonctionnement des neurones et des cellules gliales. La BHE, chez l'homme, commence à se former à la fin du premier trimestre de grossesse (Woollett, 2005). Cependant, il semble que ses propriétés définitives ne prennent place qu'au début de la période post-natale (Rubin et Staddon, 1999).

## II. L'homéostasie cérébrale et la BHE

Le SNC est un organe sensible et un système complexe qui doit être dissocié des fluctuations plasmatiques du sang afin de maintenir entre autres un environnement ionique stable indispensable à l'activité neuronale et au potentiel d'action. Le maintien de l'homéostasie cérébrale est assuré par un endothélium spécifique qui « limite et contrôle » les échanges entre le sang et le SNC. Cet endothélium facilite également le transport des nutriments du sang vers le tissu nerveux par des récepteurs et transporteurs spécifiques présentés à la membrane apicale des cellules endothéliales (Kim *et al.*, 2006). La notion de barrière endothéliale que nous allons détailler au niveau cellulaire et moléculaire limite la diffusion des molécules par leur simple gradient de diffusion comme dans les endothéliums périphériques dit fenêtrés. Cette notion de maintien de l'homéostasie cérébrale sera reprise à de nombreuses occasions dans le manuscrit et sera un fil conducteur dans la compréhension des propriétés de la BHE.

### III. L'hétérogénéité de l'arbre vasculaire du SNC

#### A. Hétérogénéité au niveau des zones cérébrales

Il existe différentes entités qui isolent le SNC du « système périphérique » : la BHE et la BSME entre le sang et le tissu nerveux et la barrière hémato-liquidienne (BHL) entre le sang et le liquide céphalo rachidien (LCR). Il existe une troisième zone cérébrale où la vasculature n'a pas le phénotype de barrière, les organes circumventriculaires (OCV) (Figure 1) (Abbott, 2004 ; Abbott *et al.*, 2006).

##### 1. *Les organes circumventriculaires (OCV)*

On dénombre six de ces régions qui se localisent au niveau des plexus choroïdes. Ce sont l'organe subfornical, l'organe vasculaire de la lame terminale, la neurohypophyse, la glande pinéale ou épiphyse, l'organe subcommissural et l'area postrema. Ces structures permettent la détection des substances toxiques, la composition et la température du sang et participent au contrôle du vomissement, de la faim, de la soif, de la température corporelle et de la sécrétion d'hormones du parenchyme nerveux via la circulation sanguine.

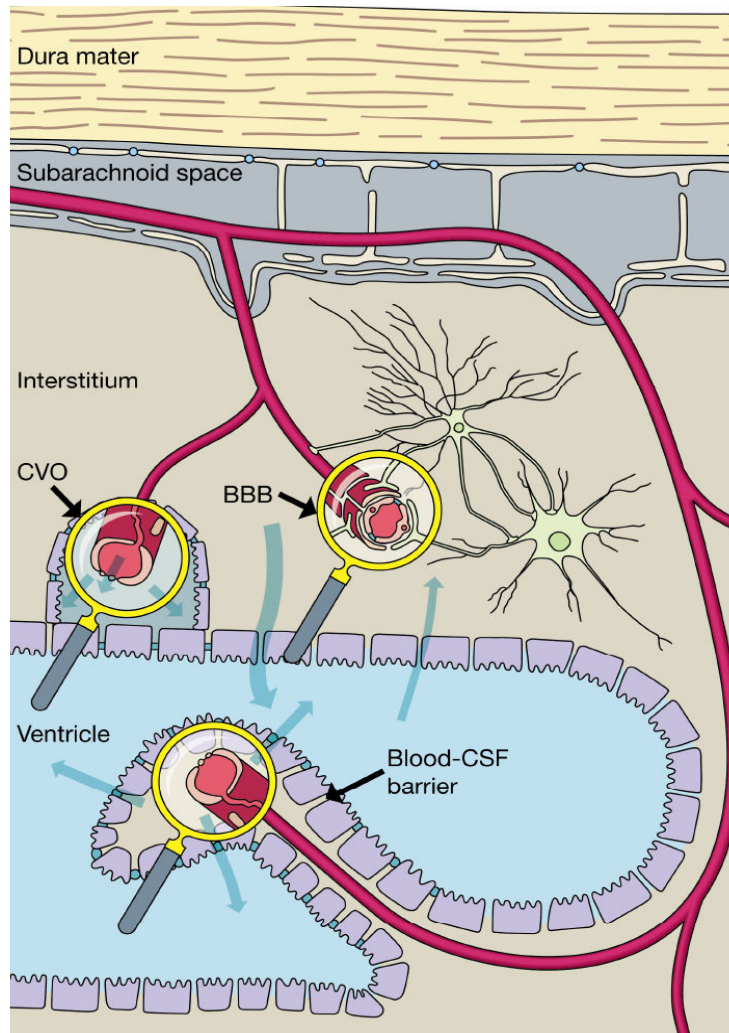
##### 2. *La barrière hémato-liquidienne (BHL)*

Les plexus choroïdes sont concentrés à deux endroits: (i) à la jonction entre les ventricules latéraux et le troisième ventricule et (ii) au niveau du quatrième ventricule, juste sous le cervelet. Chez l'homme, le volume total de liquide contenu dans les ventricules et l'espace subarachnoïde est d'environ 150 mL, et on estime que ce volume est remplacé toutes les huit heures. Les plexus choroïdes produisent de 450 à 500 mL de LCR par jour, et ce liquide circule des ventricules de l'encéphale vers le quatrième ventricule, puis, en passant par des canaux vers l'espace subarachnoïde le LCR sera évacué dans le sinus sagittal par les villosités arachnoïdiennes. La composition du LCR ressemble en partie à la composition du plasma sanguin, avec beaucoup moins de protéines et de sucres, un peu plus d'ions Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> et H<sup>+</sup>, et un peu moins d'ions Ca<sup>2+</sup> et K<sup>+</sup>. En fait, le LCR est issu du plasma qui a été filtré au niveau des plexus choroïdes. Ces plexus sont formés de capillaires semi-perméables d'où le plasma peut rejoindre les ventricules. Ces capillaires sont entourés d'une couche de cellules épendymocytes qui agissent comme un filtre empêchant l'accès des protéines, du glucose et qui contrôle la réabsorption de certains ions.

##### 3. *La barrière hémato-encéphalique (BHE)*

La BHE est localisée au niveau des cellules endothéliales des « capillaires » cérébraux entourés par des types cellulaires spécifiques qui induisent son phénotype spécifique comme nous le détaillerons plus loin. Les capillaires cérébraux humains représentent une surface d'échange

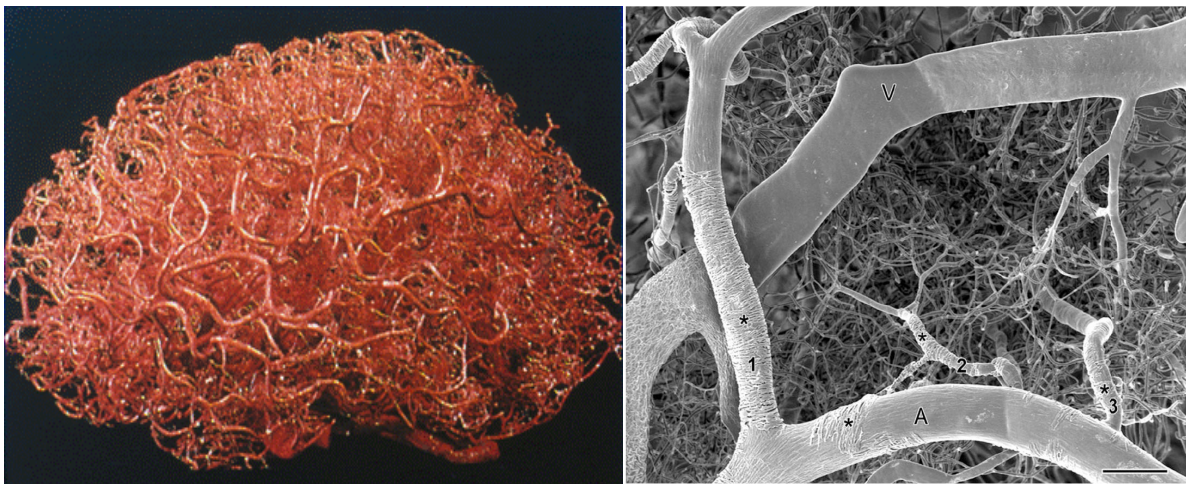
d'environ 20 m<sup>2</sup> pour un réseau d'environ 650 kilomètres comprenant 100 milliards de capillaires dans le cerveau soit autant que de neurones. Cette grande surface d'échange entre la circulation sanguine et le parenchyme nerveux, comparée aux autres zones cérébrales énoncées ci-dessus en fait son intérêt principal dans les approches visant à délivrer des agents thérapeutiques vers le SNC.



**Figure 1** : Il existe différentes barrières au niveau du SNC, la BHE (blood-brain barrier, BBB) qui est un endothélium continu et la BHL (blood cerebrospinal fluid barrier, B-CSF barrier) qui est un épithélium continu. Les autres endothéliums au niveau des organes circumventriculaires (circum ventricular organs, CVOs, zone de sécrétion de certaines hormones qui doivent pouvoir passer du parenchyme nerveux vers la circulation sanguine) et des ventricules cérébraux sont constitués d'endothéliums fenêtrés (Adapté de Abbott *et al.*, 2006).

## B. Hétérogénéité au niveau de l'architecture des vaisseaux

Bien que 90% de la vasculature du SNC soit composée de capillaires, l'arbre vasculaire est également composé d'artérioles, de métartérioles, pré-capillaires, veinules et veines (Figure 2). Cette hétérogénéité de diamètre, de composition de la matrice extracellulaire et de cellules qui les entourent leur donne des propriétés et une fonctionnalité propre (Dyrna *et al.*, 2013, Macdonald *et al.*, 2010). Par exemple, les artères, artérioles et métartérioles sont enrobées par des cellules musculaires lisses ayant un phénotype myo-contractile qui permettent de réguler le débit sanguin par ajustement du diamètre du vaisseau. Il a été proposé que chacun des 100 milliards de neurones de notre cerveau est à proximité d'un microcapillaire. Chez l'homme, les plus petits capillaires font environ  $3\mu\text{m}$  de diamètre alors que le diamètre moyen des globules rouges est d'environ  $8\mu\text{m}$ . Cela nécessite une déformation des cellules sanguines et un ralentissement du débit sanguin permettant un échange maximal entre cellules. La BHE se situe spécifiquement au niveau des capillaires et microcapillaires cérébraux en assurant une large diffusion au sein du tissu cérébral des solutés et des molécules du sang vers le cerveau ainsi qu'un efflux de molécules du cerveau vers le sang afin de maintenir son homéostasie.



**Figure 2** : La photographie de gauche montre la richesse du réseau vasculaire cérébral constitué de gros vaisseaux de surface (artères, artérioles, métartérioles et veines) et majoritairement de microvaisseaux (pré-capillaires, capillaires et veinules). La photographie de droite, prise en microscopie électronique à transmission (MET) illustre le réseau vasculaire cérébral, (V) une veine, (A) une artère, (1) une artériole et (2, 3) des métartérioles qui sont enrobées de cellules musculaires lisses ayant un phénotype myo-contractile qui leur permet de réguler le débit sanguin par ajustement du diamètre du vaisseau. Les métartérioles débouchent sur des pré-capillaires puis capillaires et veinules dont la densité est proportionnelle à l'activité neuronale de la zone cérébrale (Photographie adaptée de Wikipedia).

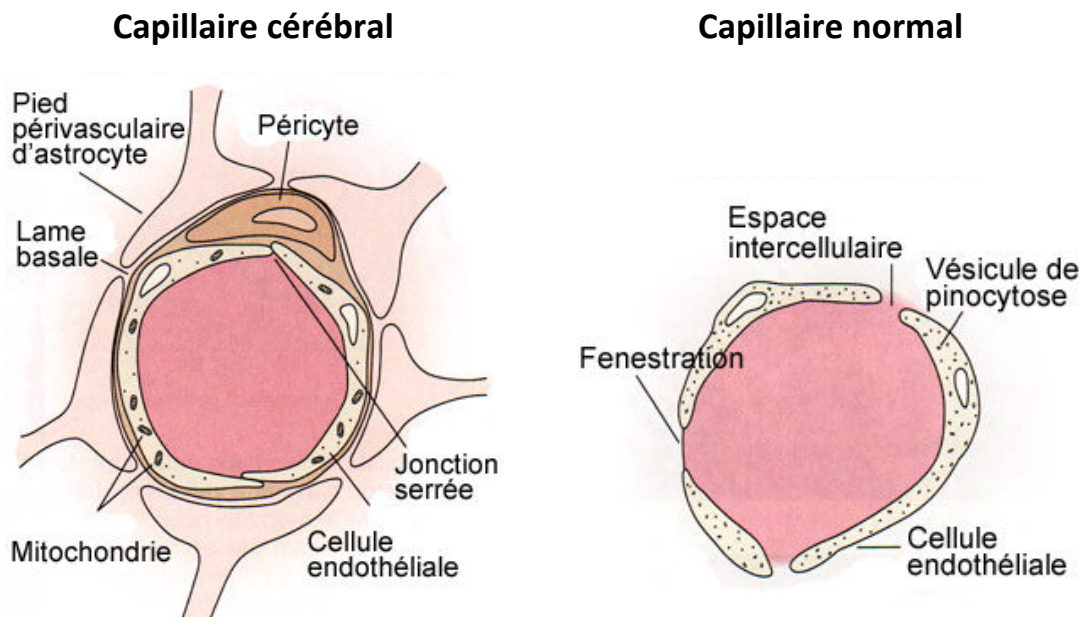


#### IV. Le concept d'unité neuro-glio-vasculaire (UNGV)

L'environnement module le phénotype des différents types cellulaires de l'UNGV et réciproquement. Le rôle de l'environnement tissulaire cérébral dans l'induction des propriétés de barrière au niveau des cellules endothéliales microvasculaires a été illustré par l'expérience de Stewart et Wiley (1981), qui greffèrent un tissu cérébral embryonnaire de caille non encore vascularisé dans la cavité coelomique d'un embryon de poulet. Le tissu cérébral fut progressivement vascularisé par des vaisseaux d'origine abdominale. Les vaisseaux ainsi formés au sein du greffon présentaient des caractéristiques structurelles, fonctionnelles et histochimiques de la BHE (forte densité mitochondriale, formation de jonctions serrées, activité de la phosphatase alcaline et de la cholinestérase). A l'inverse, le tissu somitique (mésoderme dorsal) de caille greffé dans le cerveau de poulet fut vascularisé par des vaisseaux d'origine cérébrale qui contenaient peu de jonctions serrées mais de nombreuses vésicules de pinocytose, et présentaient peu de mitochondries. L'injection de bleu Trypan révéla que les vaisseaux ayant envahi le greffon cérébral restreignaient le passage du colorant à travers la paroi vasculaire, alors que les vaisseaux qui s'étaient développés dans le greffon mésodermique ne présentaient pas de propriétés restrictives. Un dispositif expérimental similaire permit de démontrer l'induction de la protéine HT7 - une glycoprotéine spécifique à l'endothélium de la BHE - au sein des microvaisseaux envahissant le greffon cérébral (Ikeda *et al.*, 1996).

Ces expériences démontraient que les interactions entre le parenchyme cérébral et le tissu vasculaire en développement étaient nécessaires à l'établissement du phénotype de barrière. De plus, après isolement de leur environnement, les cellules endothéliales cérébrales perdent rapidement une partie de leurs propriétés, phénomène appelé dé-différenciation (Rubin *et al.*, 1991), indiquant également que le tissu environnant la microvasculature cérébrale détermine ses propriétés. Ce paramètre de régulation du phénotype par l'environnement cellulaire et moléculaire sera exploité par les scientifiques désireux de reproduire des modèles *in vitro* de BHE grâce à l'établissement de co-cultures. En effet, ces observations indiquent le rôle inducteur de l'environnement cérébral dans l'établissement de la BHE et cet environnement inclut des composantes cellulaires (cellules gliales, neurones et péricytes) et acellulaires (matrice extracellulaire) qui sont « individuellement et en combinaison » à l'origine de cette induction.

Depuis, les concepts de barrière endothéliale et d'homéostasie cérébrale ont évolué. La BHE est aujourd'hui connue comme une interface dynamique, dont les caractéristiques structurales et métaboliques résultent d'une coopération entre cellules vasculaires (cellules endothéliales et péricytes) et nerveuses (cellules gliales et neurones) (Hawkins et Davis, 2005). Cette coopération cellulaire a mené au concept d'unité fonctionnelle appelée UNGV (Figure 3) (Abbott *et al.*, 2006; Zlokovic, 2008).



**Figure 3** : Comparaison de la structure anatomique d'un capillaire cérébral par rapport à un capillaire normal permettant de comprendre les propriétés spécifiques des cellules endothéliales de la BHE, autrement appelée unité neuro-glio-vasculaire (UNGV). Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux sont entourées d'une matrice extracellulaire de composition spécifique, de péricytes, de pieds astrocytaires et probablement de contacts synaptiques avec les neurones (non schématisés ici) qui leur procurent leur phénotype spécifique (Adapté de Cleaver et Melton, 2003).

De nombreux travaux démontrent l'importance de l'environnement cérébral et en particulier l'impact de la présence des astrocytes dans l'établissement des caractéristiques des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Hawkins et Davis, 2005). Il existe plusieurs types de cellules gliales. La microglie a un rôle de défense du SNC. Ces cellules sont considérées comme des macrophages résidents du SNC (Aloisi, 2001) puisque les cellules immunitaires en sont normalement exclues en condition physiologique, non inflammatoire. Les oligodendrocytes sont spécialisés dans la myélinisation. Les astrocytes ont un rôle trophique, métabolique et de soutien des neurones, et ils peuvent aussi communiquer avec les cellules environnantes (neurones, vaisseaux sanguins, autres cellules gliales) en créant un réseau de communication, et sont des cellules excitables capables de libérer des glio-transmetteurs. Sous ce terme d'astrocyte se cache en réalité différentes classes cellulaires qu'il est pour l'instant difficile de différencier si ce n'est par leur contact exclusif avec les neurones, les vaisseaux sanguins, les autres cellules gliales ou l'ensemble de ces acteurs (Volterra et Meldolesi, 2005). Les différentes composantes de l'UNGV sont détaillées dans les paragraphes ci-dessous.

## **A. Les cellules endothéliales**

Ces cellules sont dotées de nombreuses caractéristiques morphologiques et enzymatiques particulières permettant de les différencier de celles des endothéliums périphériques. Pour commencer, elles possèdent plusieurs paramètres de restriction du passage par simple diffusion passive de molécules. L'absence de fenestrations (Fenstermacher *et al.*, 1988) et un nombre restreint de vésicules de pinocytose limitent le flux transcellulaire (Sedlakova *et al.*, 1999) alors que les jonctions serrées hautement différenciées induisent une résistance électrique très élevée bloquant le flux paracellulaire et entraînant leur polarisation en 2 pôles de composition moléculaire différentes, une membrane apicale en contact avec le flux sanguin (compartiment luminal) et une membrane basolaterale en lien avec le parenchyme nerveux (compartiment abluminal). De plus, les mitochondries en abondance représentent à elles seules 10 % du volume cytoplasmique (contre 2 à 5% pour les cellules endothéliales périphériques) et leur permettent d'assurer un métabolisme énergétique élevé nécessaire au maintien de leur phénotype de barrière (Oldendorf *et al.*, 1977).

## **B. La membrane basale, impacts structurel et métabolique**

La membrane basale est une matrice extracellulaire spécialisée, produite par les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes qui va elle même réguler les phénotypes de ces cellules (Tilling *et al.*, 1998). Au niveau de la BHE, elle forme un réseau extracellulaire continu d'une épaisseur de 30 à 40 nm à l'âge adulte (Farkas et Luiten, 2001). Elle présente une structure composée principalement de collagène de type 4, de laminine, de fibronectine, et de protéoglycanes heparanes sulfates. La structure en réseau et la présence de charges anioniques confèrent à la membrane basale des propriétés de filtres sélectifs qui viennent s'ajouter à celles de l'endothélium cérébral. En plus de son rôle structural, des études réalisées *in vitro* montrent que les composants de la membrane basale exercent une influence sur la différenciation des cellules endothéliales en induisant la formation des jonctions serrées (Tilling *et al.*, 1998). La membrane basale et l'activation des intégrines influencent également la prolifération des cellules endothéliales en induisant l'expression de surface de récepteurs à des facteurs trophiques tels que le VEGF et b-FGF (Tsou et Isik, 2001). La perte de la stabilité de la membrane basale en condition inflammatoire induite notamment par la libération de diverses protéases ou collagénases est fréquemment observée dans les manifestations pathologiques à l'origine de la rupture de la BHE (Gasche *et al.*, 2006). Ces observations indiquent l'importance de la membrane basale dans le maintien des propriétés de la barrière endothéliale.

### C. Les péricytes, stabilisateurs de jonction serrées PDGF-B dépendantes

Découverts en 1870 par Rouget, les péricytes sont localisés au niveau de la membrane abluminale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, appartenant à la lignée des cellules musculaires lisses. Ces cellules projettent des extensions qui pénètrent la membrane basale et recouvrent 20 à 30% de la surface capillaire (Figure 4). Dans le cerveau, le ratio péricytes / cellules endothéliales est de 1 pour 3. On estime que la distance qui sépare ces deux types cellulaires est d'environ 20 nm (Bonkowski *et al.*, 2011) et qu'ils sont liés à la membrane abluminale de l'endothélium à intervalles irréguliers (Tagami *et al.*, 1990).



**Figure 4 :** Péricytes enveloppant des microvaisseaux cérébraux. Les péricytes sont des cellules ayant un phénotype myo-contractile, incorporés dans la membrane basale des capillaires du SNC, également nécessaires à la néoangiogenèse et au maintien des propriétés de la BHE. Le dysfonctionnement de cette population cellulaire entraîne une hyperdilatation vasculaire, des hémorragies et contribue au développement de pathologies telles que l'oedème et la rétinopathie diabétique (adapté de Bergers et Song, 2005).

---

Les observations réalisées *in vivo* démontrent que le degré d'imperméabilité de l'endothélium vasculaire augmente avec le ratio péricytes / cellules endothéliales (Shepro et Morel, 1993) via la stabilisation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Ces résultats sont confirmés par des études qui montrent que l'absence de péricytes au niveau des capillaires cérébraux induit une augmentation de la perméabilité vasculaire par altération de la structure du complexe jonctionnel (Hellstrom *et al.*, 2001). Des études *in vitro* ont également montré que l'ajout de ces cellules dans une culture de cellules endothéliales provoque la formation de structures de type capillaire (Ramsauer *et al.*, 2002) et induit également les propriétés de barrière en renforçant les jonctions serrées lors d'une tri-culture, cellules endothéliales, astrocytes et

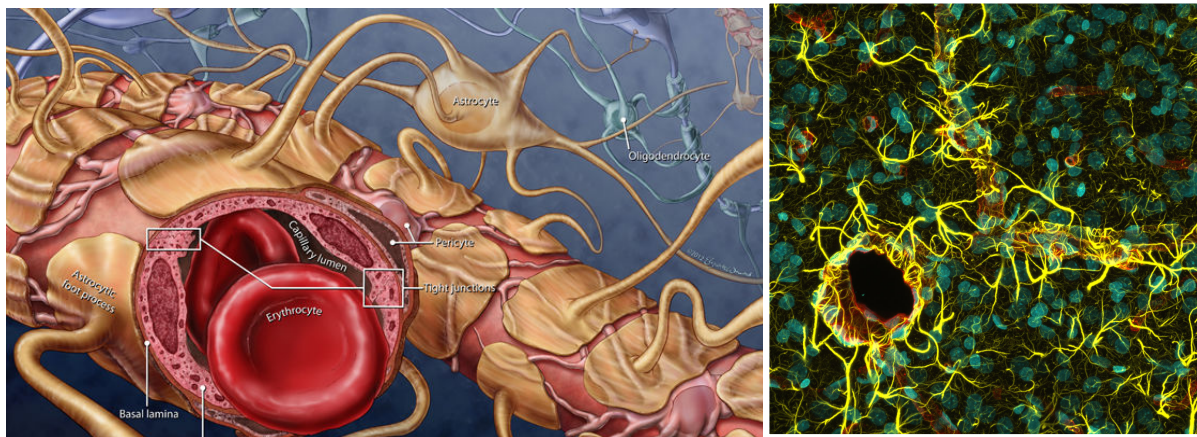
péricytes (Nakagawa *et al.*, 2007). Une telle proximité suggère leur implication dans la physiologie des capillaires cérébraux ainsi que dans l'induction et le maintien des propriétés de la BHE (Lai et Kuo, 2005).

Des études menées sur des souris déficientes en péricytes ont permis d'étudier *in vivo* la fonction des péricytes dans divers organes dont le cerveau et leur rôle dans la néoangiogenèse cérébrale. Ces souris ont été mutées pour des gènes impliqués dans la voie de signalisation « platelet-derived growth factor-B (PDGF-B)/platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  (PDGFR- $\beta$ ) », qui est nécessaire au recrutement des péricytes lors de l'angiogenèse (Gaengel *et al.*, 2009). Les cellules endothéliales en migration secrètent le PDGF-B alors que les précurseurs des péricytes expriment le récepteur PDGFR- $\beta$  qui leur permet de se diriger vers les cellules endothéliales des vaisseaux en formation. Ainsi, ce type cellulaire longtemps négligé dans l'étude de la physiopathologie de la BHE, s'est révélé être un acteur majeur dans la mise en place et du maintien des propriétés de la BHE (Armulik *et al.*, 2011). Enfin, les péricytes participent également aux propriétés métaboliques de la BHE, en induisant l'expression d'enzymes dans les cellules endothéliales ou en renforçant l'expression de certaines pompes d'efflux telle que MRP-6 (Berezowski *et al.*, 2004).

#### **D. Les astrocytes, un lien majeur entre capillaires et neurones**

L'établissement de la BHE au cours du développement coïncide avec la formation des manchons astrocytaires et de la membrane basale autour des capillaires cérébraux (Wolff et Bär, 1972). Ces travaux ont confirmé le rôle important des cellules gliales sur l'induction du phénotype de barrière. A l'âge adulte dans le parenchyme cérébral, les astrocytes sont abondants et recouvrent les capillaires cérébraux avec leurs multiples pieds astrocytaires. Le ratio neurone/astrocyte est de 1:10 sachant qu'un cerveau adulte contient environ 100 milliards de neurones. Les multiples « pieds astrocytaires » occupent plus de 85% de la surface des capillaires, formant un manchon continu le long des vaisseaux (Fenstermacher *et al.*, 1988) (Figure 5). Ils forment entre eux des « jonctions gaps » et des desmosomes (Nakazawa et Ishikawa, 1998). Le potentiel des astrocytes dans l'induction des propriétés de l'endothélium cérébral a été étudié de façon approfondie *in vitro* grâce à des modèles de co-cultures cellulaires utilisant des cellules endothéliales cultivées sur filtre en présence d'astrocytes ou de milieu conditionné par des astrocytes. Ces expériences ont montré la capacité de ces cellules à induire les propriétés de BHE (Dehouck *et al.*, 1990; Rubin *et al.*, 1991) en renforçant les jonctions serrées (Dehouck *et al.*, 1990), ou encore en induisant l'expression de pompes d'efflux comme la P-gp et certaines multidrug resistance protein (MRP) (Fenart *et al.*, 1998; Berezowski *et al.*, 2004). Dans ces modèles cellulaires, il n'y a pas de contact direct entre les deux types cellulaires, ce

qui suggère que les astrocytes secrètent des facteurs solubles indispensables à l'établissement des propriétés de la BHE. Cette influence des astrocytes sur la différenciation des cellules endothéliales ainsi que sur la modulation des propriétés de perméabilité de la BHE, notamment le renforcement des jonctions serrées a été largement reprise et décrite dans la littérature (Hawkins et Davis, 2005, Abbott *et al.*, 2006; Abbott *et al.*, 2009, Abbott *et al.*, 2010). Réciproquement, il a été montré que les cellules endothéliales influencent également la différenciation des astrocytes (Persidsky *et al.*, 2006) par la sécrétion de molécules telles que le leukaemia inhibitory factor (LIF) (Abbott, 2002).



**Figure 5 :** Illustration du degré de couverture des micro-vaisseaux cérébraux par les pieds astrocytaires ainsi que les multiples contacts avec les autres types cellulaires cérébraux, notamment les neurones dont les astrocytes englobent les synapses avec pour effet de limiter la libération des neurotransmetteurs dans l'espace interstitiel. (Abbott *et al.*, 2010). A droite, photographies prises en microscopie confocale (50 Z-slice) d'une coupe de cortex de rat montrant les astrocytes (jaune) et leurs prolongements (pieds astrocytaires) entourant des microvaisseaux (rouge). Les noyaux cellulaires sont en bleu (Adapté de Wikipedia).

Au même titre que les péricytes, les astrocytes participeraient à la dégradation de la matrice via l'activation de metalloproteinases matricielles (matrix metalloproteinases, MMPs) (Green et Friedland, 2007) lors de la néoangiogenèse. De par leur forme et leur situation, étant à la fois en contact avec des neurones et des cellules endothéliales, les astrocytes représentent le lien idéal de communication entre ces deux types cellulaires (Kim *et al.*, 2006). Les astrocytes réguleraient l'excitabilité neuronale (Fellin *et al.*, 2007) et seraient les cellules nourricières du cerveau, via la dégradation du glycogène en lactate, lors d'un déficit de glucose (Brown et Ransom, 2007). Les astrocytes, comme les oligodendrocytes, sont également responsables de la synthèse de novo de 95% du cholestérol cérébral (revue par Dietschy et Turley, 2001, 2004) permettant au SNC d'être quasi-autonome en synthèse de cholestérol en conditions physiologiques.

## E. Les neurones, rôles dans l'UNGV

Les intercommunications entre les neurones et les cellules endothéliales de la BHE ont connu ces dix dernières années un intérêt croissant avec l'émergence du concept d'UNGV. Initialement, les neurones ont été impliqués lors de la mise en place de la BHE, durant les premières étapes de la vascularisation du cerveau. Des études récentes ont révélé une relation entre l'activité neuronale locale et la régulation de la micro-circulation cérébrale, proportionnellement à la densité du réseau de capillaire dans ces zones, permettant de subvenir aux besoins métaboliques (Harrison *et al.*, 2002). De ce fait, les neurones seraient le dernier maillon de cette chaîne cellulaire interconnectée. Cette situation peut être illustrée avec la synthèse *de novo* du cholestérol cérébral. Chez l'adulte, en condition physiologique, le taux de synthèse cérébral excède les besoins métaboliques en stérol. Cela se résume en un échange préférentiel du cholestérol du tissu nerveux vers la circulation (revue par Dietschy et Turley, 2004). À l'état d'équilibre, l'essentiel de la synthèse *de novo* du cholestérol est balancée par l'excrétion via la BHE du 24S-hydroxycholestérol qui est issu de l'hydroxylation du cholestérol excédentaire par un cytochrome P450, CYP46, majoritairement neuronal à l'état d'équilibre physiologique (Björkhem *et al.*, 1998). Dans le cas d'une défaillance des neurones, il a été mis en avant que les astrocytes peuvent hydroxyler le cholestérol car ils possèdent également la CYP46 (Lund *et al.*, 2003).

Pendant l'embryogenèse, l'apparition des jonctions serrées est l'une des caractéristiques les plus précoces des cellules endothéliales cérébrales. En effet, les jonctions serrées se forment lorsque les vaisseaux sanguins envahissent le cerveau à E11 chez la souris et E12 chez le rat (Daneman *et al.*, 2010). Concernant la gliogenèse, elle ne commence pas avant E17 pour se terminer après la naissance E21 en période post-natale. C'est pourquoi certains auteurs ont suggéré que la formation des jonctions serrées serait initiée par les neurones et/ou les cellules progénitrices cérébrales plutôt que par de la glie différenciée, au moins dans un premier temps (Daneman *et al.*, 2010). Par exemple, dans une lignée de cellules endothéliales cérébrales de rat (RBE4), il a été démontré que les astrocytes et le collagène de type IV induisaient l'expression de l'occludine au sein des cellules endothéliales que si ces dernières étaient mises en contact avec des cellules neuronales (Schiera *et al.*, 2005). Une autre étude impliquant une co-culture de cellules endothéliales cérébrales et de progéniteurs neuronaux a démontré que ces derniers induisaient une diminution de la perméabilité paracellulaire et une augmentation de la résistance électrique, suggérant l'induction du phénotype de BHE au niveau des cellules endothéliales (Weidenfeller *et al.*, 2007).

Il est intéressant de noter que la perte de l'intégrité de la BHE en réponse à une modification pathologique du débit sanguin cérébral (ischémie, hémorragie ou dommages traumatiques) pourrait

être un événement compensatoire plutôt qu'une simple rupture anatomique (Lee *et al.*, 2012). La communication entre les neurones et l'endothélium cérébral pourrait être réalisée soit par une innervation directe de l'endothélium soit par l'intermédiaire des pieds astrocytaires, soit les deux comme cela a été évoqué dans le rôle des astrocytes en tant que lien entre les neurones et l'endothélium. De telles observations révèlent l'importance de la régulation croisée des cellules de l'UNGV. L'analyse détaillée des acteurs moléculaires mis en scène par les différents types cellulaires permettent de définir deux concepts : le concept de barrière physique et le concept de barrière fonctionnelle.

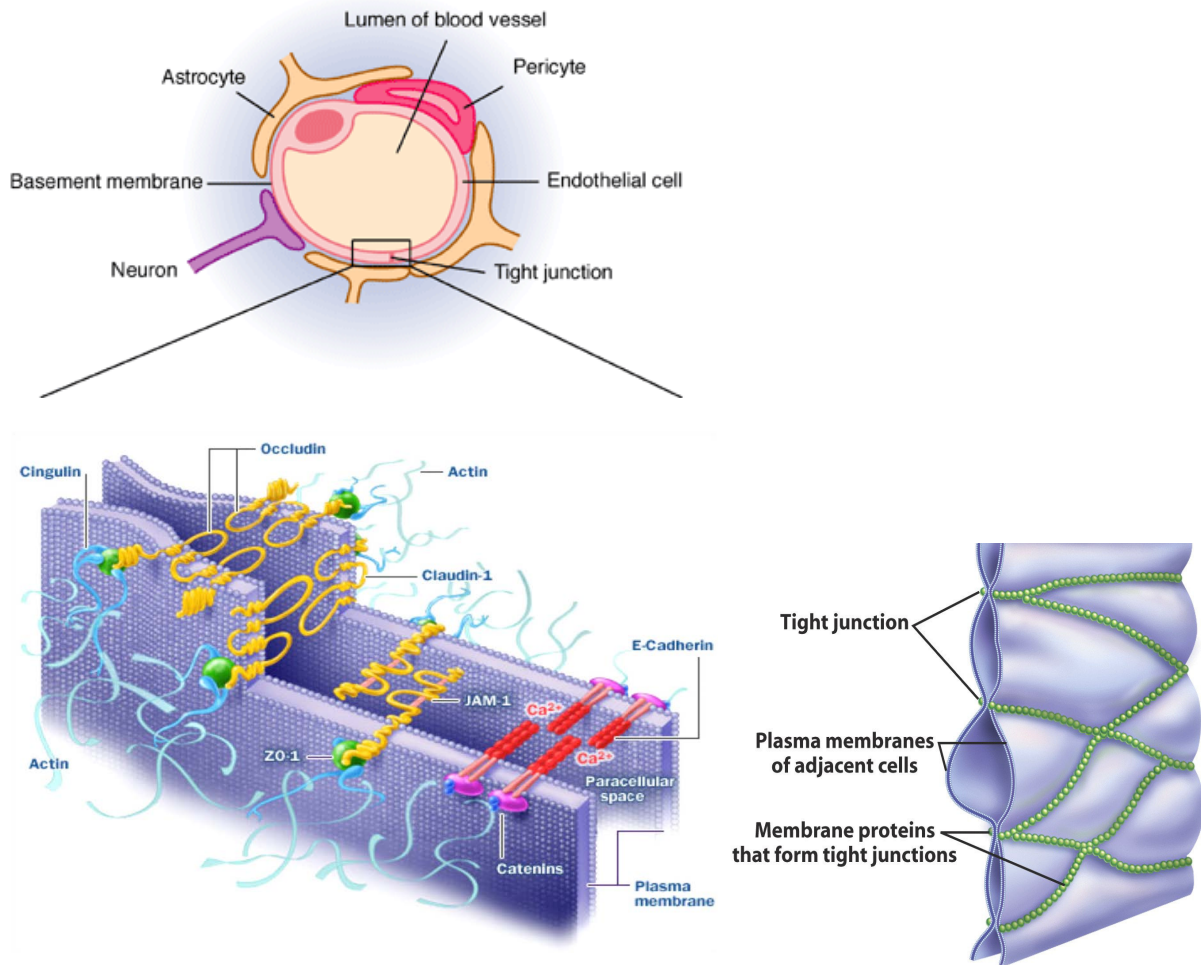
## **V. La BHE, concept de barrière physique**

L'une des particularités de la BHE est la présence des jonctions serrées et jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales des capillaires cérébraux scellant littéralement l'espace intercellulaire. La mise en place des jonctions intercellulaires joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie du compartiment cérébral en empêchant le flux paracellulaire par diffusion passive des molécules plasmatiques vers le parenchyme cérébral. Contrairement au système vasculaire du tissu hépatique, l'objectif n'est pas de filtrer les molécules plasmatiques mais de protéger le tissu nerveux de celles-ci. Cependant, ces jonctions intercellulaires n'assument pas à elles seules la régulation de la perméabilité de la BHE. Les cellules endothéliales cérébrales se caractérisent également par une faible densité de vésicules d'endocytose et de pinocytose et par l'absence de canaux transendothéliaux limitant également le flux transcellulaire.

### **A. Les protéines de jonctions intercellulaires endothéliales**

L'espace entre les cellules endothéliales de la BHE est caractérisé par la présence d'un complexe jonctionnel incluant des jonctions adhérentes (JA) ainsi que des jonctions serrées (JS) qui s'organisent et se polarisent dans un ordre précis de la membrane apicale en contact avec la lumière du capillaire (sang) jusqu'à la membrane basolatérale en contact avec le compartiment abluminal (parenchyme nerveux) (Bazzoni et Dejana, 2004). La structure de ces complexes fait interagir entre elles des protéines transmembranaires et cytosoliques reliées entre elles et au réseau d'actine intracellulaire (Huber *et al.*, 2001; Hawkins et Davis 2005) (Figure 6).





**Figure 6 :** Les cellules de l'UNGV sont responsables du maintien de l'intégrité de la BHE par l'induction de jonctions adhérentes (JA) et de jonctions serrées (JS, tight junction) hautement différenciées entre les cellules endothéliales. Ces JS se situent préférentiellement du côté apical (sang) et permettent la polarisation de l'endothélium cérébral. Les protéines majoritaires au niveau de l'endothélium cérébral sont l'occludine, la claudine 5 et la zonula occludens 1 (ZO1). Elles protègent le parenchyme nerveux de la diffusion paracellulaire de molécules du compartiment sanguin vers le tissu nerveux. Les claudines forment le squelette des jonctions serrées en se dimérisant de façon homophile avec les claudines de la cellule adjacente. Les jonctions serrées sont également constituées d'une série de protéines cytoplasmiques : les protéines ZO qui servent de protéines de reconnaissance pour le placement des jonctions serrées et aussi de support pour les protéines de transduction du signal. La cinguline est une protéine de type myosine double brin qui se lie préférentiellement à ZO1 par sa partie globulaire. L'actine a des sites de liaison sur les ZO, l'occludine et les claudines. La JS repose sur une zone de contact intercellulaire, constituée par des molécules d'adhésions telles que les « junctional adhesion molecules (JAM) » ainsi que sur la présence de JA (cadherines et catenines) (Adapté de Wolburg *et al.*, 2003).

## 1. *Les jonctions serrées*

Grâce aux jonctions serrées, l'endothélium des capillaires cérébraux peut être considéré comme un endothélium de type « continu » (Figure 3). La présence de ces jonctions restreint la diffusion des ions (Hansen *et al.*, 1977) et limite le passage des molécules hydrophiles non électrolytes (Oldendorf, 1971), ce qui confère à l'endothélium une forte résistance électrique transendothéliale et une perméabilité paracellulaire très faible (Huber *et al.*, 2001). Les jonctions serrées sont un complexe dynamique qui fait interagir des protéines transmembranaires et des protéines intracytoplasmiques.

### a) *Les protéines transmembranaires*

Les protéines transmembranaires incluent l'occludine, les claudines et les JAM respectivement dans leur ordre de disposition de la membrane apicale vers la membrane basolatérale.

L'occludine a été la première protéine transmembranaire identifiée des jonctions serrées. Les cellules endothéliales non cérébrales (intestinales, rénales et cardiaques) expriment peu l'occludine qui se répartit alors de manière discontinue dans les membranes cellulaires. A l'inverse, dans les cellules endothéliales cérébrales, l'occludine est fortement exprimée et elle se répartie uniformément à la périphérie des cellules. Il s'agit d'une phosphoprotéine d'approximativement 65 kDa dont le degré de phosphorylation va influencer directement sa localisation cellulaire. Les formes les moins phosphorylées sont localisées dans la membrane basolatérale et le cytoplasme, alors que la forme la plus phosphorylée se concentre exclusivement en périphérie au contact des autres cellules (Sakakibara *et al.*, 1997).

Les claudines sont également des protéines phosphorylées de 20 à 27 kDa avec 4 domaines transmembranaires qui portent à leur extrémité C-terminale un domaine homologue extrêmement conservé leur permettant d'interagir avec plusieurs protéines cytoplasmiques telles que ZO1, 2 et 3. A l'opposé, les domaines extracellulaires sont capables de former des dimères avec leurs homologues de la cellule adjacente. La liaison ainsi formée permet une adhésion entre les deux membranes plus forte que celle produite par l'occludine. Les claudines sont exclusivement trouvées au niveau des jonctions serrées. Au niveau des cellules endothéliales de la BHE, les claudines 3, 5, et 12 sont fortement exprimées avec une expression majoritaire de la claudine 5 (Wolburg *et al.*, 2003).

Le troisième type de protéines transmembranaires est représenté par les JAM (40 kDa) qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Certains composants des JAM peuvent interagir avec ceux des jonctions serrées tel que ZO1. L'existence de cinq membres de cette famille a

été rapportée. Elles jouent un rôle important dans la formation des jonctions serrées et dans l'acquisition de la polarité cellulaire (Ebnet *et al.*, 2004).

#### b) **Les protéines intracytoplasmiques**

Les protéines intracytoplasmiques incluent les zonula occludens (ZO) et la cinguline. Elles sont associées aux protéines transmembranaires et permettent leur organisation et leur connexion avec le cytosquelette d'actine. Les protéines ZO1 (220 kDa), ZO2 (160 kDa), ZO3 (130 kDa) appartiennent à la famille des guanylates kinases associées aux membranes (membrane associated guanylate kinase, MAGUK). ZO1 est la première protéine associée aux jonctions serrées à avoir été identifiée (Stevenson *et al.*, 1986). Son absence au sein du complexe protéique entraîne une augmentation de la perméabilité endothéliale (Abbruscato *et al.*, 2002) ce qui lui confère un rôle essentiel dans la stabilisation des jonctions serrées. ZO2 et ZO3 possèdent une structure similaire à celle de ZO1 bien que leur fonction propre n'ait pas encore été approfondie.

La Cinguline est un dipeptide (140 kDa) localisé sur la face cytoplasmique des jonctions serrées. La cinguline aurait un rôle dans la transduction de la force mécanique générée par la contraction de l'actine et de la myosine, pouvant agir sur la perméabilité au niveau paracellulaire (Guillemot *et al.*, 2004).

#### 2. **Les jonctions adhérentes**

Les jonctions adhérentes remplissent plusieurs fonctions, comme l'initiation et la stabilisation de l'adhésion cellule-cellule, la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que la régulation de la signalisation intracellulaire. Elles sont constituées principalement de protéines transmembranaires de la famille des cadhérines et d'un groupe de protéines cytoplasmiques appelées caténines (Gumbiner et Simons, 1986). Les cadhérines font partie d'une famille de glycoprotéines possédant un domaine transmembranaire. Elles interagissent entre elles par reconnaissance homotypique en présence de calcium régulant l'adhésion cellulaire. Les cellules endothéliales expriment la cadhérine 5, appelée vascular endothelial-cadhérine (Bazzoni *et al.*, 2004) et elle joue un rôle important dans la stabilisation des jonctions adhérentes (Vestweber *et al.*, 2009). Les caténines sont des protéines intracytoplasmiques se liant aux cadhérines et assurant la communication entre les jonctions serrées, les jonctions adhérentes et le cytosquelette d'actine.

Enfin, l'actine, protéine structurale du cytosquelette cellulaire, intervient dans la mise en place et le maintien de ce complexe jonctionnel. La forme globulaire de l'actine se polymérise sous la forme de filaments (F-actine), dont la dynamique donne au cytosquelette l'infrastructure nécessaire au maintien de la morphologie cellulaire. L'augmentation de la résistance électrique des vaisseaux

cérébraux est associée à la redistribution de la F-actine (Rubin *et al.*, 1991). En l'absence de jonctions serrées, l'actine filamenteuse est diffuse et répartie dans tout le cytoplasme de la cellule endothéliale. À l'inverse, lorsque les cellules endothéliales présentent des jonctions serrées, la F-actine est localisée principalement au niveau de la membrane plasmique et le marquage au niveau du cytoplasme est nettement atténué. L'actine est capable de se lier aux protéines ZO, aux claudines et à l'occludine et joue un rôle important dans la modulation de la perméabilité de la BHE en conditions physiologiques et pathologiques (Lai *et al.*, 2005).

Ce complexe jonctionnel bloque la diffusion passive paracellulaire de nombreuses molécules (protéines, lipides dont le cholestérol, sucres acides aminés etc...) du plasma vers le tissu nerveux. Afin d'approvisionner le tissu nerveux en nutriments, les cellules endothéliales cérébrales possèdent, comme dans les autres endothéliums, un mécanisme d'endocytose ou simple pinocytose permettant de capter des molécules plasmiques et de les diriger vers leur compartiment lysosomal pour dégradation et/ou exploitation à des fins fonctionnelles et/ou structurelles.

### 3. *Les vésicules transendothéliales limitantes*

Les cellules endothéliales cérébrales se différencient des autres cellules endothéliales par un nombre limité de vésicules. De plus, les canaux transendothéliaux qui proviennent de la fusion de plusieurs vésicules sont rares (Simionescu *et al.*, 2009). Les vésicules se déplacent librement entre la membrane apicale en contact avec compartiment luminal (sang) et la membrane basolatérale en contact avec le compartiment abluminal (parenchyme nerveux). Le nombre limité de vésicules a pour conséquence de limiter les échanges entre les compartiments, et de protéger l'homéostasie cérébrale. La corrélation entre le nombre de vésicules présentes au niveau des cellules endothéliales de différents tissus (muscle, poumon, SNC entre autres) et la perméabilité aux macromolécules du lit vasculaire a été étudiée et révèle que le nombre de vésicules ne suffit pas à prédire la perméabilité du tissu vasculaire aux macromolécules. Il semblerait que la faible perméabilité de la BHE pour les macromolécules soit corrélée au faible taux d'expression des récepteurs spécifiques pour ces molécules plutôt qu'à une inhibition du mécanisme d'endocytose (Stewart, 2000). Nous reviendrons sur ce point dans le chapitre concernant le transport spécifique de molécules essentielles au fonctionnement cérébral.

Les caractéristiques de la BHE ne se limitent pas aux propriétés de restrictions physiques conférées par les jonctions serrées et l'existence d'un transport vésiculaire réduit. En effet, d'autres verrous restreignent l'échange de molécules entre le sang et le cerveau. Les capillaires cérébraux possèdent en effet des enzymes spécifiques et des pompes d'efflux permettant de participer au maintien de l'homéostasie cérébrale.

## VI. La BHE, concept de tri sélectif endothélial et neuroprotection

### A. Les enzymes

De nombreuses enzymes du métabolisme sont exprimées dans les cellules endothéliales cérébrales. Les enzymes les mieux connues intervenant dans cette barrière métabolique sont la phosphatase alcaline (PAL), la monoamine oxydase B (MAO-B) (Lasbennes *et al.*, 1988) et la gamma-glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT) (Méresse *et al.*, 1989; Dehouck *et al.*, 1990; Lawrenson *et al.*, 1999). La PAL est présente dans de nombreux tissus où elle a pour rôle d'hydrolyser les métabolites phosphorylés et de contrôler le transport d'esters de phosphates et d'ions phosphates. Tout comme la  $\gamma$ -GT, cette enzyme est abondante au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Meyer *et al.*, 1990; Lawrenson *et al.*, 1999). La MAO dégrade les neurotransmetteurs monoaminergiques (dopamine, sérotonine, noradrénaline, adrénaline) et limite ainsi les échanges transcellulaires de ces neurotransmetteurs et de leurs précurseurs du sang vers le cerveau (Betz *et al.*, 1980). La  $\gamma$ -GT représente l'enzyme la plus caractéristique de la BHE (Meyer *et al.*, 1990). Il s'agit d'une glycoprotéine associée à la membrane. C'est un hétérodimère fortement glycosylé dont l'activité permet de catalyser le transfert de résidus  $\gamma$  du glutamyl d'un peptide donneur (essentiellement le glutathion) à un peptide accepteur (Meyer *et al.*, 1990). Bien que son activité soit plus élevée au niveau des cellules endothéliales de la BHE, elle est présente dans d'autres types cellulaires (Wolff et Bär, 1972), notamment au niveau des péricytes (Frey *et al.*, 1991). La  $\gamma$ -GT semble impliquée dans le transport et l'excrétion de nombreux acides aminés à travers la BHE dont l'accumulation cérébrale peut être neurotoxique, ce qui confère à cette enzyme un rôle neuroprotecteur. D'autres enzymes telles que les cytochromes P450 mono-oxygénases, les NADPH-cytochromes P450 réductases, les glucurosyl transférases, les glutathion peroxydases et les époxyde hydrolases participent à la fonction de détoxification de la BHE (Gherzi-Egea *et al.*, 1995). Bien que ces enzymes soient surtout exprimées au niveau des plexus choroïdes, elles sont responsables de la dégradation de certains xénobiotiques au niveau de la BHE.

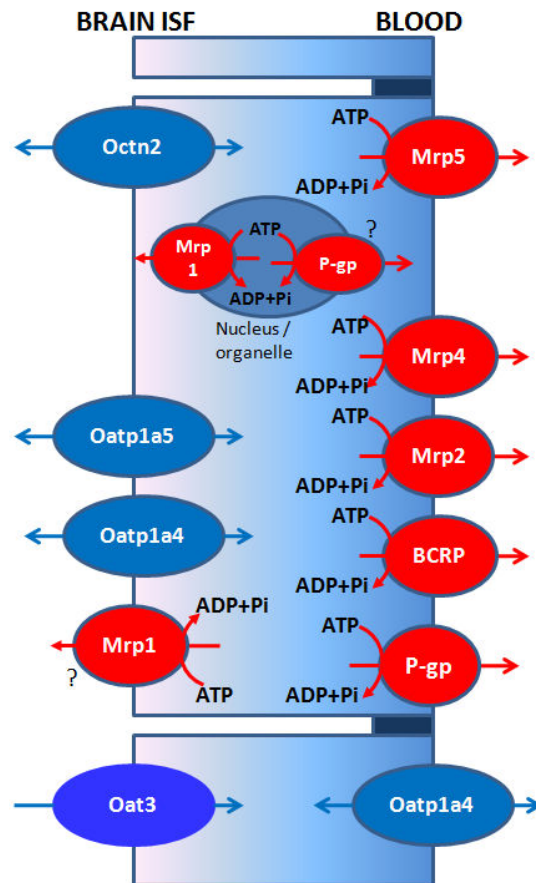
Une autre série d'enzymes, les lipoprotéines lipases présentes dans le glycocalix, confère à la batterie d'enzymes endothéliales cérébrales une autre fonction neuroprotectrice. Ces enzymes permettraient de trier les acides gras essentiels polyinsaturés de type Omega 3 tel que l'acide arachidonique et son dérivé l'acide docosahexaénoïque (DHA) contenus dans les HDL-ApoAI plasmatiques, captés par des récepteurs « scavenger » exprimés à la BHE (Cf paragraphe : Transporteurs d'acides gras).

En complément de ces enzymes (i) de tri sélectif et (ii) neuroprotectrices, l'endothélium de la BHE présente un degré supplémentaire de protection de l'homéostasie cérébrale grâce à l'expression de transporteurs d'efflux qui agissent en synergie pour limiter la pénétration cérébrale de nombreux composés (Shawahna *et al.*, 2013).

### **B. Les pompes d'efflux : xénobiotiques et peptide $\beta$ amyloid**

Les pompes d'efflux participent à l'excrétion active de molécules à la fois endogènes et exogènes permettant de protéger et détoxifier le SNC. Un grand nombre de médicaments liposolubles développés pour passer facilement les membranes cellulaires pénètrent très peu le parenchyme cérébral en raison de leur élimination par les transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) présents au niveau de la BHE (Seelig, 2007).

Les gènes codant pour les transporteurs ABC sont regroupés en sous-familles selon l'organisation de leurs domaines et l'homologie de leurs séquences en acides aminés. Chez l'homme, 49 gènes ABC sont classés en sept sous-familles de A à G (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF et ABCG) (Sagare *et al.*, 2012). Les trois principales sous-familles impliquées dans les propriétés de la BHE sont : (i) la sous-famille ABCB dont le membre principal est ABCB1 ou P-glycoprotéine (P-gp), la première pompe d'efflux à avoir été découverte (Juliano et Ling 1976), (ii) ABCC pour la sous famille des multidrug resistance associated proteins (MRP) dont MRP1, MRP2, MRP4 et MRP5 et enfin (iii) ABCG appelées aussi Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) (Cooray *et al.*, 2002). La plupart des transporteurs ABC requièrent la liaison d'une molécule d'adénosine tri phosphate (ATP), dont le niveau est maintenu par l'abondance en mitochondries des cellules endothéliales de la BHE, puis son hydrolyse pour produire l'énergie nécessaire à l'efflux du substrat à travers la membrane cellulaire (Figure 7).



**Figure 7** : Schéma montrant la distribution des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette) au niveau de l'endothélium cérébral entre le compartiment sanguin et les fluides interstitiels du tissu nerveux. Les membres de la famille ABC sont présentés en rouge. Les autres types de pompes d'efflux sont en bleu (non détaillées dans ce manuscrit). Au niveau des cellules endothéliales cérébrales, de nouvelles données indiquent que les P-gp pourraient être également présentes au niveau des organelles et de l'enveloppe nucléaire (Adapté de Redzic, 2011).

La P-gp et les BCRP effluent préférentiellement de larges molécules hydrophobes, neutres ou chargées positivement mais ayant une très petite masse moléculaire entre 200 et 2000 Daltons tandis que les transporteurs de la famille MRP effluent les molécules hydrophobes non chargées et les composés anioniques solubles dans l'eau. Parmi ces molécules se trouvent des cations organiques, des bases organiques faibles, des anions organiques et des dérivés polypeptidiques. Ces transporteurs sont surtout étudiés du fait de leur implication dans la biodisponibilité des médicaments, puisqu'ils sont responsables de leur efflux des tissus (Löscher et Potschka, 2005), notamment dans les lignées tumorales. Les cellules tumorales rendues résistantes à un cytostatique particulier pourraient développer une résistance croisée envers d'autres cytotoxiques de structure et de fonctions différentes et présenter un phénotype de résistance multiple aux médicaments (MDR). En effet, de nombreux médicaments ou substances actives sont également pris en charge par ces

transporteurs d'efflux : opioïdes, antibiotiques, bloqueurs de canaux calcium, molécules chimiothérapeutiques, immunosuppresseurs, médicaments contre le VIH (Stenehjem *et al.*, 2009). Toutefois, ces transporteurs ne sont pas spécifiques de la BHE puisque certains sont trouvés dans les tissus sains ayant une fonction excrétoire tels que les cellules épithéliales des canaux biliaires et pancréatiques, l'épithélium des bronches et bronchioles, les hépatocytes, les cellules du tubule contourné proximal du rein, les cellules endothéliales des capillaires placentaires et testiculaires (barrière hémato-testiculaire) et dans les capillaires cérébraux (Ceckova-Novotna *et al.*, 2006). La P-gp est également largement distribuée au niveau des organes et des tissus et les protège des xénobiotiques (pesticides, médicaments, antibiotiques).

Les pompes d'efflux protègent la fonctionnalité des neurones selon 2 axes : (i) une restriction des échanges entre le compartiment plasmatique et les cellules endothéliales sous la forme d'un efflux des xénobiotiques et molécules endogènes plasmatiques dont la fluctuation ne doit pas impacter sur le fonctionnement cérébral et (ii) un efflux des molécules endogènes sous la forme de produits de dégradation des métabolismes endothélial et cérébral vers la circulation plasmatique.

Récemment, la famille des pompes d'efflux de type ABC présente à la BHE a été impliquée, directement ou indirectement, dans la chaîne d'interaction aboutissant à l'efflux du peptide  $\beta$  amyloïde intracérébral vers la circulation plasmatique. Brièvement, l'accumulation du peptide  $\beta$  amyloïde intracérébral est une des conséquences de la pathologie d'Alzheimer (Schindowski *et al.*, 2008) qui implique également la BHE par (i) la présence de récepteurs pour le peptide  $\beta$  amyloïde (Girouard et Ladecola, 2006) et (ii) sa capacité à produire et dégrader les peptides  $\beta$ -amyloïdes (Crossgrove *et al.*, 2007). Les pompes d'efflux ABCA1, ABCG2, ABCG4 (BCRP) seraient également impliquées dans l'efflux cérébral des peptides  $\beta$  amyloïde 1-40 (Do *et al.*, 2012). ABCB1 (P-gp) serait aussi impliquée directement dans l'efflux du peptide  $\beta$  amyloïde (Lam *et al.*, 2001) et *in vitro* son expression serait diminuée au niveau des cellules endothéliales cérébrales par le peptide  $\beta$  amyloïde lui-même (Kania *et al.*, 2011).



## **CHAPITRE II : LE SNC ET SES BARRIERES, IMPACT DE L'INFLAMMATION**

La grande majorité des désordres affectant directement ou indirectement le SNC sont associés à une composante inflammatoire qui représente une part importante dans l'évolution des lésions cérébrales, sans en être la cause principale, tels que (i) les désordres neuro-dégénératifs : accident vasculaire cérébral (AVC) ou un dommage des tissus suite à une hypoxie/ischemie, résultant par exemple d'un arrêt cardiaque prolongé, épilepsie, sclérose en plaques (Petry *et al.*, 2010), maladie des neurones moteurs, maladie d'Alzheimer, maladie de Parkinson, maladie de Huntington, (ii) les cancers de type glioblastome, voire (iii) des maladies psychiatriques : dépression, anxiété et schizophrénie (Lucas *et al.*, 2006). L'inflammation du SNC a lieu également dans des conditions normales de défense contre un agent infectieux. En première instance, l'inflammation fait partie du processus de guérison tissulaire. Différents travaux ont abordé l'impact de la neuro-inflammation sur le tissu nerveux et l'implication de la BHE dans ce processus global. Les mécanismes mis en place lors de la neuro-inflammation impliquent des partenaires cellulaires locaux de l'UNGV ainsi que des partenaires moléculaires tels que des cytokines et chimiokines dont la balance, tissu-spécifique, permet de maintenir un équilibre constitutif. Suite à un stimulus, la réponse inflammatoire peut être modulée par l'activation ou l'inhibition des partenaires cellulaires et moléculaires avec pour conséquence une modulation à la hausse ou à la baisse de l'inflammation.

## **I. Activation de la microglie et invasion leucocytaire**

Initialement, en raison des barrières physiques (BHE, BSME et BHL), le SNC fut envisagé comme un organe protégé du système immunitaire avec une absence totale d'immuno-surveillance. Depuis, le SNC est plutôt considéré comme immuno-spécialisé du fait de la présence des cellules microgliales et d'une immunosurveillance constante.

### **A. Les cellules microgliales et les astrocytes**

Les cellules microgliales sont considérées comme les macrophages spécialisés du SNC. Elles sont capables de reconnaître le « non-soi » dans la réponse immunitaire. Les astrocytes sont également importants dans la réponse immunitaire. Ils reconnaissent aussi le « non-soi » tels que les agents infectieux. La microglie et les macrophages du sang peuvent être activés en duo par les dommages ou l'infection locale du SNC ainsi que dans différentes pathologies comme la maladie d'Alzheimer (McGeer et McGeer, 1999) ou la sclérose en plaques (Petry *et al.*, 2010). Dans le cas de la maladie de Parkinson, la microglie activée envahit la substance noire contenant les neurones dopaminergiques en dégénérescence (Whitton, 2007). Cette activation microgliale est rapide et entraîne la libération de médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs pro- ou anti- inflammatoires provenant du foyer vont réguler l'étendue de la propagation de l'inflammation.

## **B. Protection et destruction locale : le recrutement leucocytaire**

Une fois activées, les cellules microgliales migrent vers le tissu infecté ou lésé et libèrent des cytokines, médiateurs pro-inflammatoires et facteurs trophiques ayant un effet protecteur ou délétère sur les cellules environnantes (Lucas *et al.*, 2006). Cette activation au niveau local va également engendrer une cascade inflammatoire par la sécrétion de cytokines qui induisent la sécrétion de chimiokines et l'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales de la BHE, responsables du recrutement local puis de la pénétration de leucocytes circulants et d'immunoglobulines à travers la BHE (Farina *et al.*, 2007).

Dans la sclérose en plaques et son modèle expérimental, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), le SNC est envahi par des cellules T et des macrophages qui endommagent la gaine de myéline des axones, conduisant à une perte de fonction et à la mort neuronale (Lucas *et al.*, 2006 ; Petry *et al.*, 2010). L'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique (IRM) a été utilisée en tant que marqueur de diagnostic et de suivi de l'évolution de cette pathologie (Petry *et al.*, 2007). Du fait de la présence de la BHE, cette invasion leucocytaire du SNC est tout de même moins rapide que celle des autres organes. L'utilisation d'antagonistes, en particulier un anticorps thérapeutique dirigé contre l'intégrine alpha-4 (very late antigen 4, VLA-4), exprimé par les cellules T et responsable de leur adhésion à l'endothélium de la BHE par l'intermédiaire de VCAM-1, ont été utilisés afin de supprimer leur pénétration cérébrale (DeLoire *et al.*, 2004).

## **II. Les partenaires moléculaires de la neuroinflammation**

### **A. Les Cytokines**

Plus de 100 cytokines ont été identifiées à ce jour (Lucas *et al.*, 2006). Il est difficile d'en donner une définition précise en raison de leur nature variée. Elles sont plus généralement surproduites en réponse à une inflammation ou un dommage des tissus. Elles ont une masse comprise entre 8 et 26 kDa et sont souvent libérées pour agir localement en modifiant la fonction des tissus. Les cytokines sont en général classées en deux groupes : les cytokines pro-inflammatoires et les anti-inflammatoires (Szelenyi, 2001). Parmi les cytokines pro-inflammatoires se trouvent : IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18 et GM-CSF. Les cytokines anti-inflammatoires comptent : IL-4, IL-10, IL-13, et TGF- $\beta$  (Cavaillon, 2001).

A l'état basal dans le cerveau, il existe une « expression constitutive » et un équilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires et donc entre les signaux neuro-dégénératifs et neuro-protecteurs qui contribuent aux fonctions physiologiques normales du SNC. Les cytokines ne sont pas seulement impliquées dans l'invasion leucocytaires et la réponse immunitaire. Les cytokines, aussi

bien au niveau du SNC que périphérique, sont des immunorégulateurs et des neuromodulateurs (Szelenyi, 2001). Elles sont soit sécrétées par les cellules du SNC soit importées de la circulation plasmatique. Par exemple, IL-1, IL-6 et TNF- $\alpha$  pénètrent la BHE selon un mécanisme saturable (Plotkin *et al.*, 2000 ; Pan et Kastin, 2002 ; Banks *et al.*, 2002-2003) et ont un rôle de médiateurs entre l'inflammation périphérique et centrale. Ces mêmes cytokines, IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ , peuvent également être produites dans le SNC par les cellules astrocytaires et microgliales, pour exemple en réponse à l'accumulation du peptide  $\beta$ -amyloïde intra-cérébral.

## 1. Cytokines pro-inflammatoires et transport à la BHE

### a) **IL-1**

Les cytokines de la famille IL-1 sont non seulement des acteurs pro-inflammatoires, mais elles auraient aussi un rôle soit neuro-protecteur, soit neuro-toxique (Szelenyi, 2001). Elles sont impliquées dans l'induction de la fièvre, la diminution de l'appétit et du sommeil. Elles sont exprimées par les cellules endogènes du SNC mais à de faibles niveaux dans le tissu nerveux sain. Lors du processus inflammatoire, ce sont d'abord les cellules microgliales qui expriment IL-1 puis les astrocytes. Les oligodendrocytes, les neurones, les cellules vasculaires et les cellules immunitaires circulantes peuvent aussi produire l'IL-1 (Lucas *et al.*, 2006). La famille des IL-1 comprend plusieurs membres dont IL-1 $\beta$  qui, pour être actif, doit être clivé par une protéase de la famille des capsases. Des études ont montré une augmentation du niveau d'IL-1 localement dans les lésions cérébrales et dans le LCR des patients atteints de la maladie d'Alzheimer, de la démence associée au VIH, de la sclérose en plaques, de la maladie de Parkinson et de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Griffin *et al.*, 1989; Zhao et Chen 2014). Il existe des études contradictoires de cette augmentation d'IL-1 dans le LCR des patients qui peut s'expliquer par la variabilité entre les patients selon les stades d'évolution de la pathologie (Tarkowski *et al.*, 2003). Dans le cas de l'épilepsie, la rupture de la BHE et la présence, entre autres d'IL-1 $\beta$  dans le LCR, agit sur l'influx des ions calcium, inhibe la réabsorption du glutamate par les astrocytes et augmente la libération du glutamate via la production de TNF- $\alpha$  (Oby et Janigro, 2006). L'IL-1 régule positivement l'expression de la protéine précurseur du peptide  $\beta$ -amyloïde et stimule le clivage de ce précurseur en fragments à potentiel amyloïde dans les neurones (Rothwell et Luheshi, 2000).

### b) **IL-6**

Les cytokines de la famille IL-6 sont impliquées dans l'induction de la fièvre. Elles ont également un rôle neuro-protecteur. L'IL-6 stimulerait la production de NGF par les astrocytes et agirait en tant que facteur neurotrophique en synergie avec le NGF. L'IL-6 peut aussi induire la

différenciation neuronale. On leur accorde cependant aussi un potentiel à induire la neurodégénérescence (Gadient et Otten, 1997). En effet, l'IL-6 est retrouvée dans des quantités élevées dans le LCR de patients atteints de la maladie de Parkinson et de la maladie d'Alzheimer et dans cette maladie, IL-6 régulerait l'expression du précurseur amyloïde (Gadient et Otten, 1997).

### c) **TNF- $\alpha$**

Le TNF- $\alpha$  est une cytokine pleiotropique synthétisée par une grande variété de cellules et agissant comme médiateur de la réponse inflammatoire dans un grand nombre de tissus. Dans le SNC, les macrophages résidents ainsi que la microglie et les astrocytes peuvent synthétiser cette cytokine pro-inflammatoire et destructrice de tissus. Le TNF- $\alpha$  peut aussi induire l'apoptose des tissus extraneuronaux cicatriciels et ainsi faciliter la régénération des axones endommagés. Dans la pathologie d'Alzheimer, la concentration en TNF- $\alpha$  dans le LCR, mais non dans le sérum, est plus élevée que chez les patients sains. Ce phénomène ne serait pas imputable à une éventuelle déficience de la fonctionnalité de la BHE qui permettrait l'influx de TNF- $\alpha$  (Tarkowski *et al.*, 2003). Cependant, comme pour l'IL-1, cette augmentation du TNF- $\alpha$  n'est pas observée de manière systématique chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Le TNF- $\alpha$  pourrait protéger les neurones contre la toxicité engendrée par les  $\beta$ -amyloïdes par activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Barger *et al.*, 1995).

#### (1) *TNF- $\alpha$ : transport à travers la BHE via un processus RMT*

La présence de transporteurs de cytokines à la BHE permet aux cytokines de passer de la circulation plasmatique vers des sites spécifiques au niveau du SNC sans être dégradées au niveau de l'endothélium cérébral. Une étude a montré que les souris invalidées pour l'un des 3 types de récepteurs liant le TNF- $\alpha$  n'abolissait pas l'influx de TNF- $\alpha$  dans le cerveau et abolissait seulement partiellement l'influx de TNF- $\alpha$  dans la moelle épinière. Par contraste, les doubles mutants ont permis d'abolir complètement le transport du TNF- $\alpha$  vers le parenchyme nerveux. Cette observation a permis d'émettre l'hypothèse d'une synergie des récepteurs TNFR1 (p55) et TNFR2 (p75) permettant de transporter le TNF- $\alpha$  à travers la BHE (Pan et Kastin, 2002). Une étude comparative des propriétés des cellules endothéliales cérébrales versus périphériques a montré que le TNFR2 était plutôt enrichi au niveau des veinules périphériques (MacDonald *et al.*, 2010).

#### (2) *TNF- $\alpha$ : perte d'intégrité de la BHE et glucocorticoïdes protecteurs*

Il existe une dualité dans la littérature concernant l'effet du TNF- $\alpha$  sur la perte d'intégrité de la BHE. Dans la majorité des études, le TNF- $\alpha$  entraîne une perte d'intégrité des monocouches de CEMCs issues de modèles *in vitro* de BHE (Petty et Lo, 2002 ; Stamatovic *et al.*, 2008), quantifiée par

le flux paracellulaire du saccharose, de la fluorescéine, de la cisplatine, de l'inuline, du FITC-dextran avec un poids moléculaire de 3, 4 et 70 kDa ainsi que de l'albumine. Dans d'autres cas, aucun effet sur l'intégrité des monocouches de CEMCs n'a été observé (revue par Deli *et al.*, 2005). La controverse pourrait provenir de différences entre les doses de TNF- $\alpha$  utilisées, le temps d'incubation, voire le niveau de restrictivité initial des différents modèles *in vitro* de BHE utilisés dans ces études. L'effet d'ouverture paracellulaire de la BHE par le TNF- $\alpha$  peut être limité ou inhibé par l'addition de glucocorticoïdes utilisés dans le traitement de nombreuses pathologies affectant le CNS, tel que l'hydrocortisone qui limite la diminution d'expression de l'occludine (Forster *et al.*, 2005, 2008). En effet, à l'état physiologique, l'hydrocortisone induit l'expression de l'occludine (ARNm et protéine) grâce à son interaction avec un glucocorticoid recepteur (GR) et sa liaison putative avec le « glucocorticoïde responsive element » au niveau du promoteur de l'occludine (Forster *et al.*, 2005).

### (3) *TNF- $\alpha$ : inducteur de transcytose à la BHE*

Dans les études utilisant des modèles de BHE *in vitro* où aucune perte d'intégrité de la barrière n'avait été observée, le TNF- $\alpha$  augmentait a contrario la transcytose du LDL, de la transferrine (Descamps *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2005) et de la lactoferrine (Fillebeen *et al.*, 1999). Ces études, bien que controversées, ont permis de mettre en évidence un rôle éventuel du TNF- $\alpha$  dans le trafic des macromolécules à la BHE. Il a également été montré que le TNF- $\alpha$  était responsable d'une augmentation de l'expression (ARNm et protéine) de la P-gp (MDR1) (Yu *et al.*, 2007).

### (4) *TNF- $\alpha$ : cible thérapeutique*

Le TNF- $\alpha$  présente des niveaux sériques élevés dans la pathologie de Huntington (Bonifati et Kishore, 2007). Ainsi, un blocage du TNF- $\alpha$  circulant a été envisagé en tant que cible thérapeutique. La forme soluble du récepteur au TNF- $\alpha$  lie et bloque l'action du TNF ( $\alpha$  et  $\beta$ ) circulant. Bien que son temps de demi-vie soit court, la fusion d'une fraction du récepteur P75 au fragment Fc d'une IgG1 a permis de générer une forme dimérique de 150 kDa (Enbrel-Etanercept) plus stable ayant une activité anti-inflammatoire puissante lorsqu'elle est injectée 2 fois par semaine par voie intraveineuse chez la souris ( $t_{1/2}$  = 102 hrs) (revue par Pardridge et Boado, 2012 ; Sumbria *et al.*, 2013). A défaut de pouvoir pénétrer la BHE, ces inhibiteurs sont largement utilisés en médecine afin de traiter l'inflammation périphérique (Tansey *et al.*, 2009). Cependant, de nombreuses pathologies cérébrales impliquent des processus inflammatoires TNF- $\alpha$ -dépendants. Par exemple, chez des patients atteints de démence vasculaire, la concentration en TNF- $\alpha$  dans le LCR est plus élevée que chez des patients contrôles atteints d'autres maladies, alors qu'il n'y a pas de différences dans leur sérum (Tarkowski *et al.*, 2003). Le remplacement du fragment Fc par un anticorps monoclonal reconnaissant le TfR de rat (OX-26) a permis d'augmenter le transport de la fraction du TNFR à travers la BHE de rat (revue par Pardridge et Boado, 2012).

## 2. *IL-10: cytokine anti-inflammatoire*

L'IL-10, initialement appelé CSIF (cytokine synthesis inhibitory factor), inhibe la production ou l'activité de cytokines comme IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4 et GM-CSF. Elle inhibe aussi la sécrétion des chimiokines et d'autres molécules impliquées dans le processus inflammatoire. Elle augmente la survie des cellules B et T et promeut l'activité des cellules NK. L'effet principal d'IL-10 est de réduire l'inflammation limitant ainsi les symptômes de la maladie d'Alzheimer, des méningites et de la sclérose en plaques (Pestka *et al.*, 2004).

## 3. *TGF- $\beta$ et NF- $\kappa$ B*

### a) *La voie de signalisation TGF- $\beta$*

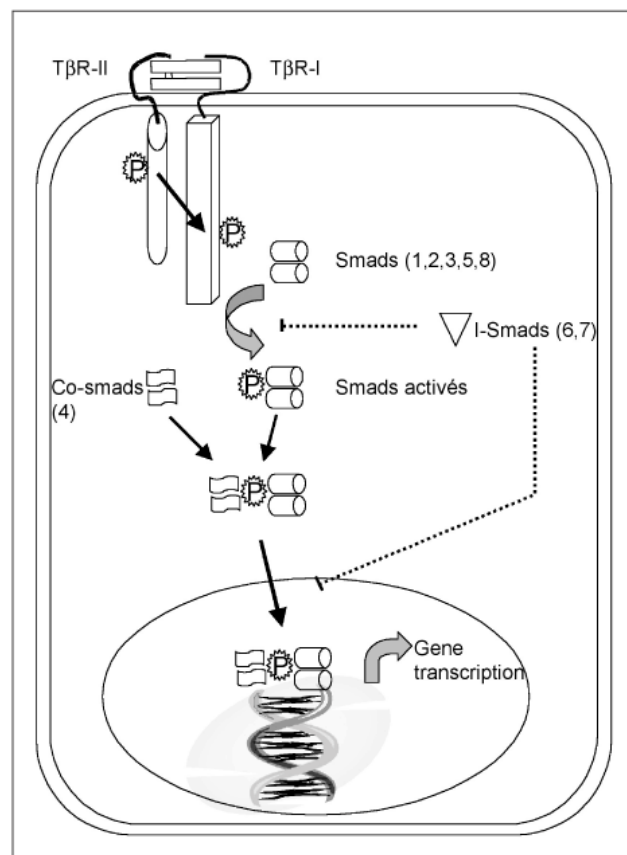
#### (1) *Activité biologique et implication pathologique*

Le transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) est une cytokine appartenant à la famille du TGF- $\beta$  dont les membres possèdent également des propriétés de facteur de croissance. Sa synthèse est ubiquitaire dans tout l'organisme. La voie de signalisation TGF- $\beta$  est impliquée dans pratiquement tous les grands processus physiopathologiques tels que l'inflammation, la réparation tissulaire, la carcinogenèse, la dégénérescence et la sénescence ou plus particulièrement dans les traumatismes, l'ischémie, les pathologies neurodégénératives, les désordres cérébraux vasculaires et la sclérose en plaque. La régulation de son activité biologique est très complexe et comme de nombreux autres médiateurs inflammatoires, son activité biologique peut être contradictoire suivant l'organe ou le tissu considéré. Ainsi, une régulation de l'activité du TGF- $\beta$  et de sa voie de signalisation permettrait de contrôler ses fonctions opposées et essentielles à la santé et au vieillissement sain (Zhao et Chen, 2014).

#### (2) *Mécanisme d'activation*

La sous famille TGF- $\beta$  comprend 3 isoformes, TGF- $\beta$ 1, 2 et 3 qui agissent de façon contextuelle en fonction du type cellulaire et de son environnement, promouvant la survie cellulaire ou induisant l'apoptose, stimulant la prolifération cellulaire ou induisant la différenciation et surtout initiant ou limitant l'inflammation (ten Dijke et Hill, 2004; Massague *et al.*, 2005; Feng et Derynck, 2005). Les trois formes sont exprimées par les neurones, les astrocytes et la microglie. Le TGF- $\beta$ 1 est localisé au niveau des méninges, des ependymocytes et des cellules gliales. TGF- $\beta$ 2 et 3 sont exprimés dans les cellules gliales et les neurones. De plus, du fait de leur régulation hormonale et par des signaux émis lors du développement, TGF- $\beta$ 2 et 3 pourraient avoir un rôle important dans le développement du CNS. L'activité biologique des TGF- $\beta$  est modulée par un complexe de récepteurs constitué des TGF- $\beta$  type 1 (ALK5) et type 2 (T $\beta$ RII) (revue par Massagué *et al.*, 2000). L'endoglin et le

betaglycan sont des co-récepteurs ou récepteurs de type 3, qui modulent la signalisation (ten Dijke et Hill, 2004). La liaison du TGF- $\beta$  au complexe-récepteur entraîne le recrutement et la phosphorylation de la protéine receptor-regulated smad (R-Smad). Une fois phosphorylés, les R-Smad s'associent avec Smad4 et le complexe est transloqué dans le noyau où il se lie au Smad DNA-binding element (SBE) permettant de réguler la transcription génique. Dans le cytosol, des inhibiteurs de R-Smad tels que Smad7 entrent en compétition avec le recrutement et la liaison des R-Smad au récepteur de type I ce qui inhibe la signalisation et oriente le récepteur et son complexe vers la voie de dégradation ubiquitine (Figure 8). Sous l'induction du TGF- $\beta$ , Smad4 peut aussi se lier à HOXA9, un répresseur puissant de la transcription de la phosphoprotéine 1 (SPP1 ou ostéopontine), permettant à Smad3 de passer dans le noyau et de servir alors de facteur de transcription au niveau du promoteur de SPP1 (Itoh *et al.*, 2000).



**Figure 8 :** Voie de signalisation classique du TGF $\beta$  Smad-dépendante. La liaison du ligand TGF- $\beta$  entraîne la phosphorylation des 2 sous unités de son récepteur (type I et type II), la phosphorylation des R-Smad (Smads activés), qui se complexent avec les Co-Smads entraînant la translocation du complexe dans le noyau, et le contrôle de l'expression de gènes cibles en fonction du type cellulaire et du tissu (Adapté de Itoh *et al.*, 2000).



### (3) *Le TGF- $\beta$ et la neuroprotection*

Le rôle important de la voie TGF- $\beta$  au niveau du CNS a été mise en évidence grâce à des souris transgéniques possédant le gène codant pour la luciférase sous le contrôle des promoteurs SBE (Luo *et al.*, 2006). Chez ces souris, le cerveau et surtout l'hippocampe ont présenté une activité TGF- $\beta$  basale supérieure à tous les autres organes. De plus, la présence de formes actives phosphorylées de différentes Smad au niveau des neurones de différentes zones cérébrales pourrait expliquer la variété de ces actions biologiques. La suppression de la fonctionnalité des TGF- $\beta$  induit des dommages sévères et une mortalité embryonnaire chez la souris (Weinstein *et al.*, 2000), corrélés avec une mortalité neuronale généralisée à l'ensemble du cerveau (Brionne *et al.*, 2003). De plus, des mutations entraînant une dysfonction de la voie TGF- $\beta$  ont également été liées à certains cancers (Massague *et al.*, 2000). Le TGF- $\beta$  est considéré en tant que neuroprotecteur en réponse à des toxines ou en prévention de l'ischémie. Une surexpression de TGF- $\beta$  par les cellules gliales permet également de prévenir la neurodégénérescence dans un modèle de lésions cérébrales induites par le kainate (Brionne *et al.*, 2003).

Dans le cas des pathologies neurodégénératives telles que les pathologies d'Alzheimer et de Parkinson, une signalisation TGF- $\beta$  défaillante a été rapportée (Buckwalter et Wyss-Coray, 2004). Dans le cas de la pathologie d'Alzheimer, il a été montré que le taux d'expression du TGF- $\beta$  était inversement proportionnel à la présence des plaques amyloïdes cérébrales, résultat appuyé par une augmentation de la quantité de plaques amyloïdes suite à une réduction de l'expression du TGF- $\beta$ . De plus, la réduction drastique du taux de T $\beta$ RII dans le cerveau des patients atteints de cette pathologie a permis de postuler qu'une défaillance en TGF- $\beta$  pourrait contribuer à l'évolution de la pathologie d'Alzheimer (Tesseur *et al.*, 2006).

Au niveau cellulaire, les neurones primaires déficients en TGF- $\beta$ 1 (Brionne *et al.*, 2003) ou exprimant une sous-unité non fonctionnelle du récepteur T $\beta$ RII, ne survivent pas (Tesseur *et al.*, 2006), confirmant le rôle de la voie de signalisation neuronale du TGF- $\beta$  dans la maintenance et la survie cellulaire. Il existe plusieurs événements intracellulaires pouvant corrélés ce mécanisme. TGF- $\beta$ 1 diminue l'activité de facteurs pro-apoptotiques via la voie NF- $\kappa$ B (König *et al.*, 2005) ou encore rentre en synergie avec des neurotrophines afin de favoriser leurs actions (Revue par Unsicker et Kriegstein, 2002). Une autre facette de l'action neuroprotectrice du TGF- $\beta$ 1 est associée à son potentiel à augmenter l'expression de la laminine, une protéine de la matrice extracellulaire, connue pour favoriser la différenciation et la survie neuronale ainsi que l'apprentissage et la mémorisation.

### (4) *Le TGF- $\beta$ et la BHE*

Au niveau des cellules endothéliales de la BHE, des taux bas de TGF- $\beta$ 1 sont nécessaires à la prolifération et l'angiogenèse alors que des taux élevés entraînent une synthèse de protéines de la

matrice extracellulaire et la différenciation (Goumans *et al.*, 2003). En effet, la voie de signalisation classique Smad-dépendante impliquant ALK1, T $\beta$ RII et Smad1 permet de promouvoir la synthèse de la membrane basale et la différenciation alors que la voie impliquant uniquement ALK1 induit la prolifération et l'angiogenèse (Goumans *et al.*, 2003). Il a été montré que les cellules précurseurs des oligodendrocytes (OPC) secrètent du TGF- $\beta$ 1 soluble et que l'activation de la voie de signalisation TGF- $\beta$ -receptor-MEK/ERK permet de maintenir l'intégrité de la BHE par augmentation de l'expression des jonctions serrées et de l'imperméabilité de la barrière à des molécules de référence (Seo *et al.*, 2014).

Deux récepteurs, ALK1 et endoglin ont été décrits comme essentiels pour l'angiogenèse. Chez l'homme, des mutations héréditaires dans les gènes codant pour l'endoglin et ALK1 sont responsables de « l'hereditary hemorrhagic telangiectasia (HHT) » causant des malformations artério-veineuse et des hémorragies. Inversement, une surproduction de TGF- $\beta$  entraîne une surproduction de matrice extracellulaire qui est néfaste pour la vasculature. De plus, une surexpression du TGF- $\beta$  spécifiquement au niveau vasculaire entraîne un dépôt amyloïde et une dégénérescence vasculaire. Cet effet d'induction d'une fibrose vasculaire est similaire aux conditions pathologiques caractérisées dans les cas de fibroses pulmonaires. La fibrose cérébrovasculaire observée dans l'hypertension ou lors du vieillissement normal pourrait résulter d'une augmentation vasculaire du TGF- $\beta$  entraînant la formation des dépôts amyloïdes cérébrovasculaires. Il est intéressant de savoir que ALK1 est aussi exprimé par les neurones (König *et al.*, 2005). Après une lésion, la signalisation ALK1-dépendante, sous l'effet de son ligand TGF- $\beta$ , induit la neuroprotection par activation de la voie NF- $\kappa$ B (König *et al.*, 2005). En effet, il a été montré que le TGF- $\beta$  joue un rôle critique dans la régulation de la réponse inflammatoire via NF- $\kappa$ B (Le *et al.*, 2004; Ishinaga *et al.*, 2009).

#### **b) Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B**

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B joue un rôle critique dans la régulation de l'inflammation, la réponse immunitaire, la tumorigenèse et la protection contre la mort cellulaire et l'apoptose dans la plupart des tissus en induisant la transcription de gènes impliqués dans la survie cellulaire (Li *et al.*, 2002; Mattson et Meffert, 2006). Dans le cerveau en développement, NF- $\kappa$ B est responsable de la neurogenèse. En condition physiologique, l'expression de NF- $\kappa$ B dans le cerveau antérieur, l'amygdale et surtout l'hippocampe reste élevée pendant tout l'âge adulte (Bhakar *et al.*, 2002). Dans ces régions, NF- $\kappa$ B est majoritairement localisé au niveau des terminaisons synaptiques, des dendrites et des axones et s'active en réponse à des médiateurs tels que les cytokines et les neurotrophines (Mattson et Meffert 2006). NF- $\kappa$ B est aussi présent au niveau de la BHE où son

activation par des médiateurs ayant la capacité ou pas de franchir cette barrière, est cruciale pour l'activation neuronale et le développement (Bhakar *et al.*, 2002).

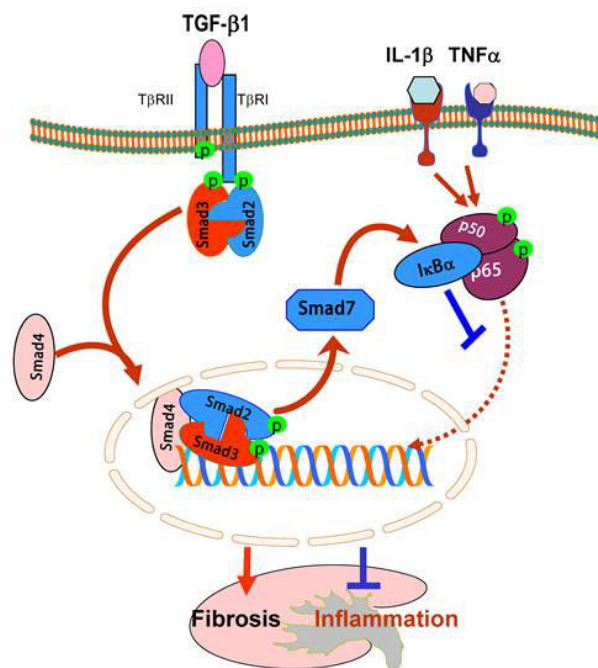
### (1) *Les activateurs*

L'activation de NF- $\kappa$ B au niveau de l'amygdale s'est avérée essentielle pour l'induction des cytokines pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et IL1- $\beta$  en permettant la plasticité synaptique et la consolidation de la mémoire (Mattson et Meffert, 2006). Comme évoqué, l'IL1- $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$  modulent l'activation de leur propre facteur de transcription NF- $\kappa$ B ce qui leur permet de réguler la survie neuronale, la neurogenèse et la potentialisation à long-term (PLT) (Mattson et Meffert 2006; Le *et al.*, 2004). Ces signaux de survie sont également portés par les neurotrophines, dont le nerve growth factor (NGF), qui est également capable d'activer NF- $\kappa$ B. De plus, les cytokines et les neurotrophins s'influencent mutuellement à travers la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Par exemple, il a été démontré que le TNF- $\alpha$  induit l'expression du brain derived neurotrophic factor (BDNF) grâce à l'activation de NF- $\kappa$ B. Certains récepteurs de cytokines et neurotrophines sont également impliqués dans l'activation de NF- $\kappa$ B et régulent la survie cellulaire (TrkA et TNFR2), la mort cellulaire (TNFR1) ou les deux (p75) (Mattson et Meffert, 2006).

### (2) *Les mécanismes d'activation*

NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription dimérique composé de deux sous-unités, p50 (NF- $\kappa$ B1) et p65 (RelA) (Hatada *et al.*, 2000). NF- $\kappa$ B est normalement retenu dans le cytoplasme par sa liaison avec I $\kappa$ B (sous-unité inhibitrice de NF- $\kappa$ B) l'empêchant de pénétrer le noyau pour y exercer son activité. Suite à un stimulus tel qu'une infection bactérienne ou une inflammation, la phosphorylation puis la dégradation de I $\kappa$ B (sous-unité inhibitrice de NF- $\kappa$ B) par des IKKs (I $\kappa$ B kinases), entraîne l'activation et la libération de NF- $\kappa$ B. La phosphorylation d'I $\kappa$ B par les IKKs nécessite l'activation d'IP3, MAPK et du récepteur N-methyl-D-aspartic acid (NMDA). Après sa phosphorylation, I $\kappa$ B est rapidement re-synthétisé alors que le complexe NF- $\kappa$ B pénètre le noyau et déclenche la transcription de gènes NF- $\kappa$ B-dépendants, codant pour des cytokines dont le TNF- $\alpha$ , leur récepteur, des chemokines et des prostaglandines (Bonizzi *et al.*, 2004). Des études ont montré que la dégradation de I $\kappa$ B ne permettait pas une activité transcriptionnelle maximale de NF- $\kappa$ B. En effet, le complexe NF- $\kappa$ B doit subir plusieurs modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation site-spécifique et l'acétylation (Chen *et al.*, 2005). La sous-unité RelA est la cible principale des phosphorylations (Wang *et al.*, 2000; Vermeulen *et al.*, 2003). La sous-unité RelA est également acétylée en plusieurs sites en réponse au TNF- $\alpha$ , son propre produit de transcription (Hoberg *et al.*, 2006). Il a également été démontré que TGF- $\beta$ 1 augmente la transcription du TNF- $\alpha$  de façon NF- $\kappa$ B dépendante grâce à l'acétylation de la sous-unité RelA par la protein kinase A (PKA) (Ishinaga *et al.*, 2009). De plus, l'acétylation de NF- $\kappa$ B ne conduit pas simplement à son activation

mais entraîne des modifications de son activité biologique telles que l'altération de sa liaison à l'ADN et de son activité transcriptionnelle (Gu *et al.*, 2004). Une autre étude contradictoire avec les précédentes montre que le TGF- $\beta$  induit l'expression de Smad7 qui empêcherait la transcription génique NF- $\kappa$ B-dépendante activée par le TNF- $\alpha$ , en empêchant la phosphorylation du complexe p50/p65 tout en activant également I $\kappa$ B (Figure 9). Il a été montré que NF- $\kappa$ B pouvait être impliqué dans la neuroprotection ou la neurodégénérescence en fonction de l'activation variable d'une de ses 2 sous-unités, p50 ou p65. D'autres études ont montré que la réponse suite à l'activation de NF- $\kappa$ B était dépendante des types cellulaires l'exprimant: la mort cellulaire chez les cellules gliales ou la neuroprotection chez les neurones (Bhakar *et al.*, 2002 ; Mattson et Meffert 2006) sans que l'on comprenne encore les mécanismes associés à cette versatilité de fonctions.



**Figure 9** : Schéma de la voie de signalisation TGF- $\beta$  Smad-dépendante. Smad4 se lie à Smad2/Smad3 phosphorylés pour former le complexe Smad qui opère sa translocation dans le noyau pour réguler les gènes cibles y compris Smad7. La régulation positive de Smad7 empêche la phosphorylation du complexe NF- $\kappa$ B/p50/p65 et empêche sa translocation nucléaire en induisant l'expression I $\kappa$ B $\alpha$ . Par conséquent, Smad4 agit comme un inducteur de la fibrose régulée par Smad3 tout en inhibant l'inflammation NF- $\kappa$ B dépendante (Adapte de Lan, 2011; Freudlsperger *et al.*, 2013).

### c) **TGF- $\beta$ : cible thérapeutique**

Du fait de leur potentiel d'action, pas seulement dans les pathologies du CNS mais également dans les pathologies périphériques, les voies de signalisation TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$  sont des cibles thérapeutiques attractives. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des kinases liées au récepteur de

type I, ALK5, a été proposé comme une piste intéressante en préclinique (Ge *et al.*, 2004 ; Bonniaud *et al.*, 2004). Ce concept thérapeutique reprend une stratégie déjà utilisée sur d'autres molécules avec l'imatinib (Glivec®) et le gefitinib (Iressa®) déjà utilisés en clinique. Cependant, le blocage général d'une voie de signalisation aussi ubiquitaire et de réponses opposées en fonction du tissu peut s'avérer complexe. En effet, dans le domaine de la transplantation d'organes, des équipes de recherche tentent de freiner l'activité de TGF- $\beta$  pour éviter la bronchiolite oblitérante (Ramirez *et al.*, 2004) alors que simultanément d'autres tentent de surexprimer la molécule afin d'atténuer l'inflammation liée aux phénomènes d'ischémie-reperfusion (Daddi *et al.*, 2003) que nous reprendrons en tant qu'exemple général à la fin de ce chapitre.

## **B. Les Chimiokines**

Les chimiokines et leurs récepteurs jouent un rôle crucial dans le trafic des cellules immunitaires, et sont d'un intérêt particulier dans le cadre des réponses immunes spécifiques induites dans le SNC : trauma, lésion suite à une hypoxie-ischémie ou encore la sclérose en plaques. Les chimiokines sont responsables du passage des cellules immunitaires de la circulation sanguine vers les tissus environnants, un mécanisme appelé chimiotactisme. Les chimiokines sont une sous famille des petites cytokines de 8 à 14 kDa (revue par Borish et Steinke, 2003). Il existerait une cinquantaine de chimiokines chez l'homme. Elles sont caractérisées par la présence de quatre cystéines en des positions très conservées. Il existe quatre sous-familles de chimiokines (Townson et Liptak, 2003) (Figure 10). Les chimiokines agissent en se liant à des récepteurs couplés à des protéines G. La nomenclature des récepteurs est corrélée à celle des chimiokines puisque les premières lettres correspondent à la sous-famille de chimiokines qu'ils lient. Une même chimiokine est capable de se lier à plusieurs récepteurs et un même récepteur peut être activé par différentes chimiokines (Savarin-Vuillat et Ransohoff, 2007).

### **1. La sous famille CC**

La plus grande sous famille est nommée « CC » à cause des deux cystéines adjacentes. Elle compte parmi ses membres, MCP-1 (CCL-2), MIP-1 $\alpha$  (CCL-3), MIP1 $\beta$  (CCL-4) et RANTES (CCL-5) (Rollins, 1997) responsables du chimiotactisme des cellules immunitaires telles que les monocytes, les éosinophiles, les basophiles, les lymphocytes T et les cellules natural killer (NK).

#### **CCL-2 et son récepteur CCR-2**

CCL-2 (CC chemokine ligand 2) ou MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) est aussi appelée MCAF (macrophage chemoattractant and activating factor). C'est un puissant chimioattractant bien

que son expression et sa concentration dans le SNC reste faible en condition physiologique. CCL-2 peut être exprimée par différents types cellulaires dont les monocytes, les astrocytes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes. Après un trauma ou une lésion du SNC, la concentration cérébrale de CCL-2 augmente rapidement, produite par les astrocytes, la microglie, les neurones et les macrophages résidents dans le SNC (Glabinski et Ransohoff, 1999). Cette production est capable d'attirer sur le lieu de l'inflammation les cellules exprimant son récepteur CCR-2, comprenant entre autres les monocytes, les lymphocytes T, les cellules dendritiques myéloïdes et les cellules NK (Stamatovic *et al.*, 2005). La sclérose en plaques est associée, entre autres, à une activation inappropriée du réseau de chimiokines dont CCL-2 et à une ouverture de la BHE par modulation de la phosphorylation des occludines (Morgan *et al.*, 2007).

Au niveau de la BHE, l'interaction entre les cellules endothéliales et les monocytes conduit à une augmentation de la sécrétion de CCL-2 (ainsi que d'IL-8) qui est indépendante de la réponse précoce de l'IL-1 ou du TNF- $\alpha$ . Le TNF- $\alpha$  joue un rôle critique dans cette maladie en étant un puissant inducteur de l'expression de CCL-2 par les cellules gliales (Owens *et al.*, 2005). En effet, il a été démontré que le traitement de ces cellules en culture par le TNF- $\alpha$  entraîne une augmentation drastique, dose dépendante, de l'expression de CCL-2 (Zach *et al.*, 1997). Il semblerait que le TNF- $\alpha$  module l'expression de CCL-2 via les formes réactives de l'oxygène (FRO). Il semblerait également que CCL-2 puisse auto-réguler négativement sa synthèse et sa libération au niveau neuro-vasculaire (Ge *et al.*, 2008). Une fois passés du sang dans le parenchyme nerveux, les monocytes interagissent avec les astrocytes, par le biais notamment de l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1, ce qui conduit également à une augmentation de la production de CCL-2 par les deux types cellulaires. Cette augmentation de l'expression de CCL-2 est en partie modulée par les cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Andjelkovic *et al.*, 2000). Des souris déficientes en CCL-2 ou en son récepteur CCR2 sont résistantes à l'EAE, empêchant les leucocytes de pénétrer dans le SNC (Mahad et Ransohoff, 2003). CCL-2 peut également induire la production de MMP-9, une métalloprotéinase impliquée dans les dommages tissulaires et l'ouverture de la BHE (Bonoïu *et al.*, 2009).

## 2. *La sous famille CXC*

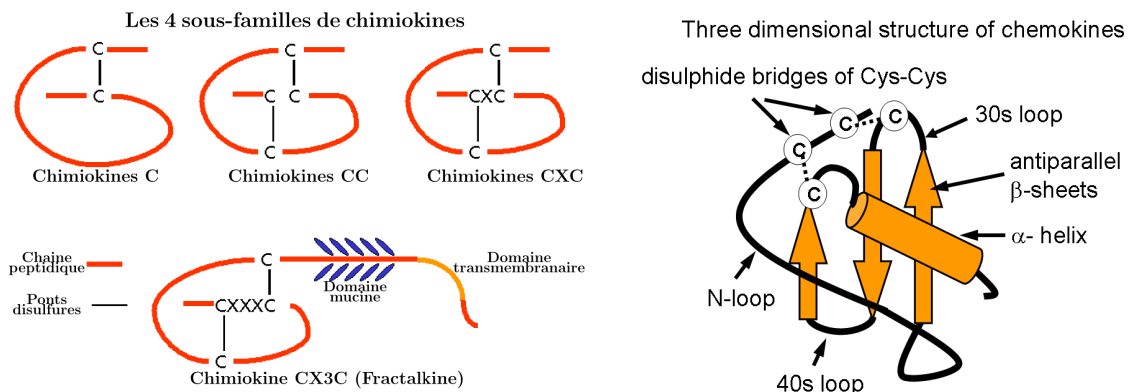
La deuxième sous-famille s'appelle « CXC » du fait de la présence de deux cystéines séparées par un seul acide aminé dans la partie N-terminal (Rollins, 1997). Les chimiokines CXC attirent, selon leur spécificité, soit les polynucléaires neutrophiles, soit les lymphocytes et monocytes.

a) **IL-8 (CXCL8) et son récepteur CXCR2 multiligand**

IL-8 (CXCL8 - initialement appelée MDNCF pour monocyte-derived neutrophilic chemotactic factor) est une chimiokine aux puissantes propriétés pro-inflammatoires, agissant principalement sur les polynucléaires neutrophiles. Elle est fortement régulée et son expression dans les tissus normaux est quasi indétectable (Brat *et al.*, 2005). Elle se lie à son récepteur multiligand CXCR-2 (liant également CXCL-1 et CXCL-2) présent au niveau des projections neuronales (revue par Glabinski et Ransohoff, 1999). Comme CCL-2, IL-8 et son récepteur CXCR-2 sont également impliqués dans de nombreuses pathologies cérébrales telles que la pathologie d'Alzheimer (Horuk *et al.*, 1997) ou les traumatismes (Kossmann *et al.*, 1997). Une augmentation d'IL-8 a été détectée dans le LCR de patients avec des traumatismes sévères, à des niveaux supérieurs dans le LCR par rapport au sérum, et corrélés directement avec une dysfonction de la BHE (Kossmann *et al.*, 1997). L'IL-8 aurait aussi un rôle pro-angiogénique et un rôle dans le développement et la progression des tumeurs malignes, notamment au niveau cérébral (astrocytome et glioblastome) (Brat *et al.*, 2005). IL-8 peut induire la production de MMP-2 et MMP-9 qui seront détaillées dans le paragraphe suivant.

3. **Les 2 sous-familles: C et CX3C**

La sous-famille des chimiokines C ne possède en N-terminal qu'un seul résidu cystéine, et seulement deux résidus cystéines sur les quatre conservés. Les chimiokines C agissent principalement sur les lymphocytes. La sous-famille CX3C est caractérisée par la présence de trois acides aminés entre les deux cystéines se situant dans la partie N-terminale de la protéine. Les chimiokines CX3C peuvent être sécrétées ou membranaires. En complément de leur action de chimioattractant, la localisation membranaire confère également à ces chimiokines des propriétés de molécules d'adhésions pour agir sur les cellules T, les cellules NK et les phagocytes mononucléés (Savarin-Vuillat et Ransohoff, 2007).



**Figure 10 :** Représentation schématique de la localisation des cystéines dans la séquence des chimiokines permettant de les classer (Adapté de Townson et Liptak, 2003).

### C. La balance MMPs - TIMPs

En raison de leurs substrats multiples dans le SNC, les métalloprotéinases matricielles (matrix metalloproteinases, MMPs) sont impliquées dans l'angiogenèse, la réponse inflammatoire post-traumatique, le stress oxydatif, l'hémorragie intracérébrale, et dans de nombreuses pathologies majeures partageant des processus communs tel que l'inflammation, la rupture de la BHE et la remodelisation de la MEC (Gasche *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2010). En modulant la MEC, les MMPs facilitent la migration des leucocytes contribuant ainsi à l'inflammation et à l'ouverture de la BHE dans différentes pathologies, dont la sclérose en plaques, l'encéphalite, la méningite, les tumeurs et l'ischémie cérébrale (revue par Rivera *et al.*, 2010). Les protéases, et notamment les MMPs sont également impliquées dans l'activation et/ou l'inactivation de nombreuses cytokines/chimiokines, qui sont produites sous leur proformes inactives et qui nécessitent une maturation par clivage protéolytique (Frankowski *et al.*, 2012).

Les MMPs constituent une famille d'endopeptidases à Zinc d'une vingtaine de membres, qui clivent une variété de propeptides (Dzwonek *et al.*, 2004), protéines péricellulaires incluant des cytokines, des récepteurs de surface et molécules d'adhésions et des composants de la matrice extracellulaire (MEC). A l'exception de quelques MMPs membranaires (MT-MMPs), elles sont généralement sécrétées sous leur forme latente inactive, pro-MMP ou zymogène (Massova *et al.*, 1998; Frankowski *et al.*, 2012). Ces formes présentent un peptide signal N-terminal, nécessaire à leur sécrétion, un propeptide qui doit être clivé pour l'activation de l'enzyme, suivi du domaine catalytique, une région charnière et un domaine C-terminal de type hemopexin. Les MMPs et leurs inhibiteurs spécifiques endogènes, les « tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) agissent en synergie. Les TIMPs font partie d'une famille de quatre membres, TIMP-1 à 4 qui inhibent l'ensemble des membres de la famille des MMPs (Murphy et Willenbrock, 1995; Dzwonek *et al.*, 2004). Les TIMPs peuvent jouer des rôles paradoxaux : ainsi, il a été montré que la forme non active pro-MMP-2 peut se lier à une MMP membranaire, MT1-MMP (ou MMP-14) via son inhibiteur TIMP-2, et être ainsi activée par MT1-MMP par clivage de son propeptide (Brew *et al.*, 2000).

Les MMP-2, MMP-9 (connues sous le nom de gélatinases) ont été particulièrement étudiées au niveau cérébral. Elles clivent le collagène de type IV, un constituant majeur de la MEC engainant la BHE, et le collagène de type I (Murphy et Crabbe, 1995; Rosenberg *et al.*, 1996). La MMP-2 (ou gélatinase A) est exprimée dans l'endothélium et au niveau cérébral par les astrocytes. En plus du collagène, elle clive l'élastine, la fibronectine et la laminine 5. La MMP-9 est moins présente dans la glie et est exprimée surtout par les neurones (Dzwonek *et al.*, 2004). La MMP-9 est impliquée dans le clivage ou la dégradation de nombreuses protéines du SNC et de la BHE dans des conditions



inflammatoires (Trysberg *et al.*, 2004). MMP-9 est un membre de la famille des collagénases de type IV, un composant principal de la membrane basale des cellules endothéliales de la BHE. Il est reconnu que la dégradation de la lame basale entraîne une ouverture de la BHE. Dans une étude utilisant un modèle *in vitro* de BHE à partir des cellules porcines, il a été montré que les cellules endothéliales augmentaient leur sécrétion de MMP-9 sous l'influence des péricytes. Par contraste, l'addition d'astrocytes en co-culture permettait de réduire l'activité protéolytique (Zozulya *et al.*, 2008). D'autres études ont montré que cette ouverture peut être réduite avec différents inhibiteurs des MMPs, notamment les TIMPs. TIMP-1 inhibe MMP-9 et une étude a montré que la diminution du taux circulant de MMP-9 suite à l'injection intraveineuse de glucocorticoïdes était due à une augmentation de l'expression de TIMP-1 en parallèle de la répression de la transcription de MMP-9 (Forster *et al.*, 2007). Ainsi, l'inhibition de MMP-9 protégerait la BHE et le tissu neural. L'inhibition de l'expression de MMP-9 au niveau des cellules endothéliales de la BHE et des leucocytes grâce au MMP-9-siRNA a été évaluée comme stratégie protectrice. De façon surprenante, l'extinction du gène codant pour MMP-9 a entraîné une augmentation de l'expression de gènes codant pour la MEC (dont le collagène) et une diminution de la résistivité de la monocouche cellulaire endothéliale. L'expression du gène codant pour TIMP-1 a également été augmentée. Ces observations ont permis de montrer l'importance de la balance entre MMP-9 et son inhibiteur naturel TIMP-1 dans le maintien de l'intégrité de la BHE (Bonoïu *et al.*, 2009), invalidant les stratégies visant à inhiber complètement MMP-9. L'utilisation d'inhibiteurs synthétiques plus ou moins spécifiques de MMP-9, les approches d'inactivation du gène codant pour MMP-9 ou l'étude de souris invalidées pour ce gène ont permis d'impliquer cette protéase dans le clivage des protéines de jonctions serrées après injection intraveineuse ou lors d'ischémie cérébrale chez le rat (Asahi *et al.*, 2000 & 2001; Yang *et al.*, 2007; Bonoïu *et al.*, 2009).

La MMP-3 a été identifiée au niveau des neurones et de la microglie activée (Dzwonek *et al.*, 2004). Les MMP-3 et MMP-7 pourraient cliver les précurseurs de certaines neurotrophines, ces dernières participant à la survie neuronale et à la plasticité synaptique.

Dans la pathologie d'Alzheimer, les MMPs possèdent parmi leurs substrats la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et le peptide  $\beta$  amyloïde. La MMP-9 clive l'excès de peptide  $\beta$  amyloïde en métabolites non toxiques (Dzwonek *et al.*, 2004). Une étude a montré que l'expression de MMP-2 et MMP-9 au niveau des astrocytes et de la membrane-type 1-MMP (MT1-MMP ou MMP-14) au niveau neuronal étaient augmentées au niveau de l'hippocampe, proportionnellement aux stades d'évolution de la pathologie des souris transgéniques 5xFAD, modèles de la maladie d'Alzheimer (Py *et al.*, 2014). De plus la co-localisation de ces MMPs avec les plaques amyloïdes a permis d'avancer l'hypothèse d'une implication de ces MMPs dans la régulation du système APP/A $\beta$ .

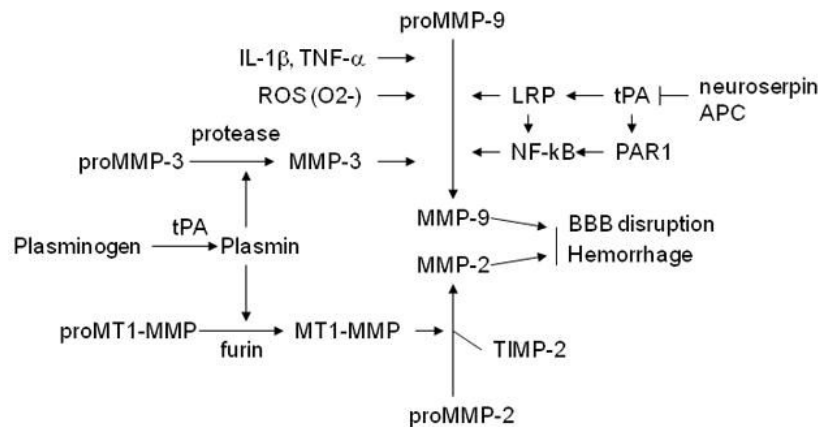
Dans la sclérose en plaques, les symptômes cliniques de cette maladie corrént avec le niveau d'expression des ARNm codant pour MMP-7 et MMP-9. Une autre étude a montré que le taux d'expression de MMP-12 était associé à l'évolution de la phase de demyelination d'un modèle murin de la sclérose en plaque, confirmé par la réduction de celle-ci et de ses conséquences chez les souris invalidées pour le gène codant pour MMP-12 (Hansmann *et al.*, 2012).

### III. Hypoxie et ischémie cérébrale : exemple de cascade inflammatoire

L'hypoxie et l'ischémie cérébrale induisent une ouverture de la BHE. Cette situation est associée à des troubles tels que l'accident vasculaire cérébral (AVC), l'arrêt cardiaque prolongé, une détresse respiratoire ou encore une intoxication au monoxyde de carbone. Des altérations dans les cellules endothéliales comme l'augmentation des vésicules de pinocytose et la désorganisation des protéines des jonctions serrées entraînant un gonflement des pieds d'astrocytes ont été associés à une perte d'intégrité de la BHE (Kaur *et al.*, 2008). L'ischémie cérébrale conduit à une dérégulation du flux sanguin qui induit une augmentation de la perméabilité de la BHE et une rapide déplétion en nutriments et en oxygène (Petty et Wettstein, 2001). La perte d'intégrité transitoire de la BHE au niveau des jonctions serrées a été proposée comme réponse palliative permettant de préserver temporairement la fonctionnalité des neurones plutôt qu'une conséquence délétère de l'hypoxie (Hawkins et Davis, 2005).

Dans le cadre de la méningite bactérienne, de la sclérose en plaques ou de l'ischémie cérébrale, les taux de MMP-9 augmentent dans le LCR et sont associés à une augmentation de l'activité protéolytique dans le LCR et le sang. La majorité des MMPs dont MMP-9 et MMP-2 sont présentes sous leur proformes inactives, dans l'attente de leur activation par différents protéases (clivage d'un propeptide inhibiteur), elles mêmes modulées dans leur expression par l'IL1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$ , ou dans leur expression et activité par les reactive oxygen species (ROS) (Jin *et al.*, 2010) (Figure 11). Les ROS, associés au stress oxydatif consécutif au trauma, vont également participer à réduire l'expression des protéines des jonctions serrées (Abdul-Muneer *et al.*, 2014). Comme évoqué ci-dessus, les protéases, et notamment les MMPs sont impliquées dans l'activation de nombreuses cytokines/chimiokines. Les processus neuroinflammatoires et les altérations au niveau de la BHE impliquent donc clairement des boucles de régulation entre les cytokines/chimiokines et différentes familles de protéases, et entre membres de ces grandes familles de protéines. Ainsi, l'activité de MMP-9 a été associée à celle du tissue plasminogen activator (tPA) dans les cas d'ischémie cérébrale (Yamashita *et al.*, 2011). En effet, les limites thérapeutiques du tPA concernant ses risques hémorragiques cérébral (Hemorrhagic transformation, HT) ont permis de mettre en évidence qu'il activait fortement MMP-9. Dans les 18 à 24 heures post traumatisme, la MMP-9 libérée par les

leucocytes circulants et la MMP-2 cérébrale contribueraient à endommager l'UNGV et consécutivement ouvrirait la BHE. Après la période des 24 heures, l'épisode ischémique responsable de l'activation des protéases MMP-2, MMP-3 et MMP-9 ainsi que du tPA et une neuro-inflammation généralisée seraient contrebalancés par des processus de réparation de la BHE incluant la voie de signalisation TGF- $\beta$  au niveau des monocytes, des inhibiteurs des MMPs et des inhibiteurs des ROS (Revue par Jickling *et al.*, 2014). Au niveau des astrocytes, cette voie de signalisation TGF- $\beta$  neuro-protectrice pourrait être également impliquée dans l'augmentation de l'expression et de la fonction des pompes d'efflux de type P-gp (ABCB1) (Baello *et al.*, 2014).



**Figure 11:** Mécanisme d'activation des MMPs dans le cas de l'ischémie cérébrale. La pro-MMP-2 pourrait être activé par la MT1-MMP qui serait elle-même activée par la protéase furin. La pro-MMP-9 pourrait être activée par MMP-3, le tPA, son expression dépendrait notamment de facteurs pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) et les ROS. La plasmine pourrait activer MT1-MMP et MMP-3. Le tPA pourrait activer MMP-3 et MMP-9 et être inhibé par la neuroserpine et l'activated protein C (APC) (Adapté de Jin *et al.*, 2010).

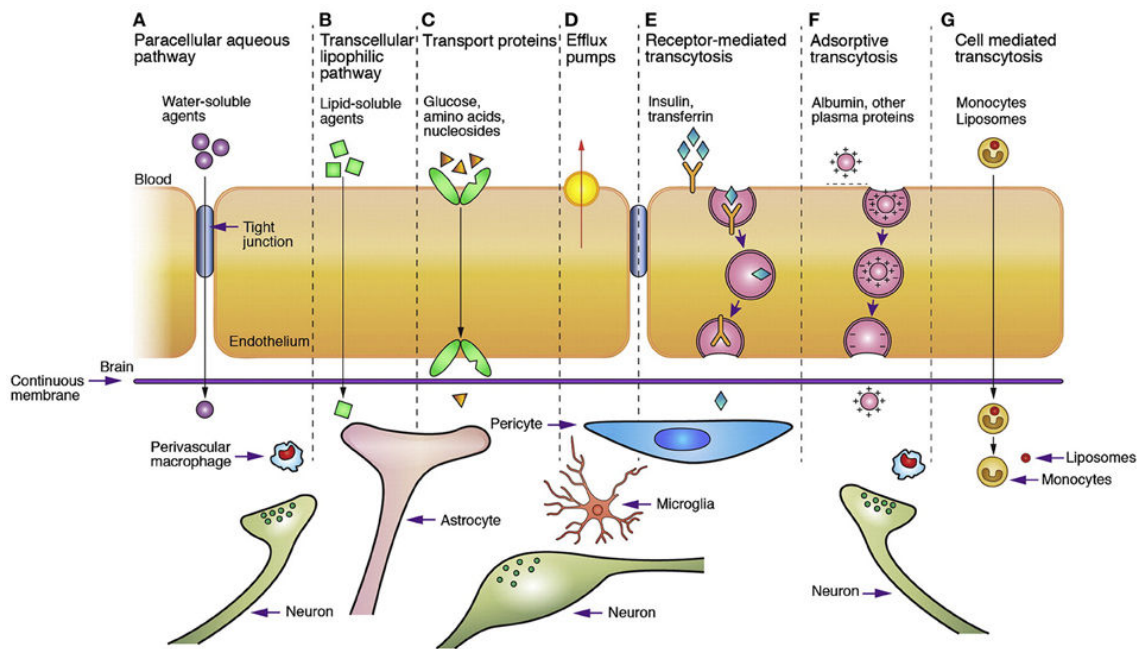
### **CHAPITRE III : LA BHE ET L'INFLUX CEREBRAL NATUREL**

Au niveau de la BHE, les passages de molécules (i) en para cellulaire, (ii) par diffusion passive ou (iii) par pinocytose sont quasiment inexistantes en comparaison des endothéliums périphériques. Il existe tout de même un passage passif des molécules au travers de la BHE, mais qui est régi par des règles strictes quant aux structures moléculaires susceptibles de passer, et souvent contrecarré par un efflux actif des composés par les pompes d'efflux précédemment citées (Cf. Chapitre I). Outrepasser les limitations structuro-fonctionnelles de la BHE permettrait d'élargir le potentiel thérapeutique des maladies du CNS grâce à l'exploitation des nombreuses molécules (i) déjà utilisées efficacement en traitement périphérique, mais qui ne passent pas la BHE ou (ii) abandonnées en raison de leur toxicité périphérique aux doses efficaces dans le SNC (relation dose / efficacité / toxicité).

Afin de contourner le problème lié au passage à travers la BHE de ces molécules, des voies d'administration invasives ont été proposées comme l'administration intracérébroventriculaire (ICV) ou encore intracérébrale. L'administration intranasale a également été considérée comme une voie d'entrée vers le tissu cérébral. Toutefois elles ne permettent pas de traiter efficacement la majorité des pathologies cérébrales, puisque les composés administrés n'atteignent qu'une partie réduite du tissu cérébral. À l'inverse, mettre à profit la richesse du réseau de capillaires cérébraux en administrant le traitement via la circulation sanguine permettrait de les traiter de manière plus globale.

Des approches chimiques et biologiques ont été mises en place afin de favoriser la diffusion passive des composés en modifiant leurs propriétés physicochimiques telles que la lipodisation, la glycosylation, les prodrogues et les inclusions dans des nanoparticules bien que ces stratégies ne s'adaptent pas à l'ensemble des molécules thérapeutiques potentielles visant le SNC (revue par Vlieghe et Khrestchatisky, 2010, 2013). Afin de répondre aux besoins métaboliques élevés du CNS, les cellules endothéliales, sous l'effet de modulateurs environnementaux issus de l'UNGV, expriment à leur surface des transporteurs et récepteurs spécifiques dont la fonction est de trier le contenu plasmatique et d'apporter les nutriments indispensables à (i) leur propre métabolisme et (ii) celui des cellules nerveuses associées par passage transcellulaire (Figure 12). En condition physiologique, les mécanismes de transport des molécules au niveau de la BHE sont parfaitement contrôlés afin d'assurer une homéostasie parfaite du compartiment cérébral.

Depuis les années 1990 et l'avènement du « drug targeting », ces mécanismes de transport naturels spécifiques ont été exploités pour tenter d'améliorer la délivrance de principes actifs dans le sanctuaire cérébral (Bickel *et al.*, 2001; Pardridge, 2003; Roux et Couraud, 2005; Pardridge, 2007, 2012).



**Figure 12 :** Schéma illustrant les différentes possibilités de franchissement de la BHE pour les molécules issues de la circulation plasmatique. (A) Les petites molécules hydrophiles peuvent passer en paracellulaire à travers les jonctions serrées. (B) Les petites molécules hydrophobes peuvent diffuser à travers la membrane plasmique des cellules, mais sont souvent substrat des pompes d'efflux qui les renvoient vers la circulation plasmatique. (C) Les petites molécules endogènes, tels que les acides aminés, les acides gras, les nucléosides et le glucose sont transportés à travers la BHE par des protéines de transport selon un mécanisme de « carrier-mediated transport (CMT) ». (E) Les récepteurs pour les protéines et larges particules plasmatiques, tels que l'insuline, la transferrine et les particules lipoprotéiques sont exprimés sur la face luminale de l'endothélium. Le complexe ligand-récepteur est endocyté selon un mécanisme appelé RMT. (F) Les protéines plasmatiques endogènes, tel que l'albumine, peuvent être transportées à travers la BHE par liaison à l'endothélium selon leur charge suivant un processus d'endocytose appelé « adsorptive-mediated transcytosis (AMT) ». (G) Les cellules immunitaires ont été également décrites pour traverser l'endothélium cérébral par voie transcellulaire ou paracellulaire (Adapté de Boer et Gaillard, 2007).

## I. La diffusion passive

La diffusion passive est un processus spontané, non saturable, non compétitif, ne nécessitant ni transporteur, ni énergie. Le passage de molécules par diffusion simple est donc gouverné par le gradient de concentration entre le sang et le liquide extracellulaire (ou interstitiel) cérébral. La diffusion passive dépend de la masse et des propriétés lipophiles des molécules. Ce mécanisme est restreint à quelques molécules (i) de petite masse (<500 Daltons), (ii) non ionisées telles que le gaz

carbonique, l'oxygène et les substances très lipophiles comme la nicotine et l'éthanol, (iii) non liées aux protéines et (iv) possédant les propriétés structurelles leur permettant de franchir les membranes lipidiques endothéliales selon leur gradient de concentration (Grieb *et al.*, 1985; Lipinski *et al.*, 2001; Lipinski, 2000, 2004).

Par contre, le transport des ions, des substances peu liposolubles et/ou de haut poids moléculaire (>5 kDa) nécessite le plus souvent un transporteur ou canal protéique. Ces canaux situés sur la face luminale et/ou abluminale de l'endothélium cérébral permettent la régulation de l'équilibre ionique de part et d'autre de la BHE.

## **II. La diffusion facilitée : transporteurs transcellulaires non vésiculaires**

La diffusion facilitée permet le transport de composés à travers la BHE selon leur gradient de concentration, par l'intermédiaire d'un transporteur et ne nécessite pas d'énergie. Il s'agit d'un mécanisme passif et saturable lorsque les concentrations dépassent la capacité de transport, et pouvant être inhibé par un agoniste ou un antagoniste. La diffusion facilitée participe activement au transport d'une vaste gamme de molécules telles que les acides aminés, les hexoses, les acides gras, les peptides, les nucléosides, les acides monocarboxyliques, les amines, les purines, certaines vitamines et régule même les échanges d'eau et d'ions (revue par Deeken et Loscher, 2007).

### **A. Le transport de l'eau et des ions**

#### **1. Le transport de l'eau**

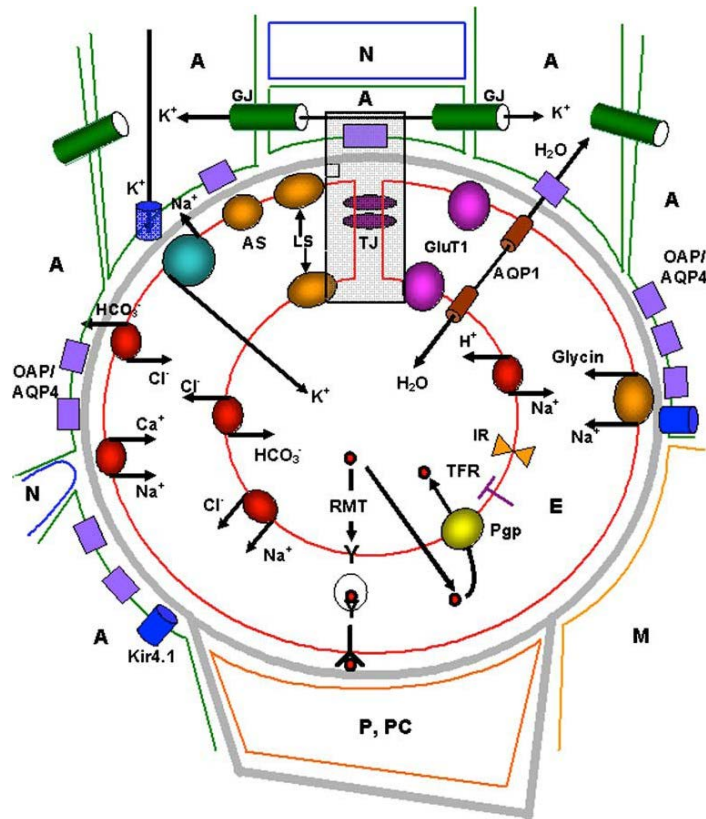
La répartition des ions, indispensables à l'activité neuronale et au fonctionnement de nombreux canaux et transporteurs, est liée à l'homéostasie de l'eau. Les aquaporines (AQPs) forment une famille de canaux qui, selon les sous-types, facilitent les flux d'eau et/ou de solutés (glycérol et urée notamment) à travers les membranes de nombreux types cellulaires (Badaut *et al.*, 2002). Elles forment des pores permettant le transport bidirectionnel de l'eau selon les principes de l'osmolarité. Jusqu'à présent 13 AQPs ont été décrites chez l'homme (Sorani *et al.*, 2008). Sur les six AQPs décrites au niveau du cerveau des rongeurs (AQP 1, 3, 4, 5, 8 et 9), l'AQP-4 est l'une des premières AQPs découvertes au niveau du SNC, où elle est la plus abondamment exprimée (Figure 13). Elle est localisée au niveau des pieds astrocytaires en contact avec les capillaires cérébraux et est en étroite association avec le transport des ions K<sup>+</sup> (Wolburg *et al.*, 2009). L'AQP4 semble jouer un rôle important au niveau de la BHE dans plusieurs pathologies cérébrales associées à l'inflammation tels que les lésions aiguës du cerveau (AVC, trauma) et les pathologies neurodégénératives (Badaut *et al.*, 2014). L'AQP4 et l'entrée d'eau à travers la BHE ont un rôle dans la formation et la résolution

de l'œdème vasogénique cérébral (Tourdias *et al.*, 2011). Dans des animaux déficients ou présentant une délocalisation de l'AQP-4, l'œdème vasogénique associé aux tumeurs cérébrales est augmenté (Bonomini et Rezzani, 2010).

## 2. *Le transport des ions*

Le transport des ions implique l'intervention de différents canaux ioniques, localisés au niveau des membranes luminale et abluminale des cellules endothéliales de la BHE, jouant un rôle dans la régulation du pH cérébral (Wolburg *et al.*, 2009) (Figure 13). L'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , localisée face abluminale, est responsable de l'influx actif de  $\text{Na}^+$  vers le parenchyme cérébral en échange de  $\text{K}^+$  afin de maintenir un gradient de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  à la BHE. En effet, l'excès d'ions  $\text{K}^+$  libérés par les astrocytes est pris en charge par l'ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  puis rejoint le compartiment sanguin grâce à des canaux  $\text{K}^+$  sensibles à l'amiloride. Le cotransporteur  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ , principalement exprimé au niveau de la membrane luminale, transporte les quatre ions du sang vers le cytoplasme endothélial. Ce mécanisme permet de maintenir la concentration des ions  $\text{K}^+$  dans le liquide interstitiel cérébral à 2,8 mM (versus 3 à 5 mM plasmatique) et ainsi préserver l'activité de l'influx nerveux. L'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , localisé au niveau luminal, permet l'exclusion d'un proton contre l'entrée d'un ion sodium. Pour finir, l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  est exprimé sur les 2 faces luminale et abluminale des cellules endothéliales. Il est impliqué dans l'entrée d'ions  $\text{Cl}^-$  dans la cellule endothéliale contre la sécrétion d'ions  $\text{HCO}_3^-$ .





**Figure 13** : Représentation schématique d'une coupe transversale du lumen d'un capillaire cérébral constitué des différents types cellulaires de l'unité neuro-glio-vasculaire : les cellules endothéliales polarisées (E, rouge), les pieds d'astrocytes (A, vert), les neurones (N, bleu) et les péricytes (P, orange). Le schéma illustre la répartition de certains canaux ioniques, transporteurs et récepteurs présents au niveau de l'UNGV tels que le système de transport des acides aminés présent à la membrane abluminale (AS) ou présent à la fois à la membrane luminale et abluminale des cellules endothéliales (LS), le transporteur de glucose de type 1 (GLUT1), les transports régulés par un récepteur (RMT) tels que le récepteur de la transferrine (TfR) et le récepteur de l'insuline (IR), la P-glycoprotéine (Pgp), les différents canaux ioniques et les protéines canal de type AQP exprimés par les pieds d'astrocytes permettant de réguler les échanges des molécules d'eau dont AQP4 (Adapté de Wolburg *et al.*, 2009).

## B. Le transport des acides aminés

Les acides aminés sont essentiels à la synthèse des neurotransmetteurs et à la synthèse protéique cérébrale en général. Certains acides aminés comme le glutamate et l'aspartate sont synthétisés efficacement par le cerveau, en revanche, pour d'autres acides aminés, comme l'arginine, la synthèse cérébrale n'est pas suffisante. Pour couvrir les besoins métaboliques du cerveau, un apport continu et équilibré doit donc être effectué du sang vers le parenchyme cérébral. Au moins 11 systèmes de transport des acides aminés à travers la BHE ont été décrits. Tous ces

systèmes peuvent transporter différents acides aminés. Il y a donc une possibilité de compétition entre eux. De plus, ces transporteurs fonctionnent généralement en situation de saturation du fait de concentrations plasmatiques élevées en acides aminés. Cette situation rend le cerveau très vulnérable à un déséquilibre en acides aminés comme c'est le cas chez les personnes atteintes de phénylcétonurie (Hawkins *et al.*, 2006).

## **C. Le transport des acides gras**

### *1. Les acides gras essentiels*

Les acides gras puisés dans les matières grasses alimentaires servent à satisfaire non seulement une partie de nos dépenses énergétiques mais également nos besoins en acides gras essentiels que sont les acides gras polyinsaturés (AGPI). Deux familles d'AGPI, la série n-3 (oméga 3) et la série n-6 (oméga 6) se distinguent par le degré d'insaturation de leurs chaînes hydrocarbonées. Ces 2 familles ont chacune un précurseur métabolique exclusivement d'origine végétale, l'acide  $\alpha$ -linoléique (ALA ; 18 :3n-3) pour la série n-3 et l'acide linoléique (LA ; 18 :2n-6) pour la série n-6. Chez les vertébrés ces 2 AGPI doivent être obligatoirement apportés par l'alimentation puisque contrairement aux végétaux, ils ne possèdent pas les enzymes qui permettent d'introduire les doubles liaisons en position n-6 et n-3. Il est aujourd'hui bien admis que les AGPI issus de notre alimentation, de par leur nature et leur abondance, influencent la santé de l'homme et jouent un rôle dans l'étiologie d'un grand nombre de pathologies métaboliques, cardiovasculaires, inflammatoires et neurodégénératives.

### *2. Rôle des AGPI au niveau du CNS : structure et métabolisme*

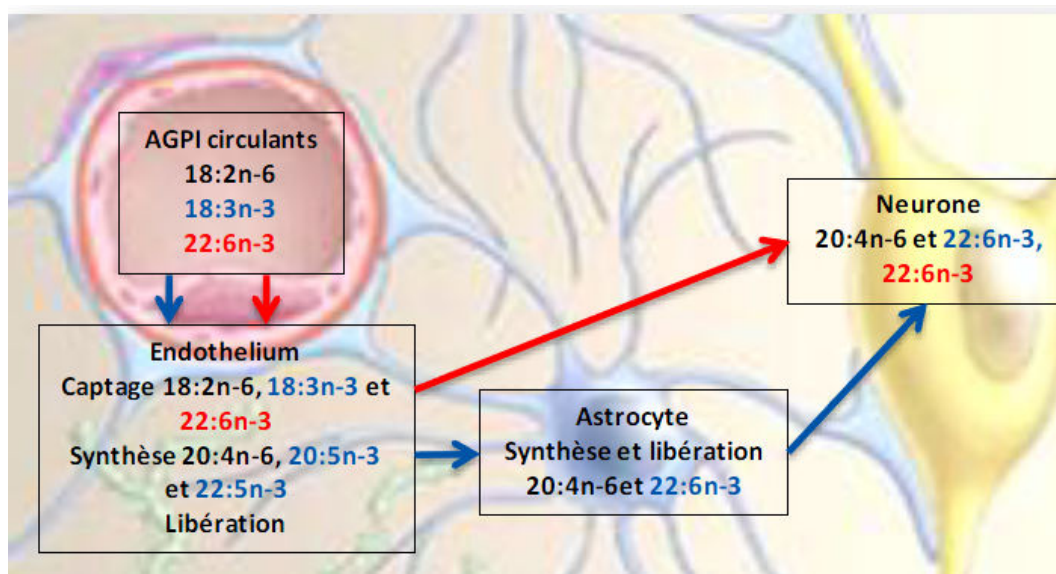
Après le tissu adipeux, le SNC présente les teneurs en lipides les plus élevées de l'organisme (30 à 50% du poids sec du cerveau). Les précurseurs des AGPI sont détectés à l'état de trace dans le cerveau contrairement à l'acide docosahexanoïc (DHA, 22 :6n-3) et acide arachidonic (AA, 20 :4n-6) qui sont les constituants fondamentaux des membranes des cellules neurales et se distinguent par une richesse notable en DHA (>20% des acides gras totaux) comparativement aux tissus périphériques (Figure 14) (Extier *et al.*, 2010). L'apport en AGPI pendant la période périnatale (Innis et Friesen, 2008) est importante pour le neurodéveloppement et la neurogenèse (Cao *et al.*, 2005; Kawakita *et al.*, 2006). Pendant cette période, le DHA représente rapidement 7% de la masse totale des lipides du cerveau humain soit une concentration 2 fois plus élevée que dans le foie et le placenta (Lauritzen *et al.*, 2001).

Chez l'adulte, les AGPI modulent la synthèse et l'activité des cytokines inflammatoires (Layé *et al.*, 2010) et contribuent au bien-être, en particulier chez les sujets âgés (Layé et Duffaud, 2010). Il

a été montré qu'une diminution du DHA cérébral potentialise l'expression des cytokines inflammatoires cérébrales en situation inflammatoire (Mingam *et al.*, 2008). La supplémentation en AGPI n-3 à chaîne longue module les effets comportementaux des cytokines dans le cerveau. *In vitro*, le DHA inhibe la synthèse de facteurs inflammatoires par les cellules microgliales (De Smedt-Peyrusse *et al.*, 2008). Les mécanismes d'action anti-neuroinflammatoire du DHA passent par un remaniement de la composition membranaire et de la localisation des récepteurs des facteurs inflammatoires dans la membrane des cellules microgliales (De Smedt-Peyrusse *et al.*, 2008). Il a été montré que les altérations comportementales liées à l'expression d'IL-6 plasmatiques sont atténuées chez des rats nourris par une diète enrichie en huile de poisson (apport de DHA) (Miguel *et al.*, 2006). Le DHA a également été impliqué dans les troubles du comportement tel que l'hyperactivité, la dépression et la maladie d'Alzheimer (Suominen-Taipale *et al.*, 2010). Il a été proposé que la consommation hebdomadaire de poisson permettrait de réduire le risque de développement de la maladie d'Alzheimer (Barberger-Gateau *et al.*, 2007). Des données tendent à montrer que le DHA et son dérivé la neuroprotectine D1 (NPD1) limiteraient l'agrégation du peptide A $\beta$  à l'origine de la formation des plaques amyloïdes (Lukiw *et al.*, 2005 ; Lim *et al.*, 2005). Cependant, à ce jour, les essais de supplémentation en AGPI n-3 de sujets atteints de la Maladie d'Alzheimer ont été peu fructueux.

Au niveau membranaire, l'enrichissement en DHA permet également de ralentir l'apoptose induite *in vitro* par la staurosporine (un inhibiteur des kinases) (Kim *et al.*, 2000). Cet effet anti-apoptotique du DHA dépendrait de la voie de signalisation phosphatidylinositol 3-kinase/Akt et de la capacité du DHA à favoriser l'accumulation membranaire de la phosphatidylsérine, qui elle-même stimule l'activité d'Akt (Akbar et Kim, 2002).

Les cellules endothéliales du cerveau contrairement aux cellules neuronales présentent une composition membranaire riche en AA représentant 27% des acides gras totaux versus 10% dans le cortex cérébral. Bien que la teneur en DHA soit faible dans les cellules endothéliales représentant 6% des acides gras totaux versus 23% dans le cortex, un abaissement du DHA à 3% résultant d'une carence alimentaire en ALA perturbe certaines fonctions de la BHE, dont le transport de glucose de la circulation vers le cerveau (Pifferi *et al.*, 2005). Par contraste, la rétine se distingue à la fois par son exceptionnelle richesse en DHA (>40% des acides gras totaux) et sa faible teneur en AA. Au niveau de la rétine, la réception du photon et sa transduction en signal électrique nécessitent des changements très rapides et réversibles de la conformation de la rhodopsine, le photopigment rétinien. Ces changements sont modulés directement par la composition en phospholipides des membranes et notamment par la concentration élevée en DHA au niveau des membranes photo-réceptrices (Salem *et al.*, 2001). Ces observations laissent prévoir des fonctions particulières du DHA dans le tissu nerveux et ont impulsé les investigations cliniques et expérimentales depuis une vingtaine d'années.



**Figure 14 :** Modèle de captage et de synthèse des AGPI longues chaînes dans le cerveau à partir des AGPI présents dans la circulation sanguine (adapté de Moore, 2001)

### 3. Les transporteurs d'acides gras

L'absence de synthèse en autonomie des AGPI et leur importance métabolique ainsi que structurelle au niveau du CNS pose la question de leur transport à la BHE. Dans la circulation sanguine, les particules lipoprotéiques de haute densité tel que les HDL-ApoAI sont enrichies en AGPI sous la forme de phospholipides tels que les lysophosphatidylcholines (LysoPC). Une enzyme plasmatique, la lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) serait responsable d'élaguer les LysoPC des HDL au même titre que les lipoprotéines lipases à la surface des capillaires cérébraux (Rapoport *et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 2003; Ouellet *et al.*, 2009) (Cf. Chapitre I. IV. A. Les enzymes et la neuroprotection). Les LysoPC semblent constituer la forme d'apport lipidique cérébral à long terme (Lagarde *et al.*, 2001) et plusieurs mécanismes de transport ont été décrit à la BHE. Les HDL-ApoAI circulants, riches en AGPI peuvent être captés par l'endothélium cérébral grâce au récepteur scavenger type B member I (SR-BI) et pénétrer intégralement ou en partie dans le cerveau (Goti *et al.*, 2001, 2002; Balazs *et al.*, 2004). Le phénomène de résécrétion de la particule de HDL évidée d'une partie de son contenu, notamment les acides gras, pourrait représenter l'enchaînement des 2 mécanismes de transport des acides gras initialement controversés. La captation endothéliale des HDL circulants grâce au récepteur SR-BI, permettrait le contact avec les lipoprotéines lipases endothéliales qui pourraient trier les composants essentiels des particules, permettant aux acides gras de traverser les membranes par simple diffusion (faible vitesse d'apport) (Spector 1988 ; Hamilton *et al.*, 2002 ; Hamilton et Brunaldi 2007) ou être pris en charge par des transporteurs

récemment décrit dans la littérature et dépendants du degré de saturation et de la longueur des chaînes d'acides gras, tels que les « fatty acid transport proteins » (majoritairement FATP-1 et -4), « fatty acid binding protein 5 » et « fatty acid translocase (CD36) » (Abumrad *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 2011; Pèlerin *et al.*, 2014) ou encore Mfsd2a, récemment décrit pour le transport du DHA et critique dans la formation et la fonction de la BHE (Nguyen *et al.*, 2014; Betsholtz, 2014). En complément, il a également été montré que les astrocytes synthétisent le DHA à partir des précurseurs n-3 (Williard *et al.*, 2011).

## **D. Le transport du glucose**

### *1. Le glucose, source énergétique cérébrale principale*

Le glucose est d'une importance toute particulière pour deux raisons : (i) il représente la source d'énergie principale nécessaire à l'activité cérébrale et (ii) il doit être capté de la circulation sanguine et transporté à travers la BHE. Le cerveau est l'organe qui consomme le plus de glucose proportionnellement à son poids. En effet, représentant seulement 2% du poids du corps, il consomme 25% du glucose total et 20% de l'oxygène au repos. Sur la base de la différence de concentration artérioveineuse, on estime chez l'homme la consommation cérébrale de glucose à 31  $\mu\text{moles}/100 \text{ g}/\text{min}$ . Cette forte consommation est notamment due au besoin important en énergie de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase précédemment citée pour rétablir les potentiels de membrane au cours des processus de neurotransmission. Le glucose entre dans la voie de la glycolyse afin de donner du pyruvate, lequel est utilisé dans le cycle de Krebs et la voie de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. Ceci permet la production de molécules d'ATP, utilisées par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase pour assurer au niveau du neurone et de l'astrocyte le rétablissement des gradients ioniques. Il a été estimé que cette pompe utilisait environ la moitié de l'ATP produit *in situ* (Maher *et al.*, 1991; Maher, 1995; Simpson *et al.*, 2007).

### *2. Le couplage neuro-vasculaire : régulation de l'apport en glucose cérébral*

Concernant l'environnement cérébral, trois acteurs cellulaires sont impliqués dans le métabolisme énergétique cérébral : le neurone, principal consommateur d'énergie du SNC notamment pour rétablir les potentiels de membranes lors d'une activation neuronale, l'astrocyte qui participe au recyclage des neurotransmetteurs comme le glutamate mais également à la fourniture de substrats énergétiques alternatifs au neurone et à la cellule endothéliale, qui régule, en tant que 3<sup>ème</sup> acteur cellulaire l'entrée du glucose dans le cerveau.

Autour de ces 3 partenaires, plusieurs mécanismes de couplage cellulaire entre activité neuronale et utilisation du glucose ont été proposés (Leybaert, 2005). Le couplage neuro-vasculaire

associe la variation d'activité neuronale à la dilatation des vaisseaux et donc au débit sanguin. L'astrocyte joue un rôle vasorégulateur dans ce couplage en libérant des molécules vasodilatatrices ou vasoconstrictrices et permet ainsi d'augmenter les apports en glucose et oxygène au neurone. Ce couplage est associé à un second couplage neurovasculaire dénommé neurone-barrière («neurobarrier coupling») qui consiste à adapter spécifiquement au niveau de la BHE la vitesse de transport du glucose à la demande énergétique en modulant la quantité et/ou l'activité des transporteurs dont le glucose transporter-1 (GLUT-1).

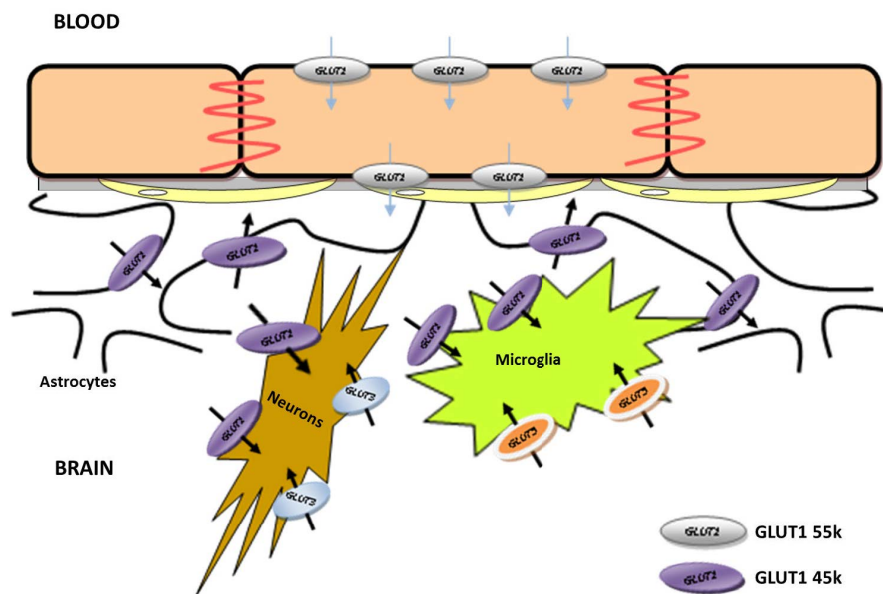
### 3. *Etat de repos et activation neuronale*

En situation de repos, il existe une relation entre les consommations de glucose et d'oxygène, cette molécule étant complètement utilisée pour l'oxydation du glucose. L'activation neuronale locale provoque une augmentation de la consommation d'ATP et l'utilisation cérébrale locale du glucose augmente de 15-20% alors que (i) l'augmentation de la consommation en oxygène local est seulement de 5% et (ii) le neurone est incapable d'augmenter par lui-même sa consommation de glucose pour satisfaire la demande d'énergie supplémentaire. Dans ce cas, il a été proposé que la demande métabolique soit assurée par une glycolyse anaérobie qui s'affranchit de l'oxygène (Nehlig et Coles, 2007). Il avait été montré que le couplage neuro-vasculaire associe également l'activité neuronale et le métabolisme énergétique de l'astrocyte (Pellerin et Magistretti, 1994). Dans cette situation d'activation, les astrocytes produisent du lactate par glycolyse anaérobie et pourraient fournir au neurone un substrat énergétique alternatif au glucose. Dans ce modèle, les astrocytes déclencheraient l'augmentation de la captation du glucose plasmatique via les cellules endothéliales. Ce mécanisme a été proposé au niveau des synapses glutamatergiques en tant que « astrocyte-neuron lactate shuttle » (Pellerin et Magistretti, 1994).

### 4. *Le glucose transporter-1 (GLUT-1)*

Afin de maintenir ce métabolisme aérobie et une parfaite homéostasie neuronale, une régulation fine de l'apport cérébral en glucose est nécessaire et s'effectue via un transport facilité. Le glucose transporter-1 (GLUT-1) (isoforme de 55 kDa) est majoritairement exprimé au niveau de la BHE (Pardridge *et al.*, 1990; revue par Guo *et al.*, 2005; Uchida *et al.*, 2011; Pardridge, 2012). Ce transporteur présente une distribution asymétrique au sein des cellules endothéliales de la BHE avec une densité plus importante au niveau de la membrane luminale (le ratio membrane abluminale / luminale est de 0,85) (Farrell *et al.*, 1992; Cornford et Hyman, 2005). L'expression et la distribution de GLUT-1 sont sensibles aux environnements sanguin et cérébral permettant à ce ratio de complètement s'inverser à façon. Concernant l'environnement sanguin, la présence de GLUT-1 est

fonction du taux de glucose plasmatique (Pardridge *et al.*, 1990) et une redistribution au sein des membranes a été observée dans le cas de l'hypoglycémie (Simpson *et al.*, 1999). GLUT-1 est également exprimé par la microglie (Maher, 1995), les astrocytes et les neurones, bien que GLUT-3 soit plus spécifique des neurones (Maher *et al.*, 1991) (Figure 15). Dans le but d'augmenter la pénétration cérébrale de différentes drogues, elles ont été glycosylées afin d'exploiter le transporteur GLUT-1 en tant que système de transport à travers la BHE. Des dérivés du D-glucose tel que le  $\beta$ -D-glucose ont été couplés à des neuropeptides thérapeutiques ou des petites molécules organiques tel que l'ibuprofène afin d'améliorer la pénétration cellulaire, la biodistribution, la stabilité, réduire la toxicité et augmenter efficacement leur passage à travers la BHE (revue par Guo *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2012; Bragagni *et al.*, 2014). Cependant, ces transporteurs présentent une mécanistique proche d'une réaction enzymatique avec des états d'équilibre du transporteur régis par la liaison de l'ion Na<sup>+</sup> et du ligand dans une poche (Wright *et al.*, 2011), avec des contraintes stériques qui ne permettent pas d'exploiter ces transporteurs pour le passage de macromolécules (protéines et anticorps), et dont l'exploitation perturberait la liaison du glucose endogène (Stenehjem *et al.*, 2009).

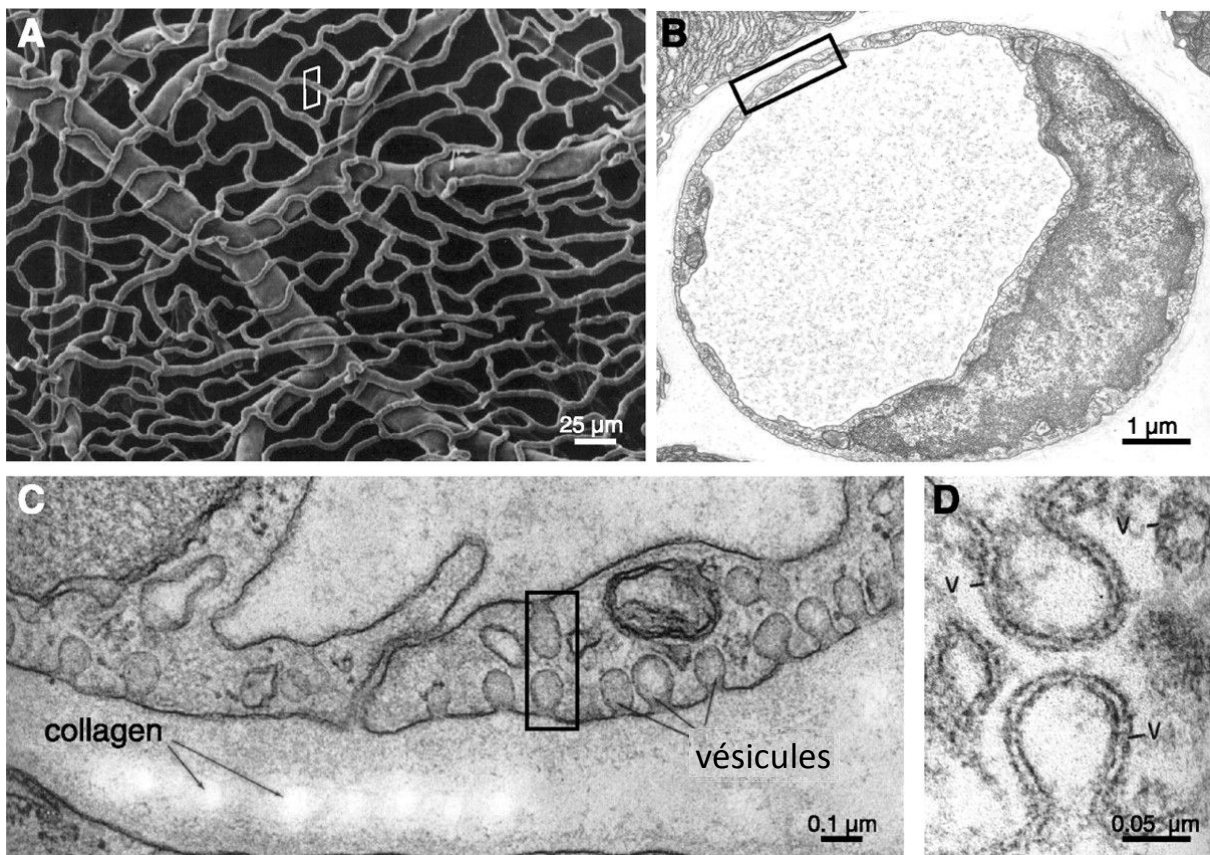


**Figure 15** : Localisation cellulaire des différentes isoformes des transporteurs au glucose dans le SNC, GLUT-1 (2 isoformes de 45 et 55 kDa) et GLUT-3 (Adapté de Dalvi *et al.*, 2014).

### III. Les systèmes de trafic vésiculaires intracellulaires

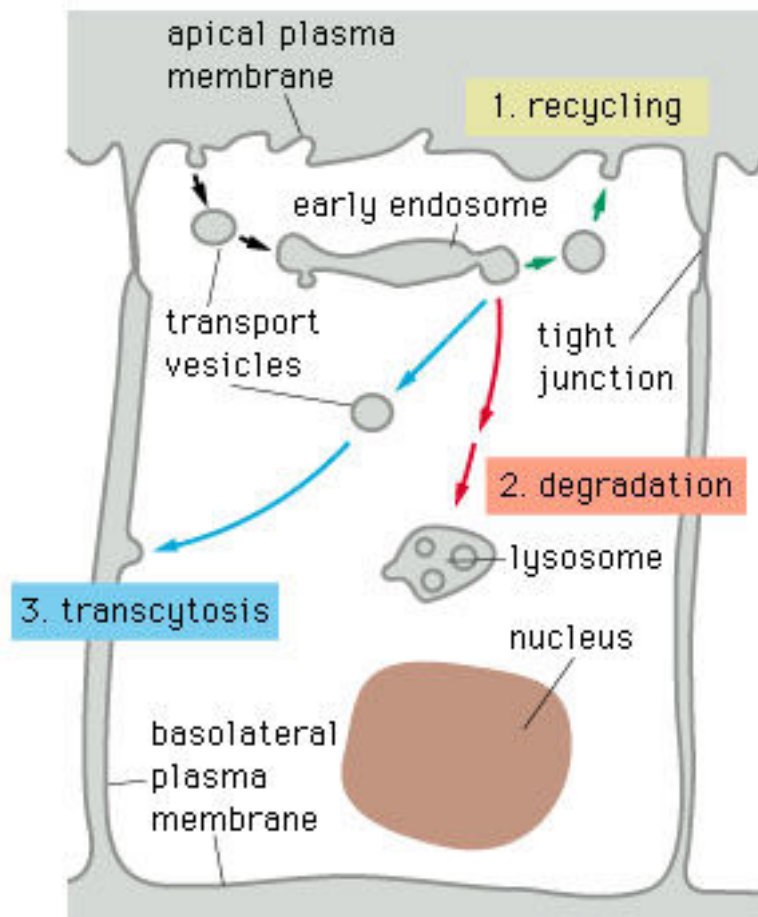
En condition physiologique, la barrière physique et fonctionnelle que représente la BHE empêche quasi-totalement le passage des macromolécules de la circulation sanguine vers le

parenchyme cérébral. Ainsi, le passage des macromolécules nécessaires à la fonctionnalité du parenchyme cérébral s'effectue par transfert transcellulaire ou transcytose à travers les cellules endothéliales de la BHE. Il s'agit d'un mécanisme lent avec une vitesse de l'ordre de la minute à l'heure, qui se déroule en trois étapes : (i) une liaison à la membrane luminale des cellules endothéliales qui s'effectue par une liaison électrostatique (adsorptive-mediated transcytosis, AMT) qui peut être suivie d'une interaction spécifique de type ligand/récepteur (receptor-mediated transcytosis, RMT), puis (ii) une endocytose et un trafic intracellulaire au sein du compartiment vésiculaire (endosomes de tri, endosomes de recyclage vers la membrane plasmique, endosomes tardifs et lysosome) et enfin (iii) une exocytose de tout ou partie du contenu vésiculaire au niveau de la membrane basolatérale (Figure 12, 16, 17). Dans une optique de « drug delivery », l'intérêt du RMT, par rapport au transport facilité tel que détaillé pour GLUT-1, réside dans le potentiel à prendre en charge des molécules de haut poids moléculaire telles que des protéines et des complexes lipoprotéiques (p.e. LDL et HDL).



**Figure 16** : Photos prises en microscopie électronique à transmission représentant par ordre de magnitude de A à D, la richesse du réseau vasculaire cérébral et les vésicules se formant entre la membrane apicale en contact avec le lumen du capillaire vasculaire et la membrane basolatérale en contact avec le parenchyme nerveux (Adapté de Tuma et Hubbard, 2003).





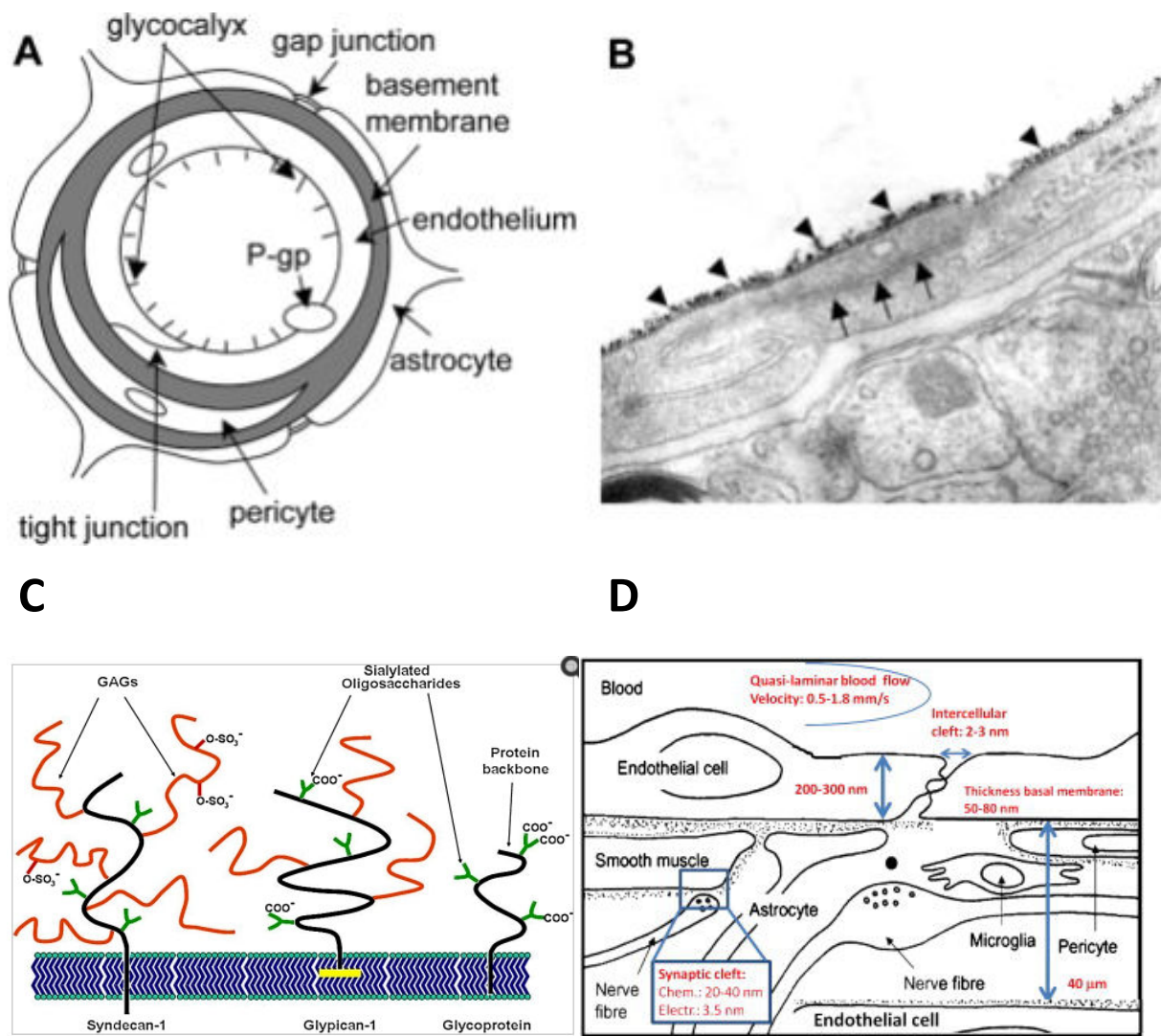
**Figure 17** : Représentation schématique du mécanisme de transcytose. Après endocytose et transfert vers les endosomes précoces (early endosomes), le cargo peut suivre 3 chemins, (1) recyclage vers la membrane apicale pour exocytose ou adressage vers un compartiment appelé corps multivésiculaires (CMVs) puis adressage soit (2) vers le compartiment lysosomal pour dégradation (endosomes tardifs puis lysosomes) soit (3) adressage vers la membrane basolatérale pour transcytose de tout ou partie du contenu. Une différence concernant l'AMT et le RMT pourrait se situer après le compartiment endosome précoce avec un adressage vers l'endosome de tri (sorting endosome, acidification croissante du pH) où le récepteur et son ligand se séparent pour suivre des voies différentes, par exemple recyclage du récepteur à la membrane plasmique et adressage du ligand vers le lysosome ou la membrane basolatérale (Adapté de Broadwell, 1989).

### A. Le glycocalix : impact sur l'AMT et le RMT

L'épaisseur du glycocalix peut varier de 50 nm à 11  $\mu\text{m}$  et il est composé d'un réseau chargé négativement de proteoglycanes, glycoprotéines et de glycolipides (Figure 18). Son rôle vasculaire principal serait de maintenir l'homéostasie entre la circulation plasmatique et la membrane vasculaire apicale. Le glycocalix contient également une grande variété d'enzymes et de protéines

permettant entre autres de prévenir la coagulation et de réguler l'adhésion des leukocytes. Par exemple, l'on distingue, l'endothelial nitric oxide synthase (endothelial NOS), des facteurs de croissances, des chemokines, des apolipoprotéines et des lipoproteines lipases. Le glycocalix semble impliqué dans le tri sélectif des cellules endothéliales via les contacts de molécules plasmatiques en surface luminale.

Le glycocalix pourrait être responsable de la liaison électrostatique primaire des lipoprotéines plasmatiques circulantes à la BHE. En effet, l'étude de Kreuter en 2007 avait montré que la liaison de nanoparticules par l'intermédiaire des récepteurs aux apolipoproteines n'était qu'une étape dans leur transfert de la circulation plasmatique à travers la cellule endothéliale. Les heparan sulfate proteoglycanes (HSPG) du glycocalix ont été décrits comme la première étape déterminante de la liaison des lipoprotéines plasmatiques à la vasculature favorisant la liaison ultérieure à leurs récepteurs (Datta *et al.*, 2000). Une séquence riche en arginine du domaine de liaison au récepteur de l'ApoE permettrait d'augmenter la captation et la clearance du LDL par les cellules. Il en résulte une dissociation entre la captation du LDL et la présence ou l'absence des récepteurs LRP1 et LDLR même si le mécanisme est saturable par un excès de LDL. Un prétraitement avec une heparinase et une heparitinase atténue la captation et la dégradation des LDLs de plus de 80%. La séquence riche en arginine issue de l'ApoE binding domain aurait ainsi des propriétés de « cell penetrating peptide » (CPP) connu pour passer les membranes par AMT. Les HSPG pourraient être impliqués dans le mécanisme de captation des lipoprotéines plasmatiques en aval de la liaison au récepteur et permettraient d'associer les mécanismes d'AMT et de RMT via cette phase initiale commune.



**Figure 18 :** **A.** Représentation schématique d'une coupe transversale d'un capillaire indiquant les éléments de l'UNGV dont le glycocalyx présent sur la face luminale des cellules endothéliales. **B.** Une photo prise en microscopie électronique à transmission montre une jonction serrée (flèches) et la ferritin cationisée (pointes de flèches) recouvrant la surface luminale de l'endothélium représentant le glycocalyx. **C.** Le glycocalyx est constitué des différents types d'heparan sulfate proteoglycanes (HSPG) dont l'épaisseur peut varier entre 50 nm et 11  $\mu m$  en fonction du débit sanguin alors que **D.** l'épaisseur entre les membranes apicales et basales des cellules endothéliales est de 200 à 300 nm (Adapté de Ueno, 2009).

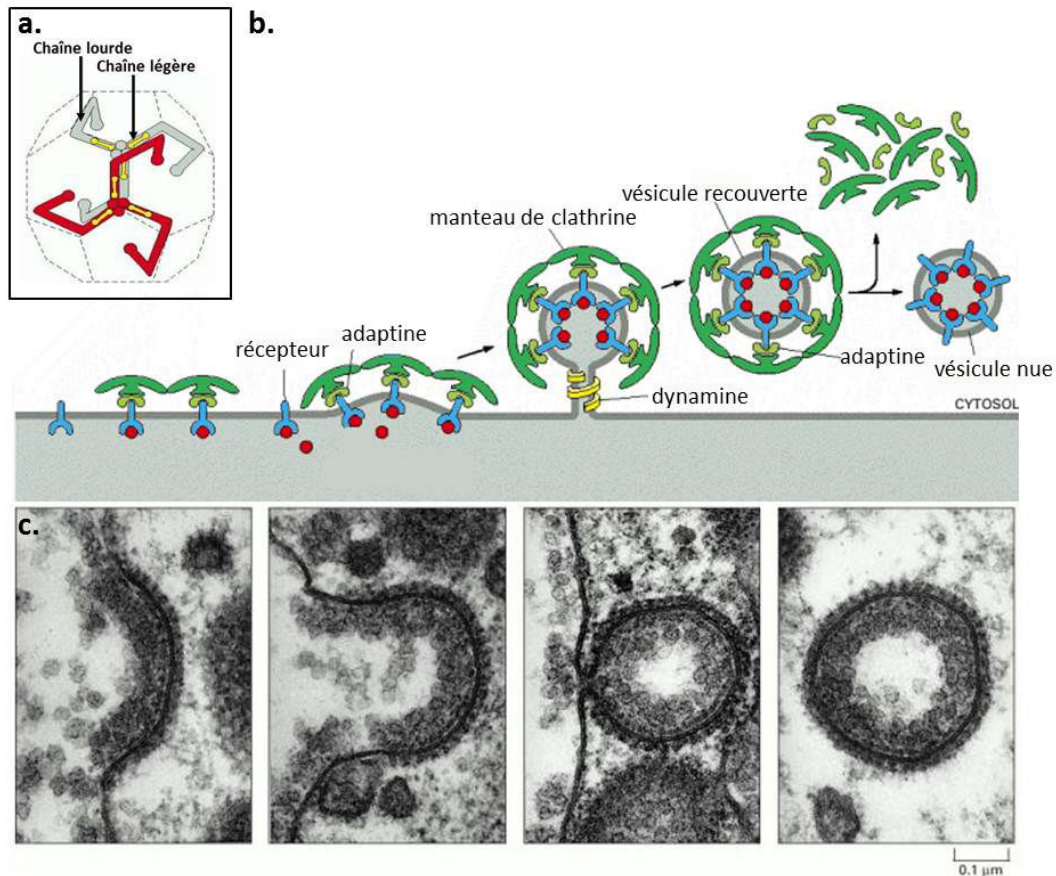
L'AMT permet à des protéines de haut poids moléculaire comme « l'albumine chargée positivement », de traverser les membranes après liaison non spécifique par des interactions électrostatiques avec les sites anioniques du glycocalyx (Herve *et al.*, 2008). Des domaines spécifiques de protéines traversant les membranes cellulaires tel que les « cell penetrating peptides » (CPP) ont été développés en tant que vecteurs permettant de délivrer des agents pharmacologiques vers le

tissu nerveux (Temsamani et Vidal, 2004; Kumar *et al.*, 2007; revue par Vlieghe and Khrestchatisky, 2013). Cependant, cette endocytose dépendante de la charge nette de la protéine, qui ouvre l'accès au tissu nerveux, est très peu spécifique de la BHE comparée à l'endocytose dépendant d'un récepteur exprimé à la BHE. L'AMT et le RMT partagent d'autres propriétés, avec notamment des processus d'endocytose et d'exocytose des vésicules formées par invagination de la membrane plasmique apicale. Ces néo-vésicules peuvent être recouvertes soit de clathrine soit de cavéoline qui vont orienter leur trafic intracellulaire.

## **B. Les vésicules de clathrine**

La clathrine est un hexamère d'environ 650 kDa constitué de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères qui s'assemblent spontanément en triskèle autour de vésicules qui apparaissent dense aux électrons, de tailles comprises entre 100 et 150 nm (Figure 19) (Johannes et Lamaze, 2002). La voie des vésicules recouvertes de clathrine dirige les molécules comme les lipoprotéines vers la dégradation lysosomale (Anderson et Higgins, 1997). Le pourcentage de la membrane plasmique recouverte de clathrine a été estimé à 2% de sa surface totale (Robinson, 1994). Bien évidemment, ce pourcentage varie selon le type cellulaire étudié. Par exemple, contrairement aux hépatocytes, les endothéliums de type continu renferment peu de vésicules recouvertes de clathrine (Schnitzer *et al.*, 1994).

Si la voie d'endocytose dépendante de la clathrine a longtemps été considérée comme l'unique voie d'internalisation des récepteurs transmembranaires, le développement de techniques de purification et de caractérisation moléculaire a mis en évidence l'existence d'une autre voie d'endocytose spécifique et saturable, indépendante de la clathrine impliquant une autre protéine nommée cavéoline formant des structures vésiculaires de type cavéoles.



**Figure 19** : Structure de la clathrine et formation des vésicules recouvertes de clathrine.

a. Structure des triskelions de clathrine. Chaque membre constituant le triskelion de clathrine comprend une chaîne légère et une chaîne lourde. La polymérisation des triskelions forme un treillis polygonal donnant sa forme à la vésicule naissante (Adapté de Näthke *et al.*, 1992).

b. Assemblage et désassemblage du manteau de clathrine. La polymérisation de la clathrine entraîne une incurvation de la surface membranaire, menant ensuite à la formation d'une vésicule recouverte de clathrine dans le cytoplasme. L'adaptine se lie à la fois aux récepteurs internalisés et aux triskelions de clathrine, permettant le recrutement de la membrane et du ligand du récepteur pour former un puits. Le détachement du puits pour former la vésicule nécessite un phénomène de fusion de membrane, qui implique la dynamine.

c. Photographies de microscopie électronique illustrant la formation progressive d'une vésicule recouverte de clathrine, observée lors de l'entrée des lipoprotéines du vitellus dans un ovocyte de poule (Perry et Gilbert, 1979). Les complexes récepteur/ligand se concentrent à la surface externe de la membrane, formant ensuite un puits puis une vésicule recouverte de clathrine, qui apparaît dense aux électrons.

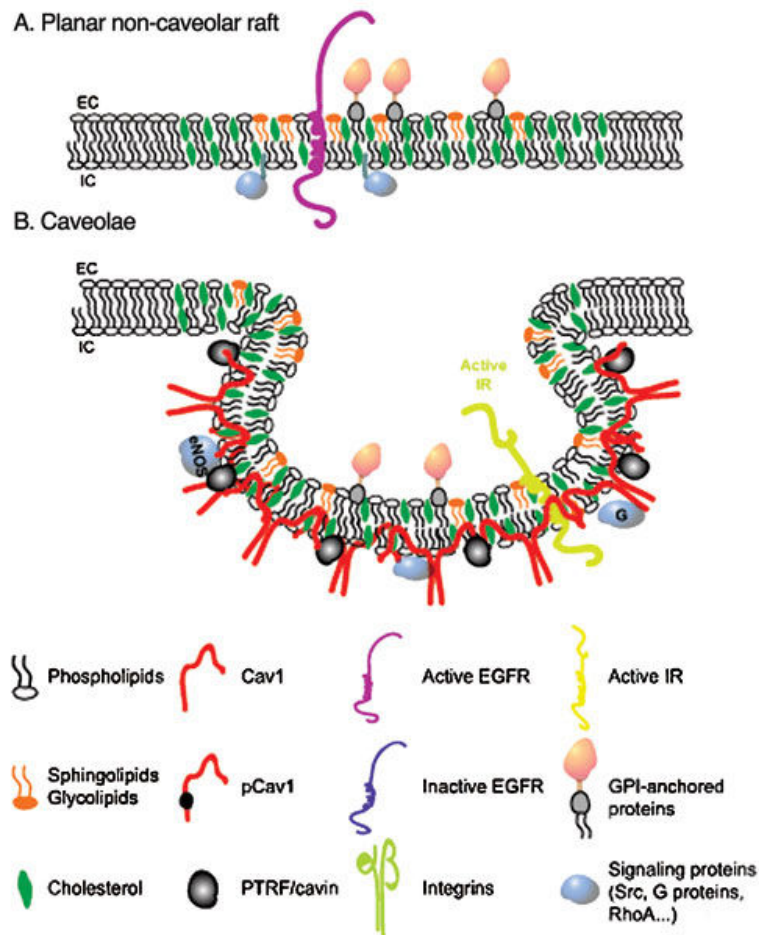
### C. Les cavéoles et les radeaux lipidiques

Les cavéoles sont des invaginations sphériques de la membrane plasmique plus petites que les vésicules recouvertes de clathrine dont le diamètre varie de 50 et 100 nm. Leur première identification en microscopie électronique a révélé une forme caractéristique en oméga (Palade, 1953). La protéine recouvrant ces vésicules, la cavéoline, a été découverte 40 ans plus tard. La cavéoline-1 (VIP21) est une phosphoprotéine de 22 kDa qui représente le principal constituant des cavéoles. La famille des cavéolines comprend trois isoformes : la cavéoline-1, 2 et 3 (Tang *et al.*, 1996). Au niveau cérébral, les cavéolines 1 et 2 sont trouvées au niveau des microvaisseaux cérébraux et plus particulièrement la cavéoline-1 (Rothberg *et al.*, 1992), qui a été détectée dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, dans les péricytes et les astrocytes. La cavéoline-3 est présente uniquement au niveau des astrocytes (Virgintino *et al.*, 2002). Il a été démontré que les cavéolines sont liées au cholestérol membranaire avec une forte affinité (Murata *et al.*, 1995). L'utilisation de substances comme la filipine ou l' $\alpha$ -cyclodextrine, qui lient le cholestérol, provoquent une déstructuration des cavéoles, dont le processus est initié par une dissociation de la cavéoline-1 et de la membrane.

Ainsi, il a été démontré que les cavéoles sont une forme spécialisée de radeaux lipidiques (lipid rafts) bien que ceux-ci ne présentent normalement pas la cavéoline. Les cavéoles se forment dans des régions riches en cholestérol, en sphingolipides et en cavéoline-1 (Boscher et Nabi, 2012) (Figure 20). Dans la plupart des cellules, comme au niveau des cellules endothéliales de la BHE, les cavéoles ne sont pas internalisées de manière constitutive (Thomsen *et al.*, 2002) bien que leur implication dans les processus d'endocytose soit largement établie. En effet, les cavéoles sont associés à d'autres acteurs protéiques tels que la N-ethylmaleimidesensitive factor (NSF), Soluble NSF Attachment Protein (SNAP) ou encore les protéines de fusion « vesicle SNAP Receptor (vSNARE) », impliquées dans le détachement des vésicules de la membrane plasmique et la fusion à des compartiments intra-cellulaires (Schnitzer, 2001). De plus, au niveau des cellules endothéliales de la BHE, la voie des cavéoles participe également au mécanisme de transcytose de l'insuline et de la transferrine (Zlokovic, 2008), du cholestérol, des acides gras, des lipoprotéines de haute densité (HDLs) (Meresse *et al.*, 1989; Balazs *et al.*, 2004), de la leptine (Zlokovic *et al.*, 2000) ou encore des immunoglobulines G (IgGs) (Deane *et al.*, 2005).

Des études ont montré que la composition lipidique riche en cholestérol des cavéoles, leur confère des propriétés biophysiques particulièrement fluides qui leur permettrait de répondre aux modifications de la membrane plasmique ainsi qu'à une modulation dynamique du trafic intracellulaire dépendant des cavéoles (Parton et Simons, 2007). Un dysfonctionnement cérébral est associé à une dérégulation des mécanismes de transport des cavéoles (Zlokovic, 2008; Zhao *et al.*,

2014). Finalement, il a été démontré que la cavéoline-1 régule l'expression de l'occludine et de ZO-1 dans un modèle de BHE *in vitro* et qu'elle serait également un élément protecteur dans la réaction inflammatoire modulé par la chemokine CCL-2 (Song *et al.*, 2007).



**Figure 20 :** Les cavéolines sont des protéines insérées dans la membrane plasmique des cellules. La formation des invaginations de la membrane plasmique au niveau des domaines de type radeau lipidique, qui vont donner lieu aux vésicules de type cavéoles, est dépendante de l'expression de la cavéoline. Outre cette fonction, les cavéolines sont également des complexes régulateurs (promoteurs ou inhibiteurs) de la signalisation intracellulaire, qu'elles soient associées ou pas aux cavéoles, et elles interagissent avec de nombreux partenaires. Les cavéolines et les radeaux lipidiques ont été impliqués dans la compartimentalisation des membranes. En effet, les protéines et les lipides s'accumulent au niveau de ces micro-domaines membranaires où elles transmettent rapidement des cascades de signalisation spécifiques. Elles sont impliquées dans la prolifération cellulaire, la survie, l'apoptose ou encore la migration cellulaire (Adapté de Boscher et Nabi, 2012).

## IV. Les stratégies d'adressage cérébral basées sur le mécanisme de RMT

Plusieurs récepteurs exprimés au pôle apical des cellules endothéliales de la BHE ont été exploités en tant que cibles pour l'adressage cérébral d'agents pharmacologiques, en raison de leur appartenance au mécanisme commun de RMT et leur capacité de transport de molécules thérapeutiques de haut poids moléculaires. Parmi les plus cités dans la littérature, il y a l'insulin receptor (IR) (Duffy et Pardridge, 1987; Fishman *et al.*, 1987 ; Miller *et al.*, 1994), l'insulin-like growth factor receptor (IGFR) (revue par Pardridge, 1986), le transferrin receptor (TfR) (Jefferies *et al.*, 1984; Pardridge *et al.*, 1987; Raub et Newton, 1991; Skarlatos *et al.*, 1995; Descamps *et al.*, 1996) et les récepteurs appartenant à la famille du low-density lipoprotein receptor (LDLR) tel que les « low density lipoprotein receptor related protein-1 (LRP1) », LRP2 (megalin), LRP8 et le LDLR en tant que récepteur prototypique de la famille (Méresse *et al.*, 1989; Gosselet *et al.*, 2009; Daneman *et al.*, 2010). Leur regroupement au sein des récepteurs impliqués dans le mécanisme de RMT ne doit pas occulter leurs différences sur les plans structurels et fonctionnels, en particulier le trafic du complexe ligand-récepteur.

Une approche de « drug delivery » apparentée à une approche « cheval de Troie », concept emprunté à la recherche en virologie (Blumenthal et Loyter, 1991), consiste à lier une molécule active ne franchissant pas la BHE à un ligand du récepteur appelé vecteur (Pardridge, 2002). Ce vecteur peut se décliner sous plusieurs formes : un ligand naturel ou une séquence peptidique réduite (domaine de liaison au récepteur) ou un anticorps spécifique d'un domaine extracellulaire de ce récepteur. Le vecteur peut être compétitif ou pas avec un des ligands naturels du récepteur. Les deux entités peuvent être associées par fusion (protéine recombinante) ou par couplage chimique (e.g. lysines ou cystéines) afin de générer des conjugués qui sont endocytés selon la voie endogène de trafic du récepteur (revue par Pardridge, 1999, 2001, 2003, 2007, 2012; Tuma et Hubbard, 2003; Misra *et al.*, 2003; Jones et Shusta, 2007; de Boer et Gaillard, 2007; Gabathuler, 2010; Vlieghe et Krestchatisky, 2013; Lalatsa *et al.*, 2014; Lajoie et Shusta, 2015).

### A. Le récepteur à l'insuline : IR

L'IR a été mis en évidence au niveau des membranes luminale et abluminale des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Toutefois, il a été montré que seul le récepteur exprimé face luminale présente une haute affinité pour l'insuline et qu'il permet le transport de l'insuline du sang vers le cerveau (Duffy et Pardridge, 1987; Miller *et al.*, 1994). L'insuline n'a cependant aucune incidence sur le transport du glucose à travers la BHE bien qu'elle jouerait un rôle dans le développement cérébral et en particulier la maturation neuronale. La société **Armagen Technologies**



(Santa Monica, CA, USA) développe un anticorps monoclonal de souris contre l'IR humain (HIR mAb) afin d'améliorer le passage de petites molécules non-organiques, de protéines et pour le développement d'approches de thérapie génique non virale. La technologie est basée sur l'ingénierie moléculaire de protéines recombinantes par fusion afin d'obtenir une entité fonctionnelle gardant l'activité de la drogue et l'affinité pour l'IR. Par exemple, l'HIR mAb a été fusionné soit à l'enzyme iduronidase pour le traitement du syndrome de Hurler, classé en tant que « lysosomal deficiency syndrome » (LDS), par « enzyme replacement therapy (ERT) » (pipeline AGT-181 ; Boado *et al.*, 2007; Boado *et al.*, 2009; Boado *et al.*, 2012; revue par Pardridge et Boado 2012; Boado *et al.*, 2014), soit à l'érythropoïétine (EPO) en tant qu'agent neuroprotecteur dans le cadre de lésions traumatiques du cerveau ou de la moelle épinière et la maladie de Parkinson (pipeline AGT-115).

## **B. Le récepteur à la transferrine : TfR**

Le transport du fer au travers de la BHE est lié à celui de la transferrine (Tf) et de son récepteur, le TfR. Son expression et sa fonction ont été extensivement étudiées (Jefferies *et al.*, 1984; Pardridge *et al.*, 1987; Risau *et al.*, 1986) et les données initiales supportaient la notion de transcytose de la transferrine di-ferrique à travers les cellules endothéliales via sa libération dans le parenchyme cérébral (Descamps *et al.*, 1996; Raub *et al.*, 1991; Skarlatos *et al.*, 1995; Fenart et Cecchelli, 2003). Les résultats obtenus dans des modèles de BHE *in vitro* indiquaient que 75% de la transferrine endocytée par les cellules endothéliales atteignaient le compartiment abluminal, permettant l'approvisionnement du SNC en fer. Ces résultats étayaient l'hypothèse selon laquelle la transferrine endocytée n'était pas dégradée mais transférée, avec le fer qu'elle porte, dans le compartiment abluminal (Fishman *et al.*, 1987; Pardridge *et al.*, 1991). Ces démonstrations *in vitro* ont pourtant été controversées *in vivo*. En effet, le fer présent dans le sang se complexe avec l'apo-transferrine pour former l'holo-transferrine qui la distribue à tous les tissus de l'organisme. Cette holo-transferrine présente une affinité augmentée pour son récepteur au niveau luminal de la BHE au pH sanguin. Une fois le complexe endocyté, l'acidité du pH endosomal entraîne la dissociation du fer de la transferrine mais ne dissocie pas le complexe apo-Tf-TfR qui est recyclé à la membrane apicale (Roberts *et al.*, 1993). Au pH sanguin, l'apo-transferrine se dissocie de son récepteur et repart dans la circulation, avide de fer. Le fer, quant à lui, est pris en charge par un transporteur appelé DMT-1 (Divalent Metal Transporter -1). Celui-ci permettrait la sortie du fer dans le cytosol de la cellule endothéliale (Burdo *et al.*, 2001), qui pourrait rejoindre le compartiment cérébral en empruntant la ferroportine. Cette dernière est par ailleurs détectée au niveau de la membrane abluminale des cellules endothéliales de la BHE (Wu *et al.*, 2004). De nombreuses études réalisées *in vivo* confirment ce mécanisme. Elles ont montré qu'après injection de la Tf par voie intraveineuse,

celle-ci est soit recyclée vers le sang, soit rapidement catabolisée. Ainsi, seul le fer est retrouvé au niveau du parenchyme cérébral (Roberts *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 1993).

En parallèle de ces études, le TfR exprimé à la BHE a été exploité en tant que cible de vectorisation d'agents thérapeutiques vers le cerveau. Des anticorps dirigés contre le TfR, non compétitifs avec la transferrine endogène, ont été développés pour le transport de macromolécules telles que le glial-derived neurotrophic factor (GDNF), l'érythropoïétine (EPO), le TNF receptor II (TNFR-II), et diverses enzymes thérapeutiques à travers la BHE dans des modèles pré-cliniques (Pardridge, 2012; Pardridge et Boado, 2012). L'anticorps monoclonal OX26 (Pardridge, 2007), dirigé contre le TfR de rat, a été utilisé pour transporter le nerve growth factor (NGF) vers le parenchyme cérébral (Friden *et al.*, 1993). Ce même anticorps a aussi été couplé à des liposomes chargés de daunomycine, une molécule organique utilisée généralement dans le traitement périphérique de la leucémie et ici dans le cas de tumeurs cérébrales, menant à la formation de macromolécules appelées « immunoliposomes » (Huwylar *et al.*, 1996). Cette construction permet à la daunomycine d'atteindre spécifiquement et en quantité plus importante le SNC par rapport à la daunomycine injectée par voie intraveineuse seule ou associée à des liposomes stabilisés ou non avec du polyéthylène glycol (PEG). La transcytose de ces immunoliposomes a été démontrée *in vitro* et *in vivo* chez le rat (Cerletti *et al.*, 2000). En chargeant ces immunoliposomes avec un plasmide, il a été possible d'induire l'expression de  $\beta$ -galactosidase au sein du SNC, notamment au niveau neuronal (Shi *et al.*, 2001a). Cependant, les quantités transférées du sang vers le parenchyme nerveux ont toujours été modestes (Yu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Sumbria *et al.*, 2013) avant la prise en considération du mécanisme de trafic intracellulaire du complexe Tf/TfR et la notion de dissociation du complexe Anticorps/TfR. En effet, créer des vecteurs de haute affinité pour les récepteurs exprimés à la BHE s'est avéré insuffisant s'ils ne se dissocient de leur récepteur cible à pH endosomal, et s'ils suivent le récepteur soit dans sa voie de recyclage soit vers le compartiment lysosomal. Deux stratégies développées par Hoffmann-La Roche (Bâle, Suisse) et Genentech Inc (San Francisco, CA, USA) ont permis de contourner ces problématiques en diminuant l'affinité des anticorps-vecteurs ciblant le TfR, soit en développant une forme chimérique monovalente (Yu *et al.*, 2011; Niewoehner *et al.*, 2014), soit en modifiant par génie génétique le domaine de liaison afin d'obtenir une affinité plus faible à pH endosomal (Sade *et al.*, 2014). Ces études ont permis de corrélérer l'optimisation de la dissociation de l'anticorps du TfR avec l'optimisation de leur transfert vers le parenchyme nerveux.

### **C. Les récepteurs de la famille du LDLR**

Les récepteurs de la famille du LDLR sont des glycoprotéines transmembranaires généralement reconnues comme récepteurs de surface cellulaire capables d'endocytose et qui sont

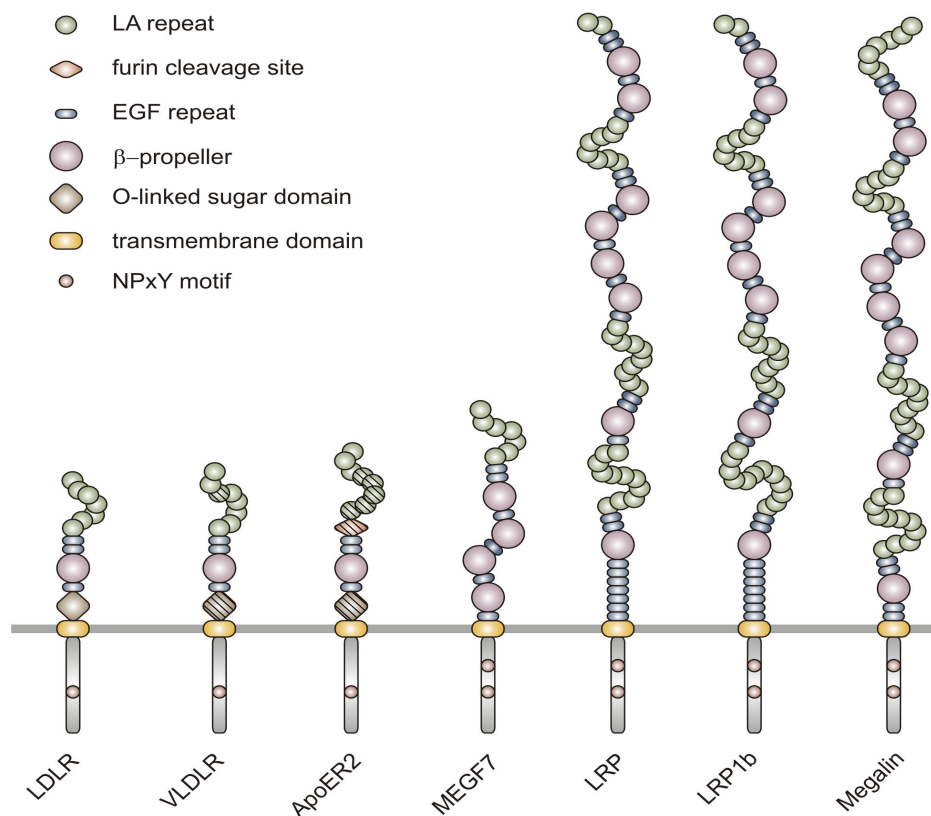
exprimés avec un certain degré de spécificité tissulaire (Brown et Goldstein, 1979, 1986; Yamamoto *et al.*, 1984; Herz et Bock, 2002; Chung et Wasan, 2004; reviewed in Lane-Donovan *et al.*, 2014). Les récepteurs de la famille du LDLR sont composés de 10 membres différents. Les plus étudiés au niveau des cellules endothéliales de la BHE sont le LDLR, LRP1, LRP2 (ou megalin), LRP8 et vLDLR. Ils sont également exprimés par les neurones (Moestrup *et al.*, 1992), les astrocytes et les péricytes (Itoh *et al.*, 2006; Gosselet *et al.*, 2009). La présence des transcripts pour ces récepteurs a été démontrée par analyse transcriptomique de (i) cellules endothéliales cultivées seules ou (ii) en co-culture avec des astrocytes (Cecchelli *et al.*, 1999, 2007; Dehouck *et al.*, 1990) ou encore (iii) directement à partir de capillaires cérébraux fraîchement extraits (Gosselet *et al.*, 2009; Daneman *et al.*, 2010). Ces résultats ont également permis de révéler la communication bidirectionnelle entre les cellules endothéliales et les astrocytes ainsi que l'importance de la BHE concernant la régulation de l'homéostasie cérébrale du cholestérol.

Les membres de la famille LDLR sont caractérisés par une structure modulaire commune et des domaines fonctionnels distincts présents en nombres spécifiques (Figure 21). Ces modules sont les suivants :

- Domaine de type A (LA) : 40 répétitions de chaque résidu, riche en cystéines et ponts disulfures générant une surface chargée négativement; certaines combinaisons de ces répétitions permettent les interactions avec les différents ligands
- Domaine de type B : aussi connu comme domaine d'homologie du précurseur à l'EGF, contenant des répétitions de type EGF et des domaines YWTD de type hélice beta
- Un domaine transmembranaire,
- La région cytoplasmique avec (a) le ou les motifs pour l'internalisation du récepteur par l'intermédiaire des puits recouverts de clathrine ou cavéoline, contenant notamment le térapeptide consensus Asn-Xaa-Pro-Tyr (NPXY). Ce domaine cytoplasmique contrôle à la fois l'endocytose et la signalisation en interagissant avec le domaine phosphotyrosine (PTB).

En plus de ces domaines qui peuvent être trouvés dans tous les récepteurs de la famille, le LDLR et certaines isoformes de LRP8 (ApoER2) et du vLDLR présentent une courte région O-glycosylée. ApoER2 en outre, présente un site de clivage pour la protéase furine entre les domaine A et B libérant un fragment soluble de récepteur. Seulement cinq des membres lient des apolipoprotéines : LDLR, vLDLR, LRP2, LRP1 et LRP8 (Hussain *et al.*, 1999; Gliemann, 1998; Herz, 2001). Le LDLR avait été mis en évidence au niveau protéique à partir de capillaires cérébraux fraîchement extraits (Méresse *et al.*, 1989). Des études complémentaires concernant la capacité de ces récepteurs à faire passer les lipoprotéines plasmatiques à travers la BHE ont été menées à partir de modèles de BHE *in vitro* statique consistant en une co-culture de cellules endothéliales de

capillaires cérébraux de bovins et d'astrocytes de rats reproduisant les caractéristiques principales de la BHE *in vivo* (Cecchelli et al. 1999, 2007; Dehouck *et al.*, 1990). Ces études ont montré que les cellules endothéliales ont la possibilité de prendre en charge le LDL selon un mécanisme LDLR-dépendant et de le transloquer sans le dégrader à travers la monocouche de cellules endothéliales via une endocytose cavéoline-dépendante (Dehouck et al 1997; Candela *et al.*, 2008).

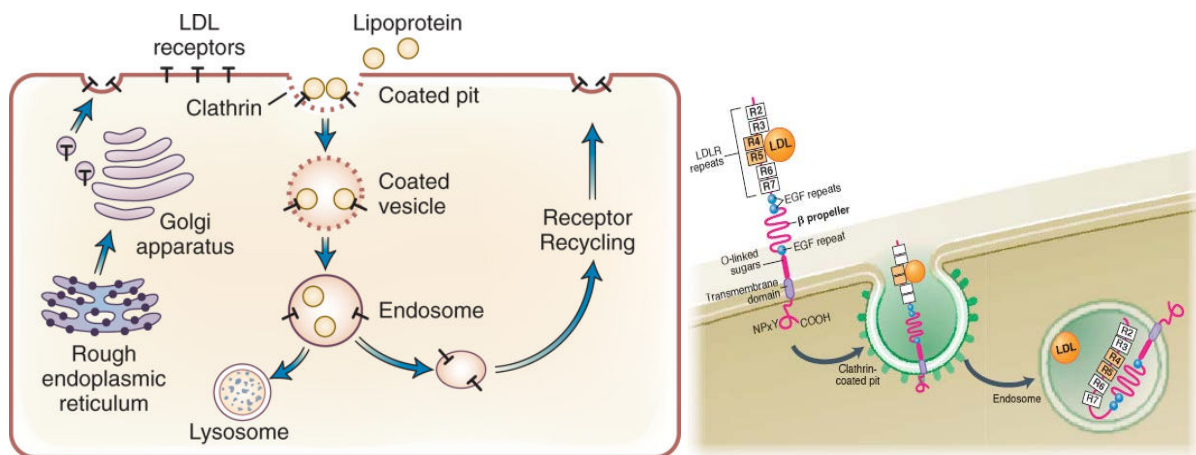


**Figure 21** : Structures modulaires des récepteurs de la famille du LDLR. Les domaines hachurés peuvent être différenciellement épissés et ne se trouvent que dans certains isoformes du récepteur (Adapté de Hussain *et al.*, 1999).

## 1. LDLR

Le LDLR est le récepteur prototypique de la famille. Un aspect caractérisant cette famille est leur potentiel de récepteurs multiligands, dont le trafic intracellulaire dans le compartiment vésiculaire peut être modulé en fonction des différents ligands dont les apolipoprotéines (Hussain *et al.*, 1999; Lillis *et al.*, 2008; Spuch *et al.*, 2012). Dans la plupart des types cellulaires, le complexe apolipoprotéine-LDLR est internalisé par endocytose suivie par une conversion en endosome précoce (early endosome) dont l'acidification du pH entraîne la libération et la dégradation lysosomale de la particule lipoprotéique, tandis que le récepteur est recyclé vers la surface de la cellule (recycling endosome) (Figure 22) (Broadwell, 1989; Davis *et al.*, 1987; Esser et Russell, 1988; Gotthardt *et al.*,

2000). Ces complexes lipoprotéiques tel que les LDL ou HDL sont les transporteurs plasmatiques des acides gras et du cholestérol.



**Figure 22 :** A pH neutre, les particules de LDL (charges positives) se lient au domaine de liaison extracellulaire du LDLR, par les régions R4 et R5 (au moins) riche en cystéines (charges négatives) et l'hélice  $\beta$  ( $\beta$ -propeller). Lors de l'acidification du pH endosomal, les histidines 562 et 586 du  $\beta$ -propeller se chargent positivement, l'ApoB subit des réarrangements de conformation qui associés à la perte d'un ion  $\text{Ca}^{2+}$  sur le LDLR, entraînent la libération de la particule de LDL (Adapté de Huang *et al.*, 2010).

Le cerveau est l'organe le plus riche en cholestérol (essentiellement sous forme libre non estérifié) et représente 20 à 25% des stérols totaux du corps chez l'homme dont 70% se trouve dans la gaine de myéline entourant les axones (Björkhem et Meaney, 2004). Le cholestérol cérébral résulte principalement de la synthèse *de novo* et il y a peu de preuves que le cholestérol contenu dans ces particules lipoprotéiques soit transporté en masse de la circulation plasmatique vers le parenchyme nerveux via la BHE (revue par Dietschy et Turley, 2004). Ainsi, l'expression du LDLR à la BHE (Méresse *et al.*, 1989; Gosselet *et al.*, 2009; Daneman *et al.*, 2010) soulève la question de son rôle et de son intérêt en tant que cible de vectorisation au niveau de la BHE pour le transport d'agents pharmaceutiques vers le cerveau. La transcytose des complexes lipoprotéiques à la BHE a été quantifiée dans le compartiment abluminal de modèles de BHE *in vitro* (Dehouck *et al.*, 1994, 1997; Candela *et al.*, 2008). D'autres études montrent que le transport de la partie cholestérol de ces complexes est un processus lent en condition physiologique adulte (revue par Dietschy et Turley, 2004), également soutenu par l'absence de détection ApoB dans le liquide céphalo-rachidien (Danik *et al.*, 1999) par rapport ApoE et ApoA1 (Borghini *et al.*, 1995; Demeester *et al.*, 2000).

Le LDLR exprimé à la BHE et l'ApoB ont été impliqués dans des désordres neurologiques sévères impliquant une perturbation du métabolisme du cholestérol cérébral tels que la maladie de

Huntington (HD) et la maladie de Tangier (TD) aussi connue sous le nom de “familial alpha-lipoprotein deficiency” (Martins *et al.*, 2009; Vance, 2012). Dans ces pathologies, la diminution de la disponibilité du cholestérol dans les liquides interstitiels du cerveau est due à des mutations génétiques entraînant soit une réduction de la synthèse de cholestérol (Valenza *et al.*, 2010) soit une diminution de sa sécrétion par les astrocytes (Karasinska *et al.*, 2009). Les symptômes cliniques de ces deux pathologies ont été atténués par une alimentation riche en gras et une augmentation de la captation du cholestérol périphérique par la BHE (Sun *et al.*, 2007; Camargo *et al.*, 2012). Ce phénomène d’augmentation de la captation des LDL par les cellules endothéliales suite à une déplétion de cholestérol chez les astrocytes avait été démontré dans un modèle de BHE *in vitro* (Dehouck *et al.*, 1994-1997; Candela *et al.*, 2008) ce qui renforce l’implication de la BHE dans la régulation de l’homéostasie du cholestérol cérébral.

Le potentiel à utiliser les apolipoprotéines pour passer la BHE a été validé avec des nanoparticules injectées par voie intraveineuse qui chargeaient naturellement à leur surface les apolipoprotéines plasmatiques. Ce phénomène eut pour conséquence d’augmenter leur transport cérébral via la BHE et suggérait l’implication du LDLR (Kreuter *et al.*, 2002; Ambrusi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007). Ces observations ont conduit les scientifiques à utiliser les lipoprotéines telles que ApoB et ApoE sous leur forme entière (Kawahara *et al.*, 2011) ou réduite à leur séquence peptidique minimale contenant le domaine de liaison au LDLR (binding domain, BD) pour, soit les coupler à des nanoparticules, soit produire des protéines chimériques afin d’augmenter leur transport vers le tissu nerveux cérébral.

Par exemple, la décoration avec le domaine de liaison d’ApoB de différents types de nanoparticules (NPs) et liposomes contenant des molécules thérapeutiques ne franchissant pas la BHE (revue par Vlieghe et Khrestchatisky, 2013) augmente leur pénétration cérébrale et par conséquent leur efficacité dans des modèles de douleur (p.ex. encapsulation du peptide opioïde dalargine) (Kreuter, 2004; Michaelis *et al.*, 2006; Shamenkov *et al.*, 2006; Kreuter *et al.*, 2007). La décoration des NPs avec des vecteurs peptidiques a permis également de limiter leur captation par les macrophages et le foie (revue par Keck *et al.*, 2013). Dans le cas de tumeurs cérébrales, le ciblage du LDLR a été exploité dans une stratégie de « dual targeting » car le LDLR est également exprimé par de nombreuses cellules tumorales dont les glioblastomes (Firestone, 1994; Versluis *et al.*, 1998; Nikanjam *et al.*, 2007; Maletínská *et al.*, 2000; Pinzón-Daza *et al.*, 2012) ainsi que les neurones et les astrocytes (Fan *et al.*, 2001). Dans ce cadre, la société **Capsulation Pharma AG** (Berlin, Allemagne) développe des NPs décorées avec différentes apolipoprotéines ciblant probablement le LDLR (Keck *et al.*, 2013).

Parmi les différents peptides issus du BD des apolipoprotéines pour le LDLR, le peptide de 38 acides aminés issu de l’ApoB-BD a été fusionné à différentes enzymes dans le cadre de stratégies

ERT. La séquence ApoB-BD a permis à ces protéines chimères de traverser la BHE et de restaurer l'activité enzymatique cérébrale chez la souris par rapport aux enzymes non vectorisées (Spencer et Verma, 2007; Sorrentino *et al.*, 2013; Böckenhoff *et al.*, 2014). Une autre enzyme, la neprilysine, une metalloproteïnase qui dégrade le peptide  $\beta$ -amyloïde accumulé dans les cellules cérébrales dans la pathologie d'Alzheimer, a été fusionnée à la même séquence d'ApoB-BD (Spencer *et al.*, 2011). Vingt quatre heures après l'administration intraveineuse chez la souris, la neprilysine chimérique a été quantifiée dans le cerveau à 1,7 % de la dose injectée et permet de réduire l'accumulation d'A $\beta$  dans le cerveau, d'augmenter le nombre de synapses d'améliorer l'apprentissage et la mémorisation par comparaison à la neprilysin non conjuguée (Spencer *et al.*, 2014).

## 2. LRP: sous-famille

Les récepteurs de la sous-famille LRP sont exploités en tant que cibles vasculaires cérébrales par 3 sociétés, **Raptor Pharmaceutical** (Novato, CA, USA), **BiOasis Technologies Inc** (Vancouver, Canada) et **Angiochem** (Montreal, Canada) selon la même approche du « cheval de Troie » bien qu'elles diffèrent par la nature de leurs vecteurs-ligands de LRP qui sont soit sous forme de protéine entière ou réduite à une séquence peptidique minimale représentant le domaine de liaison au récepteur comme énoncé précédemment.

**Raptor Pharmaceutical** a initié un accord de licence avec Roche pour l'évaluation de sa plateforme NeuroTrans basée sur la protéine « receptor associated protein (RAP, 39 kDa) », ligand préférentiel de LRP1 (Pan *et al.*, 2004). La protéine RAP transporte des protéines thérapeutiques telles que l'enzyme iduronidase (Prince *et al.*, 2004) ou de petites molécules organiques telles que la doxorubicine dans le cerveau.

La protéine p97 (80 kDa), aussi connue en tant que mélanotransferrine (MTf), présente un taux de transport relativement élevé à travers la BHE qui pourrait impliquer un membre de la famille LRP (LRP1) (Rothenberger *et al.*, 1996; Demeule *et al.*, 2002; Karkan *et al.*, 2008). **BiOasis Technologies Inc** développe une plateforme d'adressage cérébral appelée Transcend basée sur une portion de peptide représentant 2% de la MTf humaine (MTfp). Ce peptide transporte des anticancéreux organiques tels que la doxorubicine (DOX), l'adriamycine (ADR) et le paclitaxel (PTX) à travers la BHE et atteint le parenchyme nerveux en quantité thérapeutique (Karkan *et al.*, 2008). Le pipeline de BiOasis est constitué du MTfp conjugué à l'anticorps monoclonal Herceptin (trastuzumab TM, Hoffmann-La Roche) pour le traitement des métastases du cancer du sein au cerveau (pipeline BT2111), à l'enzyme iduronidase pour le traitement des LDS par ERT et à des SiRNA.

**AngioChem** est la société la plus avancée dans la validation de sa stratégie BHE/RMT et dispose d'une plateforme appelée « Engineered peptide compound platform (EpiC) » basée sur un

peptide de 19 acides aminés appelé Angiopep-2 (ANG2) dérivé de l'aprotinine un ligand protéique de LRP1 (Demeule *et al.*, 2008a, 2008b; Bertrand *et al.*, 2010). Le pipeline d'Angiochem est constitué d'ANG2 conjugué à 3 molécules de paclitaxel (ANG1005, Phase clinique II) (Regina *et al.*, 2008), à la doxorubicin (ANG1007), à l'etoposide (ANG1009) (Ché *et al.*, 2010; Bertrand *et al.*, 2011) ou à l'Herceptin (ANG4043; phase préclinique) (Regina *et al.*, 2014), pour le traitement des tumeurs cérébrales métastatiques. Le peptide ANG2 est également conjugué au peptide neurotensin (ANG2002 ; phase préclinique) (Demeule *et al.*, 2014) pour le traitement de la douleur et à des enzymes pour le traitement des LDS par ERT (EPiC-enzyme platform) en partenariat avec les sociétés GlaxoSmithKline (Brentford, England, United-Kingdom) et Genzyme (Cambridge, MA, USA). Le peptide ANG2 a aussi été utilisé pour fonctionnaliser des NPs dans le cadre de la thérapie génique dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson (Huang *et al.*, 2013).

Le récepteur LRP8 (ApoER2) est un autre récepteur de la famille qui est exprimé au niveau cérébral par les astrocytes et les neurones (Kim *et al.*, 1996; Hussain *et al.*, 1999). Des études de transcriptomique détaillent l'expression de ce récepteur par les cellules endothéliales de la BHE (Gosselet *et al.*, 2009; Daneman *et al.*, 2010). La littérature est pauvre quand à son potentiel de RMT ; ce récepteur est décrit pour avoir un mécanisme de transcytose plus lent comparé aux LDLR et LRP1 (Li *et al.*, 2001; Cuitino *et al.*, 2005). Il présente des variantes issues de l'épissage alternatif dont un variant serait spécifique de l'endothélium cérébral (Korschineck *et al.*, 2001). Le récepteur LRP8 est associé au récepteur vLDLR au niveau post-synaptique en tant que co-récepteur de la Reelin, une protéine de signalisation membranaire (Duit *et al.*, 2010). La sélénoprotéine (SePP1) plasmatique dérivée des hépatocytes, une protéine de transport du sélénium essentielle au bon fonctionnement cérébral, est un ligand du récepteur LRP8 (Burk *et al.*, 2007; Masiulis *et al.*, 2009; Burk et Hill, 2009). Cependant, le transport de SePP1 à travers la BHE dépendante de LRP8 reste une hypothèse à ce jour.

## **D. Autres récepteurs impliqués dans des mécanismes de RMT à la BHE**

### **1. Le récepteur à la leptine**

Le peptide leptine est un régulateur du poids corporel par régulation de la prise alimentaire. La leptine est sécrétée par les cellules du tractus gastro intestinal dans la circulation sanguine. Le récepteur ObR exprimé au niveau apical des capillaires cérébraux est impliqué dans le transfert de la leptine selon un mécanisme de RMT à travers la BHE via le parenchyme nerveux afin d'assurer la satiété. Des liposomes ont été décorés avec le peptide leptine afin d'augmenter leur transfert cérébral (Tamaru *et al.*, 2010). Cette étude montra que l'internalisation des complexes leptin-liposomes par les cellules endothéliales de la BHE était de type macropinocytose, non-dépendante



de la clathrine et de la cavéoline (Ragnarsson *et al.*, 2008; Malyukova *et al.*, 2009). L'intérêt du récepteur ObR est son expression élevée et préférentielle par les cellules endothéliales de la BHE (Bjørbaek *et al.*, 1998), bien que son expression dépende de la prise alimentaire.

## 2. *Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine*

Le récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) est exprimé par les cellules endothéliales des capillaires de la BHE (Kumar *et al.*, 2007; Zhan *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2011). Ce récepteur peut lier, voire être inhibé par, des peptides et protéines virales neurotoxiques présents dans la circulation sanguine, et qui pénètrent le parenchyme nerveux. Ces observations ont donné lieu à l'utilisation du nAChR pour le transfert transvasculaire de divers agents thérapeutiques vers le cerveau (Abbruscato *et al.*, 2002; Lindstrom *et al.*, 2003; Hogg *et al.*, 2003; Gotti et Clementi, 2004). Un peptide de 16 acides aminés, <sup>1</sup>CDX (FKESWREARGTRIERG), a été développé par « structure guided design ». Ce peptide, avec une affinité submicromolaire pour le nAChR, a été utilisé pour décorer des micelles et augmenter leur accès cérébral (Zhan *et al.*, 2011). L'implication de ce peptide et du nAChR dans un mécanisme de transcytose et son adressage vers le compartiment lysosomal, a été mis en évidence par liaison du peptide avec un traceur fluorescent et incubation sur une monocouche de cellules endothéliales dans un modèle *in vitro* de BHE (Wei *et al.*, 2015).

## 3. *Le récepteur de la toxine diphtérique*

La toxine diphtérique (TD) possède un récepteur HB-EGF (membrane-bound precursor of heparin-binding epidermal growth factor) spécifiquement exprimé à la surface de l'endothélium cérébral, des neurones et de la glie (Raab et Klagsbrun, 1997). Il ne possède pas de ligand endogène et son expression est augmentée lors de la pathologie associée, l'ischémie cérébrale et les gliomes (Gaillard et de Boer, 2006). Le récepteur HB-EGF a surtout été étudié pour son implication dans le développement de phénotypes malins contribuant aux métastases des tumeurs invasives. Des études récentes indiquent une élévation significative de l'expression du gène codant pour HB-EGF dans de nombreux cancers (Buzzi *et al.*, 2004), augmentation conservée dans nombre de lignées cellulaires tumorales (Miyamoto *et al.*, 2011).

Un analogue non toxique de la DT, CRM197 (58.4 kDa), se liant au récepteur HB-EGF, a été le premier vecteur développé par la société **To-BBB** (Leiden, Pays-Bas, devenue 2-BBB) (Gaillard *et al.*, 2004, 2005a, 2005b). CRM197 présente des paramètres de sécurité excellent chez l'humain car il a été longtemps utilisé en tant que protéine porteuse à fort pouvoir immunogène dans la vaccination contre la diphtérie (Anderson, 1983). CRM197 a été utilisé comme vecteur conjugué à une enzyme pour lui permettre de traverser une monocouche de cellules endothéliales cérébrales dans un

modèle *in vitro* de BHE bovin et à travers la BHE *in vivo* après injection intraveineuse chez le cochon d'inde (Gaillard *et al.*, 2005). Bien que le récepteur HB-EGF soit exprimé chez l'homme, le singe, le rat et la souris avec une distribution tissulaire semblable, le rat et la souris sont résistantes à la toxine diphtérique en raison d'une substitution d'acides aminés dans le domaine de liaison au récepteur de HB-EGF, réduisant la liaison de la toxine diphtérique (Mitamura *et al.*, 1995) et limitant les étapes de recherche et développement de CRM197 chez le rongeur. Une autre limite révélée lors d'une étude clinique (Buzzi *et al.*, 2004) est la présence d'anticorps neutralisant la toxine diphtérique, se développant suite à l'injection de CRM197 ou présent dans le sérum de patients, conséquence d'une précédente vaccination, qui réduit l'efficacité du traitement.

#### 4. *Le récepteur de la glutathione*

La glutathione (GSH) est un tripeptide antioxydant endogène, trouvé à des taux élevés dans le cerveau. Son récepteur est exprimé abondamment par les cellules endothéliales de la BHE (Kannan *et al.*, 1990; Zlokovic *et al.*, 1994; Kannan *et al.*, 2000). Jusqu'à récemment, la société **To-BBB** (Leiden, Pays-Bas, devenue 2-BBB) était la plus avancée dans la technologie de développement de liposomes dont la base lipidique est couplée à des molécules de polyéthylène glycol (PEG) permettant la liaison à des molécules de GSH en tant que vecteurs (GSH-PEG-liposomes, G Technology), capables de traverser la BHE (Gaillard, 2010; Rip *et al.*, 2014). Les GSH-PEG-liposomes, formulés avec de la doxorubicine (pipeline 2B3-101) sont actuellement évalués dans une étude clinique en phase II chez des patients atteints des métastases cérébrales issues de cancer du sein (Gaillard et de Boer, 2008). Une seconde étude clinique en phase I évalue un autre complexe GSH-PEG-liposomes dans le traitement de la sclérose en plaques (pipeline 2B3-201).

#### 5. *Le récepteur de la toxine tétanique*

La toxine tétanique (TeNT) envahit le cerveau en utilisant le transport rétrograde axonal périphérique et trans-synaptique en se liant au récepteur GT1b (Sinha *et al.*, 2000). Comme les autres toxines bactériennes, le précurseur de la TeNT est composé de 2 fragments peptidiques, une chaîne lourde de 100 kDa et une légère de 50 kDa, maintenues entre elles par un pont disulfure puis clivé par les enzymes bactériennes libérant les 2 fragments. La toxine comprend trois sites fonctionnels, deux sur la chaîne lourde et un sur la chaîne légère. La chaîne légère est une endopeptidase à zinc, avec un pouvoir catalytique. Sur la chaîne lourde on retrouve la région carboxy terminale (TTC), responsable de la forte affinité de la toxine au récepteur GT1b présent sur les neurones (Sinha *et al.*, 2000) et la région amino terminale qui sert à la pénétration de la toxine à l'intérieur des neurones. La troisième région fonctionnelle, se situant également sur la chaîne légère,

est la seule région toxique, responsable du blocage de la libération des neurotransmetteurs. Le fragment TTC liant le récepteur GT1b a été fusionné à des protéines, enzymes et nanoparticules afin de les acheminer vers le parenchyme nerveux (Figueiredo *et al.*, 1997, Coen *et al.*, 1997, Fishman *et al.*, 1990, Townsend *et al.*, 2007). Afin de palier au problème de forte immunogénicité du fragment TTC du à la vaccination, une séquence peptidique réduite gardant les propriétés du fragment initial, le peptide Tet1 a été générée selon une approche de phage display par biopanning sur le récepteur GT1b (Liu *et al.*, 2005, Federici *et al.*, 2007).

## 6. Le récepteur SR-BI

Le « scavenger receptor class B member I » (SR-BI) est une glycoprotéine membranaire majoritairement exprimée dans le foie et les tissus stéroïdogènes ainsi qu'à des taux moindres dans le cerveau (Acton *et al.*, 1996; Trigatti *et al.*, 2000). Au niveau du foie, SR-BI capte les lipoprotéines de haute densité (high density lipoproteins, HDL) circulantes contenant les esters de cholestérol issus de l'élimination de l'excès de cholestérol par les tissus périphériques, et assure le renouvellement du cholestérol corporel. Il a également été montré que des cultures primaires de CEMCs porcines expriment SR-BI à leur pôle apical (Goti *et al.*, 2001; de Boer *et al.*, 2003). La surexpression adénovirale de SR-BI par les CEMCs, entraîne également une augmentation de la captation des HDL, et a permis d'étudier l'implication du récepteur dans un mécanisme de transcytose à la BHE (Goti *et al.*, 2001). Dans cette étude, il est décrit que les particules de HDL-ApoA1, par rapport aux particules de LDL, sont enrichies en  $\alpha$ -tocophérol ( $\alpha$ -ToCH), la vitamine E essentielle au fonctionnement cérébral (Sattler *et al.*, 1996; Goti *et al.*, 2000). Une autre étude a montré que le devenir intracellulaire de l' $\alpha$ -ToCH et des lipoprotéines associés aux HDL, après endocytose par les CEMCs d'un modèle de BHE *in vitro* porcin était dissociées (Goti *et al.*, 2000, 2002; Balazs *et al.*, 2004). Ces études sont basées sur l'utilisation de différents types de tracers radioactifs pour les particules de HDL, les acides gras sont marqués à l'iode 125 et l' $\alpha$ -ToCH au C14 afin de suivre le devenir des différents composants après endocytose des particules de HDL-ApoA1. Une telle étude permis de montrer que l'endocytose des HDL par les CEMCs est SR-BI dépendante, au niveau des radeaux lipidiques enrichis en cavéoline. Les particules de HDL sont élaguées sélectivement de leurs acides gras et  $\alpha$ -ToCH qui suivent une voie transendothéliale vers le compartiment basolateral alors que le reste de la particule (ApoA1 et cholestérol) est recyclé vers la circulation plasmatique. Ce processus résulterait de la mobilisation de lipoprotéines lipases endothéliales (LPL), responsables d'un tri sélectif des particules (Goti *et al.*, 2002). De plus, la re-sécrétion des particules de densités réduites n'est pas liée au recyclage de SR-BI, suggérant la capacité du récepteur à suivre une voie de transcytose pure. Le récepteur SR-BI, présent au pôle apical des CEMCs est également présent au

pole basolateral et permettrait de capter les particules de HDL-ApoAI présentes dans les fluides interstitiels cérébraux, de les transporter par transcytose réverse vers la circulation plasmatique puis le foie et assurer ainsi le renouvellement du cholestérol corporel (Panzenboeck *et al.*, 2002). Des approches de PCR quantitative et protéomique ont révélé l'expression et la sécrétion d'ApoAI par les cellules endothéliales alors que cette expression était initialement décrite uniquement au niveau de l'intestin et du foie (Möckel *et al.*, 1994; Panzenboeck *et al.*, 2002). De plus, cette expression semble spécifique des CEMCs puisqu'elle n'est pas observée au niveau des cellules endothéliales aortiques. L'ApoAI sécrétée par les CEMCs est dirigée vers les radeaux lipidiques astrocytaires où elle interagit avec ABCAI pour former des particules de HDL-ApoAI, comme les particules de HDL-ApoE, bien que l'ApoE soit produite par les astrocytes eux mêmes (Panzenboeck *et al.*, 2002). La présence de ces 2 formes de HDL suggère des rôles différents tel que la neuroprotection et l'homéostasie du cholestérol cérébral. L'ensemble des données résumées ci-dessus suggèrent qu'ApoAI et SR-BI établissent un lien entre le métabolisme lipidique cérébral et périphérique (Balazs *et al.*, 2004) et révèle l'intérêt de SR-B1 comme cible de vectorisation associée à un processus de transcytose au niveau de la BHE.

## **B. RESULTATS**

**Article 1 (publié): Setting-up an *In vitro* Model of Rat Blood-brain  
Barrier (BBB): A Focus on BBB Impermeability and Receptor-  
Mediated Transport**

## I. Résumé

Le manuscrit décrit en détail la mise en place de modèles *in vitro* de BHE et BSME à partir de culture de CEMCs et CEMSs, primaires, de rat et souris. Le protocole est accompagné d'une vidéo disponible sur le site web du journal JoVE. Le format multimédia unique de ce journal est idéal pour détailler et faciliter aux lecteurs désireux de les utiliser, les différentes étapes de mise en place des modèles *in vitro*. Quelques exemples présentés dans les résultats permettent de comprendre les avantages et les limites de modèles issus de cultures primaires, comparées à d'autres modèles issus de lignées stables ou aux modèles dynamiques qui incluent un flux luminal. Quel que soit le modèle à l'étude, il n'est pas envisageable d'interpréter correctement des données si l'on n'en connaît pas parfaitement les limites et si les mécanismes étudiés *in vitro* ne sont pas confrontés à des données *in vivo*. Sur le plan moléculaire, l'accent a été mis sur la caractérisation de certains récepteurs impliqués dans le processus de RMT.

Les modèles *in vitro* de BHE et BSME sont difficiles à mettre en place en routine car cela implique l'enchaînement et l'optimisation d'étapes sur une période de trois semaines aboutissant à une co-culture de CEMs en monocouche sur un insert suspendu, et d'astrocytes au fond du puits de culture, considéré comme modèles *in vitro* statiques. L'un des enjeux majeurs dans notre utilisation de ces modèles a été la reproductibilité hebdomadaire, importante dans un contexte de recherche fondamentale, notamment sur les projets collaboratifs entre le laboratoire NICN (UMR7259) et la société VECT-HORUS, et essentielle dans un contexte industriel. L'article détaille notamment les recommandations concernant la mise en place d'un processus de contrôle et d'assurance qualité, incluant une gestion très rigoureuse d'une vingtaine de réactifs dont certains impactent fortement sur la qualité finale des barrières (pe. 1 mois de péremption pour les enzymes de digestion tissulaire).

Entre autres, les réactifs sensibles tels que le b-FGF ou l'hydrocortisone sont ajoutés extemporanément dans le milieu de base à partir d'aliquots préservés selon les températures préconisées. Les aliquots entamés sont ensuite gardés à 4°C pendant 5 jours maximum avant d'être éliminés. L'objectif majeur de ce processus d'assurance qualité est de limiter toutes sources de variabilité. Toutes les étapes dans le processus de production des modèles *in vitro* font l'objet de gestes et d'actions précises reproduits de manière hebdomadaire, à commencer par le sacrifice des animaux qui sont la source tissulaire initiale.

Parmi les nombreux paramètres de caractérisation du modèle, l'un des principaux objectifs est l'obtention de la perméabilité la plus faible à des molécules de référence ne pénétrant pas la BHE

*in vivo*, en raison de (i) leurs propriétés physico-chimiques et la présence de jonctions serrées bloquant leur passage paracellulaire et (ii) l'absence de transporteurs pour ces molécules, de métabolisme au contact de l'endothélium et de leur efflux spécifique. L'ensemble de ces paramètres permet de d'obtenir deux compartiments, luminal et abluminal, séparés par la monocouche de CEMs, mimant de manière satisfaisante leur différenciation *in vivo*.

La réponse des cultures primaires à l'environnement cellulaire et moléculaire, comparée aux lignées stables est (i) un avantage si l'on souhaite étudier les interactions entre les acteurs de l'UNGV et (ii) un inconvénient puisqu'il est nécessaire de contrôler et stabiliser la variabilité des modèles due à ces interactions. L'induction d'un état de différenciation des CEMs en monocouche proposée dans notre protocole permet de mimer le profil d'expression des gènes et la fonctionnalité des protéines de la BHE *in vivo*. Parmi les variables impactant sur l'établissement d'un phénotype mimant la situation *in vivo*, certaines sont déterminantes telles que (i) un nombre limité de mitoses des primocultures isolées de leur environnement *in vivo* (dé-différenciation), (ii) la purification des cultures de CEMs par l'élimination des péricytes avec un traitement prolongé à la puromycine, (iii) la culture sur collagène de type IV et sur fibronectine et (iv) la co-culture avec des astrocytes et l'addition d'hydrocortisone (re-différenciation).

Les modèles *in vitro* de BHE issus de souris sont plus difficiles à stabiliser en raison de la présence de péricytes plus nombreux et au rendement plus faible en CEMs comparé au rat; l'équivalent en microvaisseaux de 5 à 6 cortex de souris permet d'obtenir  $1.10^6$  CEMCs en P1 alors qu'il suffit de 1,5 cortex de rat pour obtenir  $3.10^6$  CEMCs en P1 dans nos conditions. Cependant, les modèles souris restent pertinents, voire indispensables en raison de nombreuses lignées de souris génétiquement modifiées (knock-out ou knock-in notamment) pour des cibles moléculaires d'intérêt de la BHE (pompes d'efflux, transporteurs, récepteurs etc.) et les lignées transgéniques ou mutantes telles que les modèles souris développant la pathologie d'Alzheimer dont on peut comparer les CEMs à celles de souris sauvages.

## II. Article 1



## Video Article

## Setting-up an *In Vitro* Model of Rat Blood-brain Barrier (BBB): A Focus on BBB Impermeability and Receptor-mediated Transport

Yves Molino<sup>1</sup>, Françoise Jabès<sup>1</sup>, Emmanuelle Lacassagne<sup>2</sup>, Nicolas Gaudin<sup>2</sup>, Michel Khrestchatsky<sup>2</sup><sup>1</sup>VECT-HORUS SAS<sup>2</sup>Aix-Marseille Université, CNRS, NICN UMR 7259Correspondence to: Michel Khrestchatsky at [michel.khrestchatsky@univ-amu.fr](mailto:michel.khrestchatsky@univ-amu.fr)URL: <http://www.jove.com/video/51278>DOI: [doi:10.3791/51278](https://doi.org/10.3791/51278)

Keywords: Medicine, Issue 88, rat brain endothelial cells (RBEC), mouse, spinal cord, tight junction (TJ), receptor-mediated transport (RMT), low density lipoprotein (LDL), LDLR, transferrin, TfR, P-glycoprotein (P-gp), transendothelial electrical resistance (TEER),

Date Published: 6/28/2014

Citation: Molino, Y., Jabès, F., Lacassagne, E., Gaudin, N., Khrestchatsky, M. Setting-up an *In Vitro* Model of Rat Blood-brain Barrier (BBB): A Focus on BBB Impermeability and Receptor-mediated Transport. *J. Vis. Exp.* (88), e51278, doi:10.3791/51278 (2014).

### Abstract

The blood brain barrier (BBB) specifically regulates molecular and cellular flux between the blood and the nervous tissue. Our aim was to develop and characterize a highly reproducible rat syngeneic *in vitro* model of the BBB using co-cultures of primary rat brain endothelial cells (RBEC) and astrocytes to study receptors involved in transcytosis across the endothelial cell monolayer. Astrocytes were isolated by mechanical dissection following trypsin digestion and were frozen for later co-culture. RBEC were isolated from 5-week-old rat cortices. The brains were cleaned of meninges and white matter, and mechanically dissociated following enzymatic digestion. Thereafter, the tissue homogenate was centrifuged in bovine serum albumin to separate vessel fragments from nervous tissue. The vessel fragments underwent a second enzymatic digestion to free endothelial cells from their extracellular matrix. The remaining contaminating cells such as pericytes were further eliminated by plating the microvessel fragments in puromycin-containing medium. They were then passaged onto filters for co-culture with astrocytes grown on the bottom of the wells. RBEC expressed high levels of tight junction (TJ) proteins such as occludin, claudin-5 and ZO-1 with a typical localization at the cell borders. The transendothelial electrical resistance (TEER) of brain endothelial monolayers, indicating the tightness of TJs reached 300 ohm·cm<sup>2</sup> on average. The endothelial permeability coefficients (Pe) for lucifer yellow (LY) was highly reproducible with an average of  $0.26 \pm 0.11 \times 10^{-3}$  cm/min. Brain endothelial cells organized in monolayers expressed the efflux transporter P-glycoprotein (P-gp), showed a polarized transport of rhodamine 123, a ligand for P-gp, and showed specific transport of transferrin-Cy3 and DiLDL across the endothelial cell monolayer. In conclusion, we provide a protocol for setting up an *in vitro* BBB model that is highly reproducible due to the quality assurance methods, and that is suitable for research on BBB transporters and receptors.

### Video Link

The video component of this article can be found at <http://www.jove.com/video/51278/>

### Introduction

Many drugs developed to treat Central Nervous System (CNS) disorders are unable to reach the brain parenchyma in therapeutically relevant concentrations. The BBB protects brain nervous tissue from the fluctuation of plasma composition, from pathogenic agents, and maintains homeostasis of the brain parenchyma by restricting non-specific flux of ions, peptides, proteins and even cells into and out the brain<sup>1</sup>.

BBB characteristics are induced and maintained by intimate proximity and cross-talk between the specialized class brain microvessel endothelial cells and neighboring elements of the neuro-glia-vascular unit (NGVU) such as neurons, glial cells (more precisely astrocyte end-feet), and pericytes ensheathed in the basal membrane which consists mainly of collagen type IV, fibronectin, laminin and proteoglycans<sup>2,3</sup>. Pericytes cover approximately 22 - 32% of the endothelium at the capillary level and play an important role in the regulation of endothelium proliferation, angiogenesis and inflammatory processes. Endothelial cells form a continuous sheet covering the inner surface of the capillaries. They are interconnected by TJs, which form a belt-like structure at the apical region and that contribute to cell polarization. Astrocytes regulate BBB properties and are sources of important regulatory factors such as TGF- $\beta$ , GDNF, bFGF and IL-6. Astrocytes deficient in GFAP with incomplete functionality are not able to regulate BBB properties<sup>4</sup>. Neurons are not directly involved structurally in the formation of the BBB but also regulate important aspects of protein expression and BBB functions<sup>5</sup>.

In order to further study the structure, physiology and pathology of the BBB, *in vitro* models of the BBB were developed as research tools. Brain endothelial cells have been extracted from various species to implement *in vitro* BBB models based on low passage primary cultures from bovine<sup>6,7</sup>, porcine<sup>8,9</sup>, rat<sup>10,11,12</sup>, mouse<sup>13</sup> and also human<sup>14,15</sup>. These models are known to mimic the *in vivo* BBB, particularly when co-cultured with glial cells from rat or murine and/or pericytes<sup>16,12</sup>, and/or neural progenitor cell-derived astrocytes<sup>17</sup> and/or neurons<sup>18</sup>. The "in lab" models are often produced from rodents because they allow *in vitro* / *in vivo* experiments and comparisons and/or the study of brain endothelial cells produced from transgenic models<sup>19</sup>.

Newly developed *in vitro* BBB models have also been designed to help predict brain uptake of potential CNS drug candidates prior to *in vivo* testing<sup>15,20,21,3,6,22,11,23</sup>. *In vitro* BBB models are usually used to compare the transport of drugs with: i) known penetration into the CNS or with low permeability across the BBB and no central effects, and ii) the apparent  $P_e$  of the same drugs measured in animal models of the same species. The drugs that readily pass the BBB are mostly lipophilic and cross the brain endothelial cell membranes by lipid-mediated free diffusion (caffeine, carbamazepine, etc.). The negatively transported drugs such as digoxin, verapamil or cyclosporine A are actively extruded by brain endothelial efflux transporters such as P-gp. However, many of the newly developed therapeutic molecules are biopharmaceuticals, such as recombinant proteins, siRNAs or monoclonal antibodies. Most of them do not cross the BBB due to: i) the absence of specific transporters, and ii) the tightly packed layer of endothelial cells, which prevent high molecular weight molecules from undergoing paracellular passage. With these limits, "Trojan horse" strategies have been implemented using vectors (antibodies, peptides) against known receptors at the BBB, involved in receptor mediated transport or transcytosis (RMT), such as the transferrin (Tf) receptor (TfR), the Insulin receptor (IR), or members of the LDL receptor (LDLR)-related receptor family (LDLR, LRP1). Such receptors have been found on isolated brain capillaries and in the BBB *in vivo*<sup>24,25</sup>. Transcriptional profiles for these receptors, in particular those of the LDLR family, were analyzed and compared between brain endothelial cells and brain endothelial cells co-cultured with astrocytes or in brain capillaries directly after their extraction from brain<sup>26</sup>. Partridge<sup>24</sup> opened the field with the OX-26 antibody against the transferrin receptor (TfR), followed by antibodies against the insulin receptor and the insulin growth factor receptor<sup>27,28</sup>. With these antibody based vectors, ArmaGen Technologies has developed a BBB molecular Trojan horse platform technology to deliver drugs, including proteins, across the BBB<sup>29</sup>. The literature is rich in data showing LRP1 expression in brain endothelial cells and its role as a powerful endocytic/scavenger receptor. Western blot analysis suggested that LRP1 is expressed in fractions enriched in brain capillaries and in rat brain capillary endothelial cells<sup>30</sup>. Companies such as Angiochem target LRP1 with peptide vectors derived from aprotinin that promote efficient drug influx across the BBB<sup>31</sup>. However, LRP1 is also involved in active transport of A $\beta$  and its efflux/clearance from brain parenchyma to blood<sup>32</sup>. Such data involve LRP1 in a bi-directional transport across the BBB depending on its ligands. biOasis develops the Transcend technology using a protein melanotransferrin for the transport of biologics such as lysosomal enzymes and antibodies across the BBB<sup>33</sup> while VECT-HORUS develops peptide vectors that target the LDLR<sup>34</sup>. There is data suggesting that the LRP and LDLR can be used to transport different molecules such as lysosomal enzymes<sup>35,36</sup> or nanoparticle complexes across the BBB<sup>37</sup>.

Our field of interest is drug delivery to the CNS using vector molecules and vectorized drug-candidates for the treatment of CNS diseases. In particular, drug delivery across the BBB has to be considered within the context of neuroinflammation, a process that may vary in its extent, but that is probably common to all CNS lesions and diseases, including encephalitis, multiple sclerosis, Alzheimer's disease etc. Neuroinflammation is associated with BBB inflammation and potentially with changes in BBB physiology and permeability considering that paracellular and transcellular transport can be amplified in pathological conditions<sup>38,39,40,41,42,43</sup>. For instance, TNF- $\alpha$ , TWEAK, and other cytokines modulate inflammation, and experiments with *in vitro* BBB models have shown that they can alter the paracellular properties of the endothelial cell monolayer<sup>38,39,40</sup> and that TNF- $\alpha$  also leads to an increase in transcellular transport of LDL<sup>41</sup>, holotransferrin<sup>42</sup> and lactoferrin<sup>43</sup>.

Our objective was to develop and characterize an optimized and highly reproducible rat syngeneic BBB model using co-cultures of primary brain endothelial cells and astrocytes. We used 5 week old and neonatal Wistar rats for brain endothelial cell production and astrocyte production respectively. One challenge was to establish a protocol allowing the production of "weekly reproducible" BBB models. To reach this objective, every step of the production protocol was performed on fixed days of the week, starting from brain microvessel production on Wednesday of the first week. Dissections were performed nearly every week during the last 3 years. To further improve the reproducibility of the cultures, a quality assurance system was established. All reagents and chemicals were referenced in a database (date of entry, stock, expiration term, etc.).

The model was characterized following a number of criteria, such as endothelial cell organization and purity, TEER, LY permeability, response to pro-inflammatory agents, qualitative and quantitative expression of TJ proteins, functionality of efflux transporters such as P-gp, and receptors involved in transcytosis across the endothelial cell monolayer such as the TfR or the LDLR.

## Protocol

### 1. Production of Rat Astrocytes

For each preparation use 10 neonatal Wistar rats of either sex.

1. Sacrifice the rats by cutting heads with a pair of scissors and transfer them immediately in a dry Petri dish under a laminar flow hood. Remove the brains from the skull without the cerebellum and transfer them immediately into a Petri dish containing cold dissection buffer: HBSS supplemented with 1% Bovine Serum Albumin (low level of endotoxin BSA), penicillin 100 units/ml and streptomycin 100  $\mu$ g/ml.
2. Cut the brains in half, to separate the 2 cerebral hemispheres and transfer them into a clean Petri Dish with dissection buffer on ice. Cut the optic nerve and remove the meninges under a stereomicroscope.
3. Wash the cortical pieces extensively in 50 ml of cold dissection buffer.
4. Place the cortical pieces from 3 brains into a 15 ml Falcon tube and dissociate by pipetting up and down a couple of times with a 10 ml disposable pipette equipped with a blue tip into 6 ml of trypsin 0.05% - EDTA 0.02% for 5 min at 37  $^{\circ}$ C.
5. Add 24 ml of DMEM supplemented with 10% FBS and the following antibiotics, penicillin 100 units/ml and streptomycin 100  $\mu$ g/ml, a media named glial cell media (GCM), and centrifuge at 300 x g for 5 min at RT. FBS batches were selected and validated for the growth and survival of astrocyte cultures.
6. Resuspend the pellet containing the dissociated cells in 10 ml GCM and plate into a 75 cm<sup>2</sup> T-flask (T75). Change the medium the following day to remove the cell debris and DNA. Replace the culture media twice a week.
7. After 1 week of proliferation, gently shake the glial cells with an orbital shaker at 60 rpm during 24 hr at 37  $^{\circ}$ C in GCM. If the T75 cannot be placed in an incubator with 5% CO<sub>2</sub> / 95% air at 37  $^{\circ}$ C humidified atmosphere, supplement the media with 5 mM HEPES. Wash the cells twice to remove the non-adherent microglial cells.
8. Three weeks after seeding, wash the cells twice with DPBS without calcium and magnesium. Add 3 ml of warm trypsin 0.05%-EDTA 0.02%, incubate at 37  $^{\circ}$ C and wait until the cell layer is dispersed (usually 5 min). Inhibit trypsin activity by adding 10 ml of GCM, transfer the cell suspension into a 15 ml Falcon tube and centrifuge at 120 x g for 8 min.

- Resuspend the astrocyte pellet in 90% FBS – 10% DMSO, transfer them into cryovials ( $2 \times 10^6$  cells per cryovial) and store in liquid nitrogen.

## 2. Isolation of Rat Brain Microvessels

Our experimental procedures are approved by the Ethics Committee of the Medical Faculty of Marseille and conform to National and European regulations (EU directive No. 86/609). All efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

- For each preparation and for one experimenter, use 3 five week old Wistar rats.
- Monday of the first week, prepare 2 T75 flasks by coating with collagen type IV and fibronectin, both at  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  in sterile culture water (10 ml per T75). Allow to adhere at  $37^\circ\text{C}$  until microvessel seeding.
- Wednesday morning of the first week, euthanize the rats under an increasing flux of  $\text{CO}_2$  to induce drowsiness, loss of posture and breathing interruption, then followed by a cervical dislocation. Spray the heads with 70% ethanol. Cut the heads with a pair of scissors and transfer them into a dry Petri dish under a laminar flow hood.
- Remove the brains from the skull without the cerebellum and the optic nerves, then transfer them into a Petri dish cooled on ice and filled with cold dissection buffer (HBSS supplemented with 1% BSA, penicillin 100 units/ml and streptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ).
- Cut the brains in half to separate the 2 cerebral hemispheres and separate midbrain from forebrain. Transfer the forebrains into a clean Petri dish on ice with dissection buffer.
- Take a couple of hemispheres in a new Petri dish with cold dissection buffer to carefully remove the meninges from the forebrains under a stereomicroscope with N° 5 curved forceps. Then, clean the interior of the brain to remove the duvet of myelin and obtain a shell of cortex. These steps should not take more than 2 hr for tissue preservation and cell survival.
- Dissociate the cortex from 3 brains into 6 ml of cold dissection buffer in a 7 ml dounce homogenizer by 10 up and down strokes with each of 2 pestles of different clearances, 71  $\mu\text{m}$  followed by 20  $\mu\text{m}$ .
- Divide the suspension to obtain the equivalent of 1 cortex in 1 ml of a 50 ml Falcon tube and centrifuge at 1,000 x g for 5 min at RT. Discard the supernatant.
- Digest the suspension from 1 cortex with 1 ml of an enzymatic solution containing a mix of collagenases / dispase (60  $\mu\text{g}/\text{ml}$  – 0.3 U/ml), DNase type I (35  $\mu\text{g}/\text{ml}$  – 20 K units/ml) and gentamicin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in a shaker for 30 min at  $37^\circ\text{C}$ .
- Mix the 1 ml digest from 1 cortex with 10 ml of 25 % BSA/HBSS 1X and separate by density dependent centrifugation at 3,600 x g for 15 min at RT. Carefully transfer the upper disk (myelin and brain parenchyma) and the supernatant into a clean 50 ml Falcon tube and repeat the centrifugation. Keep the resulting pellet containing the brain microvessels at  $4^\circ\text{C}$ .
- Carefully discard the upper disk and the supernatant. Resuspend both resulting pellets containing the brain microvessels with 1 ml of cold HBSS 1X and transfer into a clean 50 ml Falcon tube.
- Wash the microvessels by addition of 20 ml of cold HBSS 1X and centrifuge at 1,000 x g for 5 min. Discard the supernatant.
- Further digest the microvessels from 1 cortex with 1 ml of the same enzymatic solution as described in step 2.9 during 1 hr at  $37^\circ\text{C}$  in a shaker.
- Then, mix the digested microvessels from each of the 3 cortices into one tube and further separate into two 50 ml Falcon tubes to obtain microvessels extracted from the equivalent of one and a half (1.5) cortex per tube. Add 30 ml of cold dissection buffer and centrifuge at 1,000 x g for 5 min at RT.
- Resuspend the microvessel pellet in 10 ml of DMEM/F12 supplemented with 20% bovine platelet poor plasma derived serum, basic fibroblast growth factor (bFGF, 2 ng/ml), heparin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), gentamicin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and HEPES (2.5 mM), named endothelial cell media (ECM) supplemented with puromycin at 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
- Take the 2 coated T75 flasks from the incubator, aspirate the excess of coating and plate the microvessels from each tube in one T75 flask (microvessels extracted from 1.5 cortex per T75 flask).

## 3. Purification and Proliferation of RBEC Primocultures

- Purification: Wednesday to Friday, add puromycin at 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  to the culture media. Change the medium on Thursday. On Friday, wash the cells and add puromycin at 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  until Monday.
- Proliferation: on Monday of the second week, wash the cells and add insulin, transferrin and sodium selenite supplement to the culture media until the cultures reach 90% confluence on Wednesday of the second week.

## 4. Differentiation: Setting up the *In Vitro* BBB Model

- Monday of the second week, prepare filters (polyethylene, 12 wells, pore size 1.0  $\mu\text{m}$ ) by coating with a mix of collagen type IV and fibronectin both at  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  in sterile culture water (500  $\mu\text{l}$  of mix in the upper compartment and 1.5 ml of sterile culture water in the lower compartment). Allow to adhere at  $37^\circ\text{C}$  until RBEC seeding.
- Monday of the second week, five days before the establishment of the co-culture, thaw the astrocytes from cryovials at  $37^\circ\text{C}$  and transfer in a 15 ml Falcon with 10 ml GCM. Centrifuge the suspension at 120 x g for 8 min at RT.
- Resuspend the astrocyte pellet in GCM and plate at a density of  $30 \times 10^3$  cells per  $\text{cm}^2$  in 12-well plates.
- Wednesday of the second week, just before dissociation of RBEC with trypsin, wash twice the pre-coated filter with DMEM/F12 medium. Pre-fill the chambers with ECM: 1.5 ml in the lower compartment and 0.5 ml in the upper compartment.
- Wednesday of the second week, wash twice the RBEC with DPBS without calcium and magnesium. Add 4 ml of warm trypsin 0.05% - EDTA 0.02% solution at  $37^\circ\text{C}$  per T75 flask during 30 sec exactly. Then remove 3.5 ml of trypsin solution and observe under the microscope. When the cell layer starts to detach from the matrix, help them by gently tapping the edge of the T75 flask until all the cells are floating.
- Add 9 ml of ECM per T75 flask and transfer into a 15 ml Falcon tube. Very gently dissociate the cell suspension by pipetting up and down 4 times with a 10 ml pipette equipped with a yellow tip (avoid the production of bubbles in the solution). Count the cells in the suspension (approximately  $3 \times 10^6$  cells/T75) and immediately plate on pre-coated and pre-filled filters at a high density ( $160 \times 10^3$  cells/filter hence approximately 18 filters/T75) (Figure 8). The following day (Thursday), change twice the medium of the upper compartment to remove cell debris.

7. Thursday of the second week, the day before the establishment of the co-culture, replace the astrocyte culture media by 1.5 ml of differentiation media (ECM with hydrocortisone at 500 nM) that can be supplemented with 1/3 conditioned medium from the basal compartment of a previous co-culture (3 days of contact between endothelial cells and astrocytes).
8. Friday of the second week is defined as the day 0 of differentiation; replace the culture media from the filters containing the RBEC with differentiation media. Transfer the RBEC filters into the wells containing the astrocytes. Under these conditions, *in vitro* models differentiate and express junction-related proteins within 3 days.
9. The models keep their optimal differentiation during 3 more days, between Monday and Wednesday of the third week.

## Representative Results

### Production Protocol

The protocol can be divided into 3 phases corresponding to major changes in culture media composition: (a) purification of endothelial cells from the microvessels, (b) proliferation, and (c) differentiation on filters (12-well polyethylene plates with a porosity of 1  $\mu\text{m}$ ) in co-culture with astrocytes. The different steps of the production protocol were assigned to specific days of the week in order to increase the reproducibility of the primary cell cultures (Figure 1). On Wednesday of the first week, hence 9 days before the establishment of the co-culture system, the microvessels were isolated (Figure 2A). To purify endothelial cells, the cultures were kept in the presence of decreasing concentrations of puromycin for 5 days. Most contaminating cells (mainly pericytes) were eliminated and the growth of endothelial cells was slower without modification of their phenotype. Spindle-shaped cells grow out of the capillary fragments isolated from rat brain grey matter (Figure 2B). On Monday of the second week, rat astrocytes were plated on the bottom of 12-well plates. Wednesday, RBEC were added to the luminal compartment of the filters. High density seeding at  $160 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> (Figure 2C) helps to avoid gaps at the periphery of the filter (Figure 2D) and generates a homogeneous differentiation of the endothelial cell monolayer. The cells show the typical elongated spindle-shaped morphology, align longitudinally, and form a uniform monolayer. Thursday, astrocyte culture medium was changed for the differentiation medium conditioned with the previous co-culture media (Figure 2E). Friday, RBEC on filters were grown in culture medium containing 500 nM hydrocortisone and the filters were transferred to 12-well plates containing the astrocytes. On the third week, experiments were performed between Monday and Wednesday.

### RBEC Characterization and Determining Elements of Monolayer Permeability

The RBEC were characterized by immunostaining of endothelial and BBB markers as well as by measurements of TEER, permeability of LY and functionality of efflux transporters such as P-gp.

RBEC obtained by the puromycin purification method (Figure 1 and 2) grew in non-overlapping continuous monolayers that exhibited growth inhibition at confluence and displayed tightly apposed, fusiform and spindle shaped morphology. RBEC cultures expressed typical markers of endothelial cells: they showed positive immunostaining for platelet endothelial cell adhesion molecule (Figure 3A; CD31/PECAM) and expression of von Willebrand factor (Figure 3B). Without puromycin treatment, RBECs are quickly invaded by pericytes detected by desmin immunostaining (Figure 3C). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) expressed by astrocytes (Figure 3D) is an important differentiation marker of astrocytes. With high passage number, astrocytes lose their ability to induce differentiation of the endothelial cells. For this reason, astrocyte cultures were standardized for their time of culture and only underwent one passage.

Culturing RBEC with media supplemented with hydrocortisone, followed by co-culture with astrocytes and with conditioned medium from the lower compartment of previous co-cultures led to strong induction of interendothelial TJs in comparison to RBEC cultured alone. The cells expressed claudin-5, ZO-1 and occludin proteins, which were localized at the cell-cell junctions, as shown by immunofluorescence (Figure 4B-D) and revealed by western blot analysis for ZO-1 and occludin proteins (Figure 4E). The morphological distribution at cell-to-cell contacts in a zipper-like configuration reflects (a) the tightness of the monolayer, (b) the cerebral origin of the capillary endothelial cells, and (c) is characteristic of highly differentiated cerebral endothelial cells. Paracellular permeability of the endothelial layer was monitored by measuring the TEER and the rate of influx of LY (457 Da) from the upper to the lower compartment of the filters. TEER was measured using an ENDOHM-12 for 12 mm culture cups connected to an EVOM voltohmmeter. The TEER of brain endothelial monolayers, indicating the tightness of TJs reached 300 ohm  $\cdot$  cm<sup>2</sup> on average (filters of 12 well plates, data not shown). The  $P_e$  for LY ( $P_{e(LY)}$ ), used as an integrity control of the barrier and co-incubated with tested compounds) reached an average of  $0.26 \pm 0.11 \times 10^{-3}$  cm/min (Figure 4F) over a 1 year period.

In order to induce inflammation of RBEC we used the pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  at 5 ng/ml for 24 hr, and followed the inflammatory response by measuring CCL2 (MCP-1) secretion by RBEC in the upper compartment of the culture system which doubled from 120 ng/ml (non-treated control) to 250 ng/ml (Figure 5A). TNF- $\alpha$  treatment at 5 ng/ml or 50 ng/ml for 24 hr also opened the BBB as revealed by  $P_{e(LY)}$  measurement (Figure 5B).

P-gp was visualized in differentiated RBEC by immunocytochemistry (Figure 6A). P-gp localization is known to be highly polarized and expressed essentially in the apical membrane of endothelial cells<sup>44</sup> while the Glutamate transporter-1 (GLT-1) is mainly found in the basolateral fraction<sup>45</sup>. To assess the extent of polarization of our cultured RBEC, apical and basolateral proteins were separated from plasma membrane preparations using sucrose density gradients<sup>46</sup>. Western blot analysis was performed to assess expression levels of P-gp and GLT-1 in plasma, apical and basal membrane preparations. Microvessels freshly extracted from rat brain were used as the closest positive controls to the *in vivo* distribution of these proteins (Figure 6B). In both microvessels and differentiated RBEC membrane preparations, P-gp was expressed as a band of 170 kDa, mainly localized in the F1 apical membrane fraction (Figure 6B, C). GLT-1 expression was indeed expressed in the F3 basal membrane fraction of microvessels as a band of 65-70 kDa, but was not detected in the cultured RBEC.

In parallel experiments, the functional activity of P-gp in the endothelial cell monolayer was tested using rhodamine 123 (R123) as a ligand. The albuminal to luminal (B to A) efflux of R123 was 1.7 times higher than in the opposite direction (Figure 6D). To prove P-gp involvement, we used specific P-gp inhibitors, verapamil (25  $\mu\text{M}$ , 30 min preincubation) and cyclosporine A (1  $\mu\text{M}$ , 30 min preincubation). With verapamil and cyclosporine treatment, R123 accumulation in RBEC was increased 1.6 fold and 2 fold respectively, compared to untreated control (Figure 6E).

### Receptors Involved in Receptor Mediated Transcytosis (RMT) Mechanisms

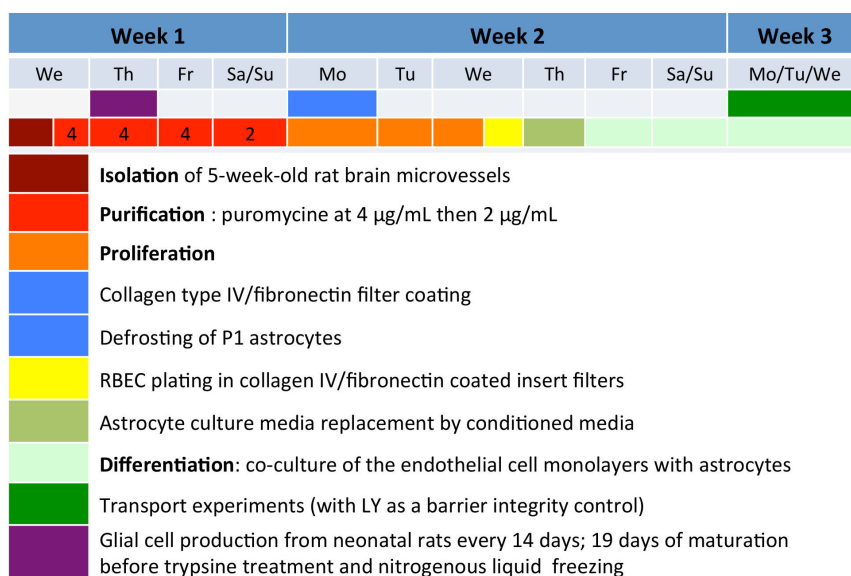
The model was further characterized for expression of different receptors potentially involved in transcytosis mechanisms at the BBB, such as the LRP1, LDLR or TfR (Figure 7A).

Functional transport studies were performed with the ligands for TfR and LDLR. Live RBEC were incubated with rat transferrin labelled with Cy3 (Tf-Cy3) for 180 min at 37 °C (Figure 7B, C). Quantification of Tf-Cy3 uptake and transport in the rat *in vitro* BBB model showed that the slope of the curves slightly decreased beyond 2,400 picomoles (Figure 7B), suggesting that binding/uptake was saturable. Moreover, the saturation of the binding/uptake was correlated with the accumulation of Tf in the lower compartment. To confirm this observation, Tf-Cy3 was incubated at 1,200 picomoles (ascending part of the curve) with an excess of non-fluorescent Tf at 4,800 picomoles (plateau/saturation) (Figure 7C). These experiments showed a decrease of Tf-Cy3 accumulation in the lower compartment and confirmed a saturable mechanism typical of ligand-receptor interaction in our *in vitro* BBB model.

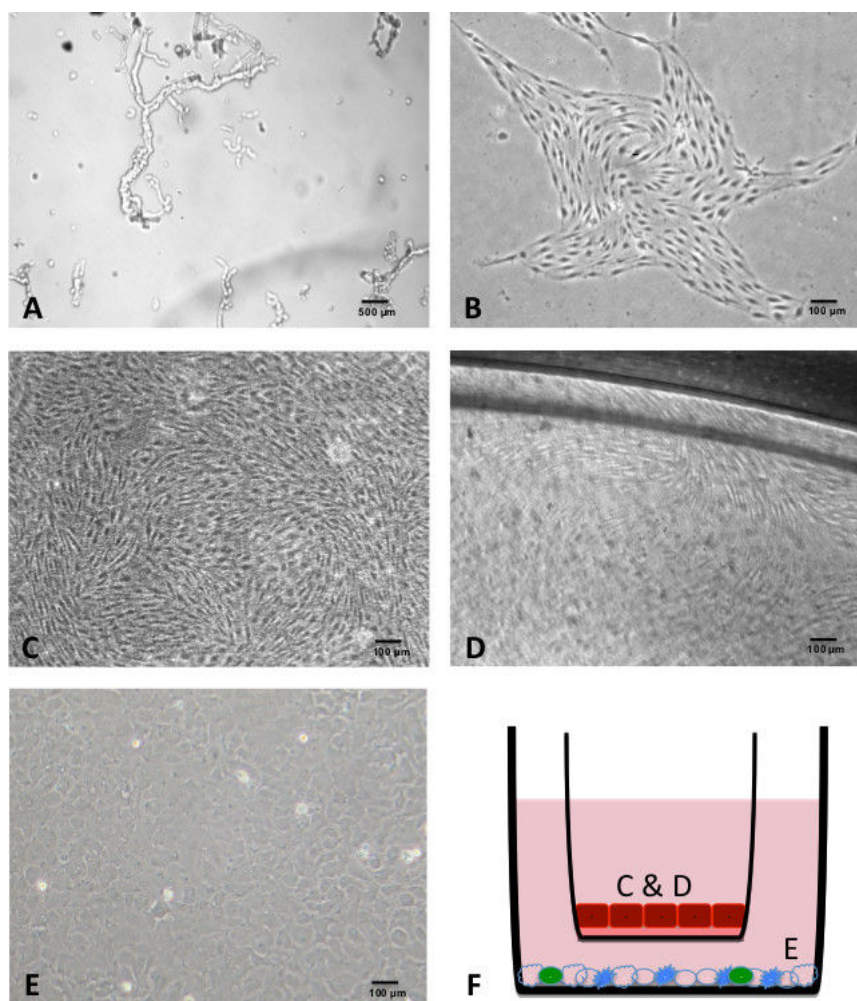
Similarly, LDLR functionality was demonstrated by the uptake and transport of its ligand DiILDL across the endothelial cell monolayer (Figure 7D, E). Live RBEC were incubated with DiILDL for 30 min at 37 °C. The binding/uptake was not correlated with the accumulation of DiILDL in the lower compartment (Figure 7D). Quantification of DiILDL transport showed that the slope of the curves decreased beyond 2 µg, suggesting that transport was saturable and receptor-related in our model. Sodium azide was added at 0.05%, 15 min prior to DiILDL incubation (Figure 7E). The absence of toxicity of sodium azide incubation at 0.05% was assessed by  $Pe_{(LY)}$  measurement (data not shown). These experiments showed decreased DiILDL accumulation in the lower compartment. Overall, our results suggest RMT for DiILDL in our *in vitro* BBB model.

**Other *In Vitro* BBB Models based on Endothelial Cells from Rat spinal Cord or Mouse Brain**

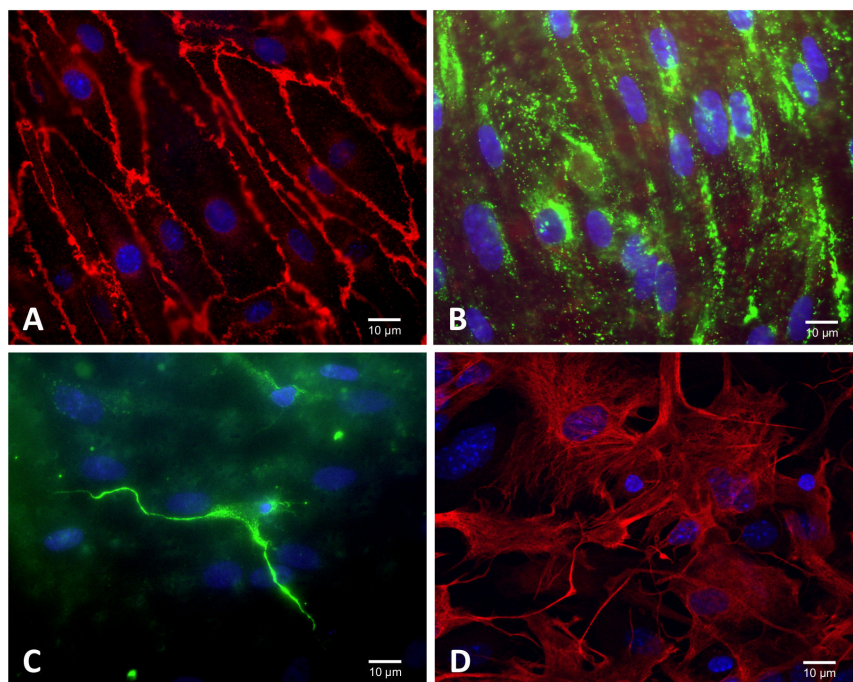
Enzymatic digestion with a mix of collagenases / dispase is one of the major parameters to control in terms of cell viability and production yield of cerebral microvessels. The concentration of enzyme and more important the ratio between the quantity of enzyme relative to tissue, needs to be calibrated precisely between rat brain, rat spinal cord and mice brain. Microvessel seeding density and number of endothelial cells to reach 90% confluence (9 days post microvessel seeding) were linked and are important parameters to improve cell growth, limit the number of population doubling and the quality of the models. Rat spinal cord microvessels were produced with the same protocol as the one described herein for rat brain microvessels (in terms of tissue amount, 2 spinal cords corresponding approximately to 1 brain) to obtain the same quantity of cells per T75 flask within the same time scale. Meninges from 5-week-old C57Bl6 mice brain were difficult to eliminate because they stick to the cortex. A brief treatment of the brain with dispase appears to facilitate removal of the meninges. The important parameters that contribute to the production of reproducible endothelial cell monolayers from rat brain, rat spinal cord and mouse brain are highlighted and summarized in Figure 8.



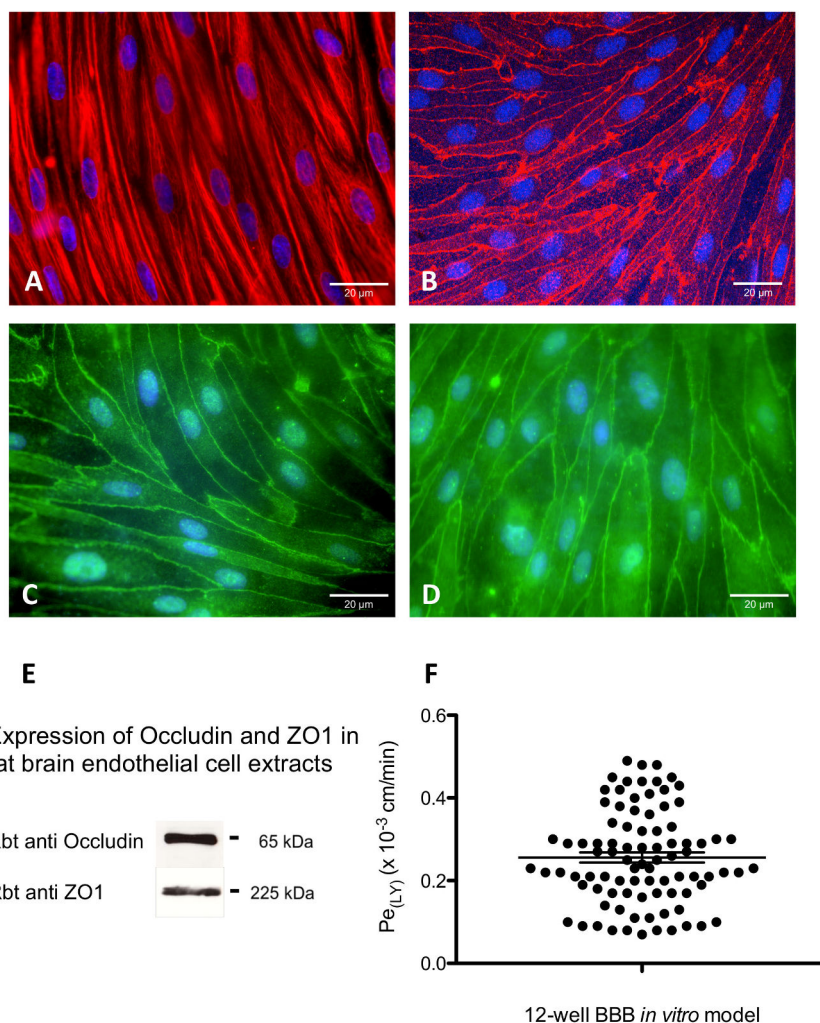
**Figure 1. Flow chart summarizing the main steps of the *in vitro* BBB model preparation.** The different steps of the production protocol were assigned to specific days of the week in order to increase the reproducibility of the primary endothelial cell cultures. The protocol starts on Wednesday of the first week, with microvessel production from 5-week-old Wistar rats.



**Figure 2. Phase contrast photomicrographs of RBEC, astrocytes and the co-culture system.** (A) 5-week old Wistar rat microvessel fragments at the time of plating out. (B) Three day old RBEC cultures treated for 2 days with the P-gp substrate puromycin at 4 µg/ml. (C) Pure confluent endothelial monolayers at day 1 after plating on the Millipore filters of a 12 well plate coated with collagen type IV and fibronectin. (D) Homogeneity of the cell monolayer at the periphery of the insert filter. (E) Confluent astrocyte culture on the day of establishment of the co-culture showing characterized honeycomb morphology. (F) Scheme representing the co-culture system with localization of the photomicrographs in C, D and E.



**Figure 3. Characterization of RBEC cultures by immunofluorescence microscopy.** (A) Brain endothelial cells express platelet endothelial cell adhesion molecule PECAM/CD31 at the cell border, (B) von Willebrand factor (VWF) shows a relatively punctate staining, brighter and more aggregated in some cells than others, and concentrated in the perinuclear zone. (C) Without puromycin treatment of RBEC cultures, pericytes are detected with a positive immunostaining for desmin (in green) and have characteristic small round nuclei. (D) Astrocytes express glial fibrillary acidic protein (GFAP). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

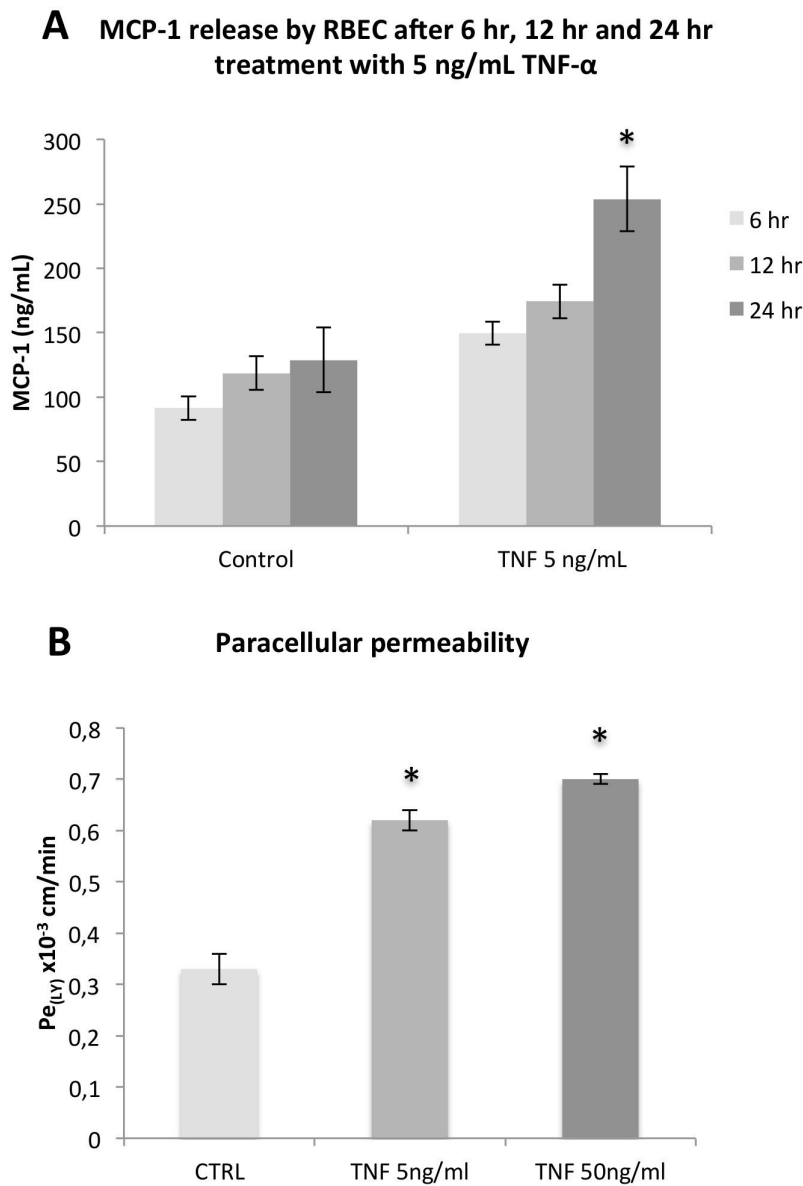


**Figure 4. Immunocytochemical characterization of the rat *in vitro* BBB model and the paracellular permeability of LY across the endothelial monolayer.** The cell monolayer was immunostained with (A) vimentin to reveal a confluent brain endothelial cell monolayer with non-overlapping morphology and typical spindle shaped cells with endothelial morphology and the expression of tight junction proteins (B) claudin-5, (C) ZO-1 and (D) occludin, also detected by western blot for ZO-1 and occludin proteins (E). (F) Monolayer tightness in the 12-well BBB model was assessed by measuring the transport of lucifer yellow (LY-CH, dilithium salt), a small hydrophilic molecule (MW 457 Da) known to be retained by the BBB. Briefly, LY was incubated in the upper compartment of the culture system in contact with cerebral endothelial cells for 60 min at 37 °C. After this time, the medium of the lower compartment was collected and fluorescence was quantified by fluorimetric analysis with a spectrofluorimeter with excitation at 430 nm, and emission at 535 nm. The results are expressed in permeability or Pe in 10<sup>-3</sup> cm/min. The barrier is considered permeable or open when the Pe of LY is above 0.6x10<sup>-3</sup> cm/min. During each 1 hr experiment, the average cleared volume was plotted versus time and the slope estimated by linear regression analysis. The slope of the clearance curve for control filters with collagen type IV-fibronectin coating was denoted P<sub>Sf</sub> and the slope of the clearance curve for filters with brain endothelial cell monolayers was denoted P<sub>Se</sub>. The P<sub>S</sub> value for the endothelial monolayer (P<sub>Se</sub>) was calculated from: [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

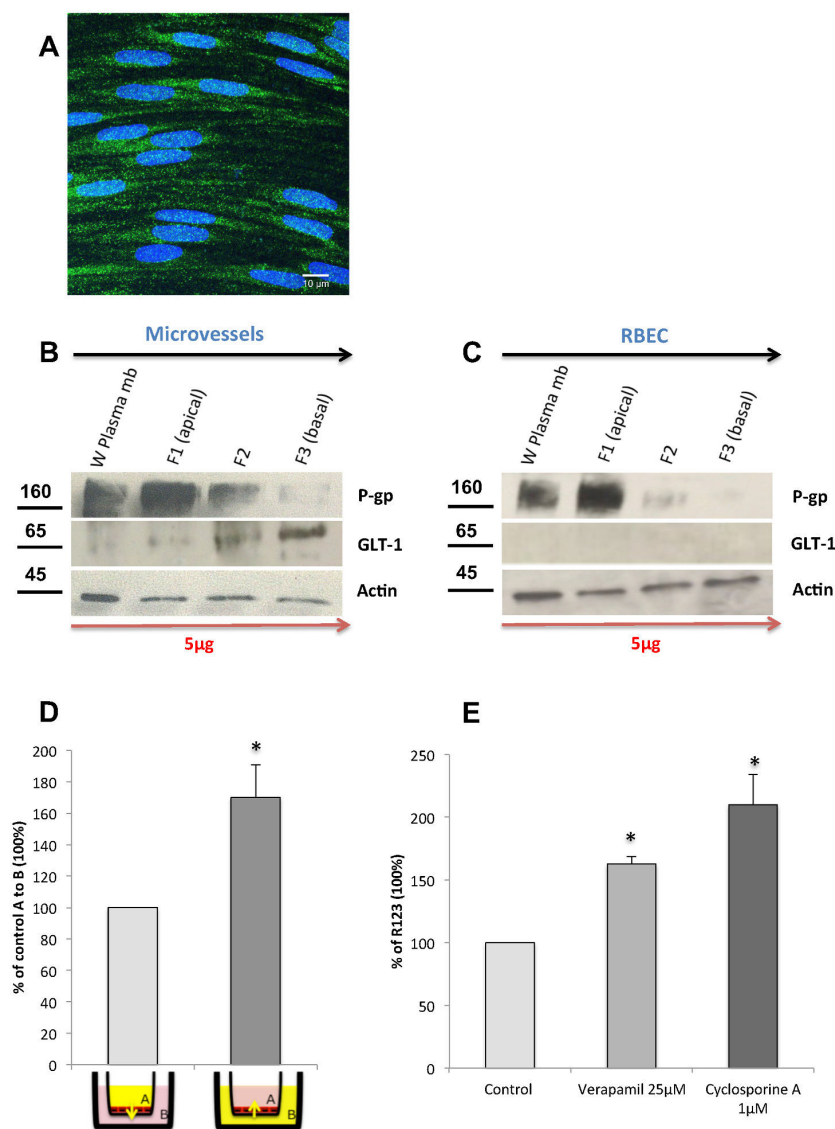
$$\frac{1}{P_{Se}} = \frac{1}{P_{St}} - \frac{1}{P_{Sf}}$$

The P<sub>Se</sub> values were divided by the area of the porous membrane (1.1 cm<sup>2</sup> for Millipore filters of 12-well plates) and the result was the permeability coefficient (Pe) with an average of 0.26 ± 0.11 x 10<sup>-3</sup> cm/min. Results are presented with a vertical scatter plot representation for n = 90 assays (mean of n = 3 to n = 6 monolayers per assay).

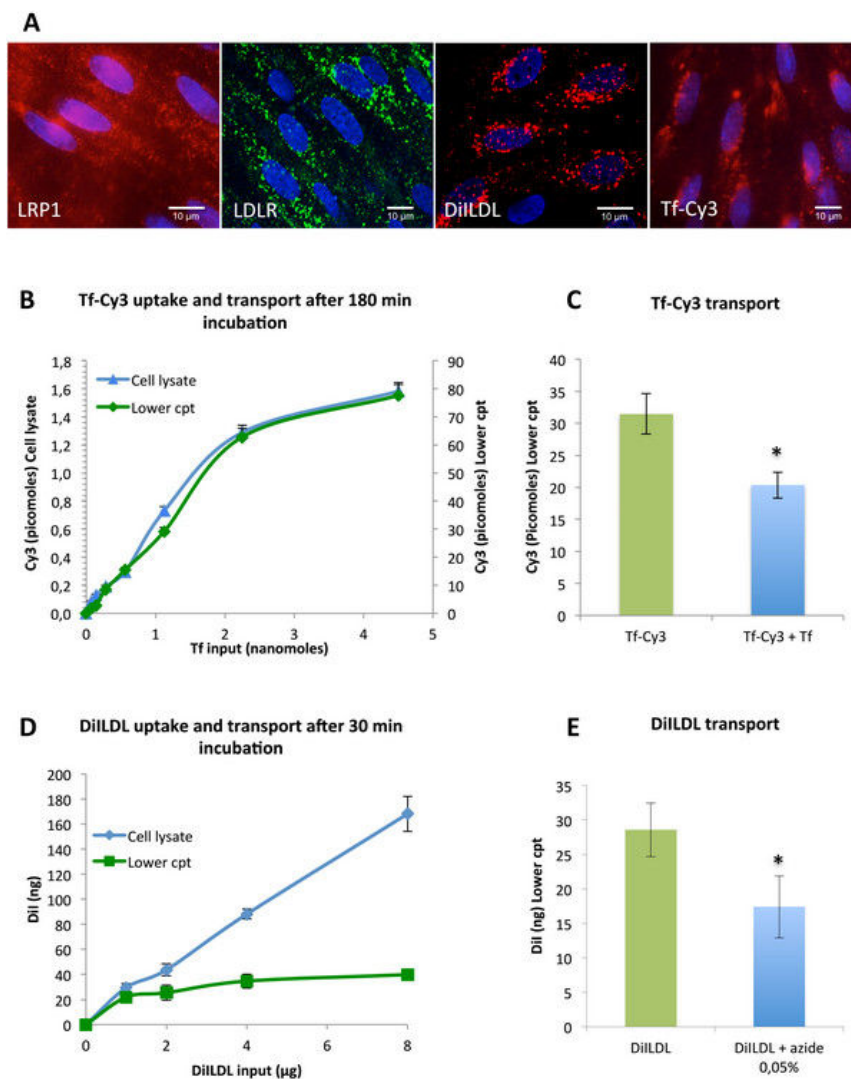




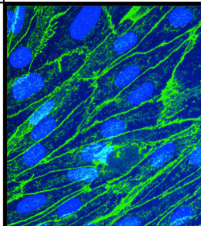
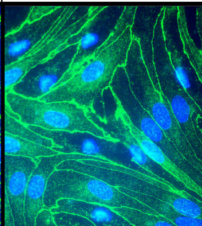
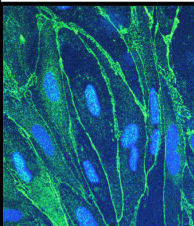
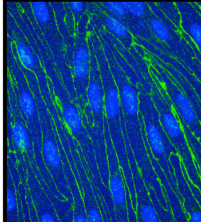
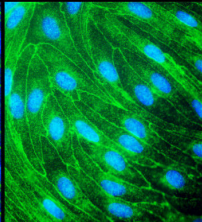
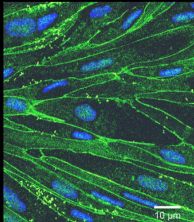
**Figure 5. *In vitro* BBB model response to treatment with the pro-inflammatory agent TNF- $\alpha$ .** The culture media from the culture system was replaced just before TNF- $\alpha$  treatment at 5 ng/ml in the upper compartment for 6 hr, 12 hr and 24 hr. CCL2 release by RBEC was quantified in the upper compartment by ELISA assay in comparison with non-treated control. Note that MCP-1 levels increase slightly as a function of time, even in the non-treated wells. Integrity of the endothelial cell barrier measured by endothelial Pe for LY Pe<sub>(LY)</sub> revealed an increase in monolayer permeability by 24 hr treatment with TNF- $\alpha$  at 5 ng/ml or 50 ng/ml in the range of  $0.62 \pm 0.02 \times 10^{-3}$  cm/min and  $0.7 \pm 0.01 \times 10^{-3}$  cm/min respectively, compared to control at  $0.33 \pm 0.03 \times 10^{-3}$  cm/min (Student's t test,  $p < 0.05$ ).



**Figure 6. Functionality of the P-gp efflux transporter and RBEC polarization.** Expression of the efflux transporter P-gp in brain endothelial cells co-cultured with astrocytes by immunocytochemistry (A) and western blot (B & C). Cell membrane proteins were extracted with a cellular protein fractionation kit. Plasma membranes were obtained by hypotonic lysis and differential centrifugations to eliminate organelles and nuclei. Separation of apical and basolateral proteins from plasma membranes were obtained by sucrose density gradient. P-gp was mainly localized in the apical fraction (F1) while Glutamate transporter-1 (GLT-1) was mainly localized in the basolateral fraction (F3). Purified microvessels prior to plating were used as control for the *in vivo* localization of these proteins. Activity of P-gp was determined by measuring the transport polarity of R123, a P-gp ligand. The flux of 1 μM R123 was measured for 1 hr at 37 °C in the luminal-to-abluminal (A to B) and in the opposite abluminal-to-luminal (B to A) directions. The same experiment was realized without RBEC to assess passive diffusion across the insert filter and data were normalized relative to this value for  $Pe_{(R123)}$  calculation (see Figure 5 legend for Pe calculation method). R123 content in both compartments was measured with a spectrofluorimeter (excitation wavelength at 485 nm, emission wavelength at 535 nm). Data are expressed as 100% of the luminal-to-abluminal transport based on  $Pe_{(R123)}$  (A to B). Verapamil (25 μM, 30 min preincubation) and cyclosporine A (1 μM, 30 min preincubation) were used as reference P-gp inhibitors. R123 accumulation in RBEC was measured after 2 hr with or without preincubation with the P-gp inhibitors (Student's t test,  $p < 0.05$ ). Please click here to view a larger version of this figure.



**Figure 7. Characterization of receptors involved in Receptor Mediated Transcytosis (RMT).** (A) The differentiated RBEC monolayer was immunostained with antibodies against the low density related lipoprotein receptor 1 (LRP1) and the low density lipoprotein receptor (LDLR). Confocal image of RBEC probed for uptake of DiILDL, a fluorescent ligand of the LDLR and for uptake of rat Transferrin-Cy3, a fluorescent ligand of the TfR show punctate staining over the cell surface, with some clustering in the perinuclear region. (B) Rat Tf-Cy3 was added to the upper compartment containing the differentiated RBEC monolayer at 75, 150, 300, 600, 1,200, 2,400 and 4,800 picomoles / insert for 180 min at 37 °C (200 µL in the upper compartment and 1,200 µL in the lower compartment). After this time, Cy3 fluorescence was quantified in the cell lysate (200 µL of PBS 0.1 % Triton X100) and in the lower compartment by fluorimetric analysis with a spectrofluorimeter with excitation at 550 nm and emission at 570 nm. Fluorescence units were transformed in picomoles using a linear working range. (C) For saturation experiments, rat Tf-Cy3 was added to the upper compartment containing the differentiated RBEC monolayer at 1,200 picomoles / insert for 180 min at 37 °C with or without 15 min pre-incubation with 4,800 picomoles / insert of non-fluorescent Tf. The transport in the lower compartment was quantified as in (B) (Student's t test,  $p < 0.05$ ). (D) DiILDL was added to the upper compartment containing the differentiated RBEC monolayer at 1, 2, 4 and 8 µg / insert filters for 30 min at 37 °C (200 µL in the upper compartment and 1,200 µL in the lower compartment). After this time, Dil fluorescence was quantified in the cell lysate (200 µL of PBS 0.1 % Triton X100) and in the lower compartment by fluorimetric analysis with a spectrofluorimeter with excitation at 554 nm and emission at 571 nm. Fluorescence units were transformed in µg using a linear working range. (E) For transport blocking experiments, sodium azide was added at 0.05% 15 min before the incubation of DiILDL at 2 µg / insert for 30 min at 37 °C. The transport in the lower compartment was quantified as in (D) (Student's t test,  $p < 0.05$ ). The absence of toxicity of sodium azide incubation at 0.05% was assessed by  $Pe_{(LY)}$  measurement (data not shown). [Please click here to view a larger version of this figure.](#)

	Rat brain 5 week old male Wistar rats	Rat spinal cord 5 week old male Wistar rats	Mice brain 5 week old male C57Bl6/RJ
Dispase treatment before meninge removal	no	no	yes (15 min)
Number of animal per experimenter	3	6	5
Liberase DH	1 cortex / 1 mL / tube (60 µg/mL)	2 spinal cord / 1 mL / tube (60 µg/mL)	2,5 cortex / 1 mL / tube (45 µg/mL)
Seeding density	1,5 cortex / T75	3 spinal cords / T75	5 cortex / T25
90 % confluence	3.10 <sup>6</sup> cells / T75	3.10 <sup>6</sup> cells / T75	1.10 <sup>6</sup> Cells / T25
N° of inserts (12-well plates) at 160.10 <sup>3</sup> cells / filter	18	18	6
Pe <sub>(LY)</sub> x 10 <sup>-3</sup> cm/min	0,26 ± 0,11	0,6	0,29 ± 0,10
ZO-1			
Occludin			

**Figure 8.** *In vitro* BBB models from rat spinal cord endothelial cells or from mouse brain. The table highlights important parameters for microvessel extraction from rat brain, rat spinal cord and mouse brain. Photomicrographs show immunostaining for ZO1 and occludin in endothelial cell monolayers prepared from rat brain, rat spinal cord and mouse brain.

## Discussion

We describe the implementation of a weekly reproducible protocol for the isolation and plating of brain microvessels, following purification and culture of RBEC and further setting up of co-cultures with primary rat astrocytes to generate an *in vitro* BBB model with characteristic BBB properties.

Successfully establishing standardized *in vitro* BBB cultures requires optimal conditions in the multiple sequential steps of the process. The model was (a) optimized to obtain the lowest paracellular permeability, which remains the “Holy grail” of *in vitro* BBB models, and (b) validated for efflux and RMT mechanisms.

### Production, Purification and Proliferation of RBEC

The greatest challenge when cultivating RBEC is to achieve reproducibility between different cultures. Standardization of the protocol requires high quality tools for dissection, high quality reagents and respect of reagent expiration dates. The experimenter needs to be skilled in micro-dissection under stereomicroscope for rapid removal of meninges and large vessels from the cortex surface. Once the brains are isolated and mechanically dissociated, one of the major challenges is the optimal enzymatic digestion of the freshly isolated brain microvessels. The type and quality of the enzymes used is critical. A mix of collagenases type I and II and dispase at high concentration with low variability between batches was used. Also important are the duration of the enzymatic digestion and the ratio between enzyme concentration/tissue weight/volume of digestion. The best yield of brain microvessel production was obtained with the equivalent of cortices from 1 brain in 1 ml of collagenases / dispase mix at 60 µg/ml during both digestions, respectively 30 min and 1 hr.

Also critical is the elimination of contaminating cells (astrocytes and mainly pericytes). These cells proliferate at higher rate than endothelial cells and do not establish tight junctions with the latter, thus preventing the establishment of a homogeneous cell monolayer with good paracellular restrictiveness. Considering that brain endothelial cells express much higher levels of efflux pumps, especially P-gp, compared to the other

cell types found in microvessels, they tolerate better the otherwise toxic concentrations of P-gp ligand drugs, while non-endothelial cells are eliminated. Puromycin treatment at 4  $\mu\text{g/ml}$  for the first two days was followed by two more days at 2  $\mu\text{g/ml}$  to obtain good endothelial cell purity. This selection can also favor capillary endothelial cells versus those from venules, pre-capillary arterioles or larger microvessels, and lead to tighter monolayers. In addition, the use of poor plasma-derived bovine serum is an imperative to obtain pure cultures of endothelial cells<sup>47,48</sup>. The plasma-derived serum lacks platelet-derived growth factor (PDGF), which is mitogenic for fibroblasts, for smooth muscle cells and therefore for pericytes.

We observed that treatment of plastic and filters with a mix of collagen type IV from mice and human fibronectin yields a significant advantage, with a 2-fold increase of the proliferation yield in comparison with the traditionally recommended collagen type I from rat tail. Important cues for cell proliferation are provided by the extracellular matrix such as integrin and growth factor (bFGF) activation<sup>49</sup>. Buffer concentration and pH of the culture media have been described to impact positively on paracellular tightness<sup>50</sup> and we observed a better reproducibility between cultures with the addition of HEPES buffer at 5 mM.

#### Differentiation of RBEC: Co-culture Establishment on Insert Filters

Once brain endothelial cells have been purified and have proliferated for 6 days, they can be plated on filters. Cell plating at high density is critical to obtain a perfect monolayer. A seeding density of  $160 \times 10^3$  cells per 12 well plate filters was necessary and sufficient to obtain a confluent monolayer 24 hr after seeding. However, isolation of primary brain capillary endothelial cells from their environment is a paradox in the construction of a BBB *in vitro* model as it is known that primary cells, and notably brain capillary endothelial cells, are strongly regulated by their environment and inductive factors produced by the different surrounding cell types. Brain capillary endothelial cells cultured alone rapidly de-differentiate and lose some specific brain endothelial markers. Thus, primary endothelial cells should be used at low passage (P1) and re-connected, at least in part, with their environment by co-culture with astrocytes or medium conditioned by astrocytes<sup>47,51</sup>. This holds true for astrocyte differentiation as brain endothelial cells and astrocytes are involved in two-way induction. Culturing RBEC with astrocytes led to strong induction of interendothelial TJ<sup>52,23</sup>. The molecular mechanisms of re-induction remain largely unknown, and research is ongoing in several laboratories to identify specific modulating factors secreted by astrocytes, which could promote optimal endothelial cell differentiation<sup>53,54</sup>. Factors secreted by brain endothelial cells including leukemia inhibitory factor (LIF) have been shown to induce astrocytic differentiation<sup>55,56</sup>. Before co-culture establishment, astrocytes were exposed to differentiation medium containing the glucocorticoid receptor agonist hydrocortisone, and co-culture conditioned medium. Hydrocortisone is known to improve the tightness of brain endothelial cells and is used in BBB models especially from rat<sup>57</sup> and mouse<sup>58,59</sup> endothelial cells. The conditioned medium is collected from the lower compartment of the endothelial cell/astrocyte co-culture system after 3 days and frozen for later use. The use of co-culture conditioned medium reduced the time of endothelial cell differentiation to 3 days with optimal paracellular permeability for 2 more days and also improved reproducibility between cultures.

Overall, the protocol we describe yields a reproducible TEER over  $300 \text{ ohm} \cdot \text{cm}^2$  and an average paracellular permeability coefficient  $P_{e(LY)}$  of  $0.26 \pm 0.11 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$ , similar to the best primary cell-based BBB models<sup>22,12</sup>. The protocol we describe in the present manuscript with the proposed modulation of microvessel enzymatic digestion can be extended to endothelial cells from the rat spinal cord<sup>60</sup> and from mice brain.

#### Molecular and Functional Characterization

In addition to TJ induction, astrocytes also contribute to the expression of efflux transporters such as P-gp in brain endothelial cells<sup>61</sup>. We indeed show expression of the efflux transporter P-gp in the BBB model and we demonstrate the polarity of the P-gp efflux pump localization using biochemical approaches, and of P-gp activity using a functional assay. GLT-1 expression was detected in the basal membrane fraction of microvessels but was not detected in cultured RBEC. We hypothesize that GLT-1 was down regulated in our RBEC culture in comparison with *in vivo* conditions and consequently not detectable by western blot analysis. Excess glutamate is neurotoxic and *in vivo*, GLT-1 is responsible for glutamate efflux from the basal compartment (parenchyma) to the apical compartment (blood circulation). In astrocyte cultures, GLT-1 expression remains very low and is induced by the addition of glutamate in the medium<sup>62,63</sup>.

We also confirm the expression of influx transporters at the apical membrane such as LRP1, LDLR and TFR. Functionality of TFR and LDLR was demonstrated with binding and transport experiments of Tf-Cy3 and DiLDL from the luminal to the abluminal side of the monolayer as previously shown with a bovine *in vitro* BBB model<sup>54</sup>. Interestingly, it has been shown that lipid requirement from astrocytes increases the expression of LDLR on brain capillary endothelial cells<sup>65,66</sup> further confirming the physiological crosstalk between astrocytes and brain endothelial cells, including *in vitro*. We have chosen to exemplify transport with fluorescent dyes such as Cy3 and DiI considering that spectrofluorimetric analysis is available in most laboratories, and can prove useful to validate *in vitro* BBB models. However, quantification of fluorescence is far less sensitive than radioactivity and requires an increase in the number of experiments to obtain significant data. Ideally, Tf and LDL are usually radiolabeled (Iodine 125) for such binding/uptake and transport experiments.

We also show that the differentiated endothelial cell monolayer obtained with the proposed protocol responds to inflammation induced by TNF- $\alpha$ , as revealed by CCL2 release and BBB opening. CCL2 (MCP-1) and its receptor CCR2 are involved in CNS pathologies such as multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)<sup>67</sup>, CNS trauma<sup>68</sup> and are known as mediators of leukocyte migration into the CNS under neuroinflammatory conditions<sup>69,70</sup>. With the tested protocol, we cannot conclude on a polarized secretion of CCL2 because BBB opening allows the CCL2 concentration to equilibrate between both upper (apical) and lower (basal) compartments. Consequently, we clearly underestimate the amount of CCL2 produced by the RBEC in the apical compartment at 24 hr (Figure 5A).

#### General Overview and Limitations of BBB *In Vitro* Models: *In Vivo* versus *In Vitro* and Rodent versus Human Comparisons

Many promising CNS drugs that proved effective in BBB passage *in vitro* failed in clinical trials due to lack of predictability from *in vitro* BBB models often based on cells isolated from other species than human. To the best of our knowledge, the *in vitro* BBB models are probably more predictive when it comes to studying mechanistic aspects of protein networks, signal transduction, transporters and receptors. Every mechanism, pathway or target to be studied *in vitro* has to be characterized for its regulation by complementary environmental cues (other cell

types, chemicals, proteins) and combined to *in situ* studies with the same animal species, and when possible, with microvessels and endothelial cells isolated from humans, with the restrictions and caution evoked below.

*In vitro* BBB models have to be seen as autonomous systems, isolated from body regulation, but still endowed with major *in vivo* properties and a potential for regulation by environmental cues. No "ideal" *in vitro* BBB model has been proposed yet<sup>71,72,73</sup> because the endothelial cell monolayers lack a number of important constituents of the neuro-glia vascular unit (NGVU) and are isolated from blood and body regulation. The lack of pericytes<sup>74,16</sup> or neurons<sup>17,18</sup> or the different constituents of the extracellular matrix used for plastic coating or the culture medium and serum used for cell growth in the most common and "easiest made" *in vitro* BBB models based on endothelial cells differentiated with astrocytes may modulate protein expression in comparison with the *in vivo* situation<sup>75</sup>. These models may express many transporters displayed *in vivo*, but not all. In some cases, transport parameters were first verified in isolated microvessels (closest to the *in vivo* situation), and then studied in cell culture systems<sup>76,61</sup>.

Molecular biology research has allowed the characterization of gene and protein expression in isolated microvessels and low passage endothelial cell cultures from the same species, and between different species, most often from small animals such as rodents (mice and rats) or from cow and pig in comparison to humans<sup>77,78,75,15</sup>. Transcriptomic comparison between *in vivo* and *in vitro* brain microvascular endothelial cells showed numerous gene transcripts that were differentially expressed and most often significantly downregulated *in vitro*. Transcripts encoding influx transporters such as TfR and proteins implicated in vesicle trafficking are mainly downregulated in cultured brain endothelial cells, suggesting a general decrease in endocytosis and vesicular transport in such cells. Culture manipulation in terms of purity (puromycin treatment) and treatment with hydrocortisone may help to restore a more "in vivo-like" gene expression profile<sup>77</sup>. Transcriptomic studies also revealed important differences between species that further complicate predictions on drug uptake in humans based on rodent *in vitro* BBB models<sup>75</sup>. *In vitro* BBB models involving co-culture of human endothelial cells and astrocytes have been described<sup>15</sup>. Although relevant, these models are more difficult to implement on a regular basis as they require regulated access to post-mortem human tissue and there is heterogeneity in the quality/properties of the human brain endothelial cells depending on the age, diseases, and possibly medical treatment of donors. Efforts have to be made to develop new *in vitro* models that better reproduce the physiological, anatomical and functional characteristics of the *in vivo* BBB. Co-cultures involving three-cell types are highly restrictive and appear difficult to implement routinely. To date, the most complex *in vitro* BBB models are the dynamic *in vitro* models (DIV-BBB) which include vessel-like organization with astrocytes and include a flow of medium that mimics the blood flow<sup>75,79,80,81,82,83,84,85</sup>. When cerebral endothelial cells are exposed to a flow, the generated shear stress activates mechanotransducers at the cell surface, which modulate the expression of different genes involved in endothelial cell physiology such as cell division, differentiation, migration and apoptosis<sup>80</sup>. *In vivo*, shear stress generated by the blood flow is responsible for mitotic arrest at the cell contact, which permits the establishment of an endothelial cell monolayer in blood vessels<sup>80</sup>. Genomic and proteomic analysis of normal human brain microvascular endothelial cells showed the impact of shear stress in BBB endothelial physiology<sup>84</sup>. Shear stress is responsible for cell survival, a higher degree of endothelial cell adhesion, efflux pump induction and better polarization of transporters<sup>75</sup>, regulation of glucose metabolism<sup>75,86</sup>, oxidation mediated by CYP450 enzymes<sup>75</sup> and the regulation of paracellular permeability by increasing the expression of genes encoding for intercellular junctional elements like occludin and ZO-1<sup>87,75,80</sup> and consequently high TEER around 1,500 - 2,000 ohm · cm<sup>2</sup>, the closest to known *in vivo* parameters<sup>79,80</sup>.

In the biotechnology and pharmaceutical industry, routine screening of drugs or even high throughput screening (HTS) and efforts to reduce animal experimentation, led to the development of different cell lines to be used in replacement of the primary culture of cerebral endothelial cells which remain more difficult to set-up routinely. In most cases, primary cultures of cerebral endothelial cells were transduced with an immortalizing gene (SV40 or polyoma virus large T-antigen or adenovirus E1A), either by transfection of plasmid DNA or by infection using retroviral vectors<sup>88,89,75</sup>. Several endothelial cell lines of cerebral origin have been developed such as the RBE4, GP8/3.9, GPNT, RBEC1, TR-BBBs or rBCEC4 rat cell lines<sup>88,75</sup>, the b.End3 mouse cell line<sup>90,75</sup>, the PBMEC/C1-2 porcine cell line<sup>87,75</sup>, and the hCMEC/D3 human cell line<sup>89,75</sup>. Other models are based on cells of non-cerebral origin such as the Madin-Darby canine kidney (MDCK) or Caco2 cell lines<sup>12,75</sup>. Among the different human cerebral endothelial cell lines, the hCMEC/D3 has been widely cited and improved as a model of BBB since its establishment in 2005<sup>91,92</sup>. Like primary cultures, cell lines present advantages and limitations. They are easier to handle than primary cultures, have an extended life span, are well characterized and allow reproducibility between large scale experiments. However, cell lines can lose tissue-specific functions, lose environmental regulation and acquire a molecular phenotype quite different from cells *in vivo*<sup>75,89</sup>. In particular, monolayers generated from cell lines present reduced tightness, low TEER and show transporter profile variation<sup>75,89</sup>. Thus animal experiments or studies in primary cells are often preferred despite their added complexity.

## Disclosures

Michel Khrestchatisky is director of the UMR7259 laboratory, co-founder and scientific counsel of VECT-HORUS biotechnology company.

## Acknowledgements

Financial support to VECT-HORUS is acknowledged from the Fonds Unique Interministériel (FUI/ MEDUL project) and to VECT-HORUS and the UMR7259 laboratory from the Agence Nationale de la Recherche (ANR, TIMPAD, VECToBrain, VEC2Brain, ADHOC and PREVENTAD collaborative projects). The UMR7259 laboratory also acknowledges financial support from the CNRS and from Aix-Marseille Université.

## References

1. Rubin, L.L., Staddon, J.M. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* **22**, 11-28 (1999).
2. Abbott, N.J. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol.* **25**, 5-23 (2005).
3. Cecchelli, R., et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* **6** (8), 650-61 (2007).
4. Pekny, M., Stanness, K.A., Eliasson, C., Betsholtz, C., Janigro, D. Impaired induction of blood-brain barrier properties in aortic endothelial cells by astrocytes from GFAP-deficient mice. *Glia.* **22** (4), 390-400 (1998).

5. Girouard, H., Iadecola, C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol.* **100** (1), 328-35 (2006).
6. Dehouck, M.P., Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C., Cecchelli, R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neurochem.* **54** (5), 1798-801 (1990).
7. Culot, M., *et al.* An *in vitro* blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro.* **22** (3), 799-811 (2008).
8. Zhang, Y., *et al.* Porcine brain microvessel endothelial cells as an *in vitro* model to predict *in vivo* blood-brain barrier permeability. *Drug Metab Dispos.* **34** (11), 1935-43 (2006).
9. Patabendige, A., Skinner, R.A., Abbott, N.J. Establishment of a simplified *in vitro* porcine blood-brain barrier model with high transendothelial electrical resistance. *Brain Res.* **1521**, 1-15 (2012).
10. Abbott, N.J., Dolman, D.E., Drndarski, S., Fredriksson, S.M. An improved *in vitro* blood-brain barrier model: rat brain endothelial cells co-cultured with astrocytes. *Methods Mol Biol.* **814**, 415-30 (2012).
11. Nakagawa, S., *et al.* A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* **54** (3-4), 253-63 (2009).
12. Wilhelm, I., Fazakas, C., Krizbai, I.A. *In vitro* models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* **71** (1), 113-28 (2011).
13. Coisne, C., *et al.* Mouse syngenic *in vitro* blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest.* **85** (6), 734-46 (2005).
14. Jossierand, V., *et al.* Evaluation of drug penetration into the brain: a double study by *in vivo* imaging with positron emission tomography and using an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther.* **316** (1), 79-86 (2006).
15. Lacombe, O., *et al.* *In vitro* primary human and animal cell-based blood-brain barrier models as a screening tool in drug discovery. *Mol Pharm.* **8** (3), 651-63 (2011).
16. Nakagawa, S., *et al.* Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* **27** (6), 687-94 (2007).
17. Lippmann, E.S., Weidenfeller, C., Svendsen, C.N., Shusta, E.V. Blood-brain barrier modeling with co-cultured neural progenitor cell-derived astrocytes and neurons. *J Neurochem.* **119** (3), 507-20 (2011).
18. Xue, Q., *et al.* A novel brain neurovascular unit model with neurons, astrocytes and microvascular endothelial cells of rat. *Int J Biol Sci.* **9** (2), 174-89 (2013).
19. Sohet, F., Daneman, R. Genetic mouse models to study blood-brain barrier development and function. *Fluids Barriers CNS.* **10** (1), 3 (2013).
20. Shayan, G., Choi, Y.S., Shusta, E.V., Shuler, M.L., Lee, K.H. Murine *in vitro* model of the blood-brain barrier for evaluating drug transport. *Eur J Pharm Sci.* **42** (1-2), 148-55 (2011).
21. Cecchelli, R., *et al.* *In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* **36** (2-3), 165-178 (1999).
22. Deli, M.A., Abrahám, C.S., Kataoka, Y., Niwa, M. Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* **25** (1), 59-127 (2005).
23. Perrière, N., *et al.* A functional *in vitro* model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res.* **1150**, 1-1 (2007).
24. Partridge, W.M., Buciak, J.L., Friden, P.M. Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther.* **259** (1), 66-70 (1991).
25. Delbart, C., Fruchart, J.C., Cecchelli, R. Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem.* **53** (2), 340-5 (1989).
26. Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R., Fenart, L. Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an *in vitro* model. *Brain Res.* **1249**, 34-42 (2009).
27. Partridge, W.M. Vector-mediated drug delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev.* **36** (2-3), 299-321 (1999).
28. Partridge W.M., Boado, R.J. Reengineering biopharmaceuticals for targeted delivery across the blood-brain barrier. *Methods Enzymol.* **503**, 269-92 (2012).
29. Boado, R.J., Lu, J.Z., Hui, E.K., Sumbria, R.K., Partridge, W.M. Pharmacokinetics and brain uptake in the rhesus monkey of a fusion protein of arylsulfatase a and a monoclonal antibody against the human insulin receptor. *Biotechnol Bioeng.* **110** (5), 1456-65 (2013).
30. Ito, S., Ohtsuki, S., Terasaki, T. Functional characterization of the brain-to-blood efflux clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the rat blood-brain barrier. *Neurosci Res.* **56** (3), 246-252 (2006).
31. Demeule, M., *et al.* Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther.* **324** (3), 1064-72 (2008).
32. Yamada, K., *et al.* The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid beta peptides in an *in vitro* model of the blood-brain barrier cells. *J Biol Chem.* **283** (50), 34554-62 (2008).
33. Gabathuler, R. New protein vectors for physiological transfer of therapeutic agents to the central nervous system. *Biol Aujourd'hui.* **206** (3), 191-203 (2012).
34. Malcor, J.D., *et al.* Chemical optimization of new ligands of the low-density lipoprotein receptor as potential vectors for central nervous system targeting. *J Med Chem.* **55** (5), 2227-41 (2012).
35. Wang, D., *et al.* Engineering a lysosomal enzyme with a derivative of receptor-binding domain of apoE enables delivery across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **110** (8), 2999-3004 (2013).
36. Spencer, B.J., Verma, I.M. Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104** (18), 7594-9 (2007).
37. Kreuter, J., *et al.* Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target.* **10** (4), 317-25 (2002).
38. Stamatovic, S.M., Keep, R.F., Andjelkovic, A.V. Brain endothelial cell-cell junctions: how to 'open' the blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol.* **6** (3), 179-92 (2008).
39. Petty, M.A., Lo, E.H. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol.* **68** (5), 311-23 (2002).
40. Stephan, D., *et al.* TWEAK/Fn14 pathway modulates properties of a human microvascular endothelial cell model of blood brain barrier. *J Neuroinflammation.* **10** (9) (2013).
41. Descamps, L., Cecchelli, R., Torpier, G. Effects of tumor necrosis factor on receptor-mediated endocytosis and barrier functions of bovine brain capillary endothelial cell monolayers. *J Neuroimmunol.* **74** (1-2), 173-84 (1997).

42. Miller, F., *et al.* The MAP kinase pathway mediates transcytosis induced by TNF-alpha in an *in vitro* blood-brain barrier model. *Eur J Neurosci.* **22** (4), 835-44 (2005).
43. Fillebeen, C., Dehouck, B., Benaïssa, M., Dhennin-Duthille, I., Cecchelli, R., Pierce, A. Tumor necrosis factor-alpha increases lactoferrin transcytosis through the blood-brain barrier. *J Neurochem.* **73** (6), 2491-500 (1999).
44. Zhang, Y., Schuetz, J.D., Elmquist, W.F., Miller, D.W. Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* **311** (2), 449-55 (2004).
45. Kane, R.L., Martínez-López, I., DeJoseph, M.R., Viña, J.R., Hawkins, R.A. Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem.* **274** (45), 31891-5 (1999).
46. Kannan, R., Mittur, A., Bao, Y., Tsuruo, T., Kaplowitz, N. GSH transport in immortalized mouse brain endothelial cells: evidence for apical localization of a sodium-dependent GSH transporter. *J Neurochem.* **73** (1), 390-9 (1999).
47. Abbott, N.J., Hughes, C.C., Revest, P.A., Greenwood J. Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an *in vitro* blood-brain barrier. *J Cell Sci.* **103** (1), 23-37 (1992).
48. Perrière, N., *et al.* Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J. Neurochem.* **93** (2), 279-89 (2005).
49. Tsou, R., Isik, F.F. Integrin activation is required for VEGF and FGF receptor protein presence on human microvascular endothelial cells. *Mol Cell Biochem.* **224** (1-2), 81-9 (2001).
50. Helms, H.C., Waagepetersen, H.S., Nielsen, C.U., Brodin, B. Paracellular tightness and claudin-5 expression is increased in the BCEC/astrocyte blood-brain barrier model by increasing media buffer capacity during growth. *AAPS J.* **12** (4), 759-70 (2010).
51. Rubin, L.L., Sanes, J.R. Neuronal and glial cell biology. *Curr Opin Neurobiol.* **6** (5), 573-5 (1996).
52. Abbott, N.J. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* **7** (1), 41-53 (2006).
53. Deracinois, B., *et al.* Glial-cell-mediated re-induction of the blood-brain barrier phenotype in brain capillary endothelial cells: a differential gel electrophoresis study. *Proteomics.* **13** (7), 1185-99 (2013).
54. Haseloff, R.F., Blasig, I.E., Bauer, H.C., & Bauer, H. In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells *in vitro*. *Cell Mol Neurobiol.* **25** (1), 25-39 (2005).
55. Mi, H., Haeberle, H., & Barres, B.A. Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J Neurosci.* **21** (5), 1538-47 (2001).
56. Abbott, N.J. Astrocyte endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* **200** (6), 629 – 638 (2002).
57. Calabria, A.R., Weidenfeller, C., Jones, A.R., de Vries, H.E., Shusta, E.V. Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *J Neurochem.* **97** (4), 922-33 (2006).
58. Förster, C., *et al.* Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine *in vitro* system. *J. Physiol.* **565** (Pt. 2), 475 (2005).
59. Förster, C., Waschke, J., Burek, M., Leers, J., Drenckhahn, D. Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific. *J. Physiol.* **573** (Pt. 2), 413 (2006).
60. Ge, S., Pachter, J.S. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord. *J Neuroimmunol.* **177** (1-2), 209-14 (2006).
61. Berezowski, V., Landry, C., Dehouck, M.P., Cecchelli, R., Fenart, L. 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 Res.* **1018** (1), 1-9 (2004).
62. Duan, S., Anderson, C.M., Stein, B.A., Swanson, R.A. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci.* **19** (23), 10193-200 (1999).
63. Gegelashvili, G., Dehnes, Y., Danbolt, N.C., Schousboe, A. The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochem Int.* **37** (2-3), 163-70 (2000).
64. Candela, P., *et al.* Physiological pathway for low-density lipoproteins across the blood-brain barrier: transcytosis through brain capillary endothelial cells *in vitro*. *Endothelium.* **15** (5-6), 254-64 (2008).
65. Dehouck, B., Dehouck, M.P., Fruchart, J.C., Cecchelli, R. Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol.* **126** (2), 465-73 (1994).
66. Dehouck, B., Fenart, L., Dehouck, M.P., Pierce, A., Torpier, G., Cecchelli, R. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* **138** (4), 877-89 (1997).
67. Mahad, D.J., Ransohoff, R.M. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol.* **15** (1), 23-32 (2003).
68. Glabinski A.R., Ransohoff, R.M. Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol.* **5** (1), 3-12 (1999).
69. Stamatovic, S.M., *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* **25** (5), 593-606 (2005).
70. Semple, B.D., Kossmann, T., Morganti-Kossmann, M.C. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab.* **30** (3), 459-73 (2010).
71. Veszelka, S., Nakagawa, S., Niwa, M., Deli, M.A. Patented *in vitro* blood-brain barrier models in CNS drug discovery. *Recent Pat CNS Drug Discov.* **6** (2), 107-118 (2011).
72. Patabendige, A. The value of *in vitro* models of the blood-brain barrier and their uses. *Altern Lab Anim.* **40** (6), 335-8 (2012).
73. Ogunshola, O.O. *In vitro* modeling of the blood-brain barrier: simplicity versus complexity. *Curr Pharm Des.* **17** (26), 2755-61 (2011).
74. Vandenhoute, E., *et al.* Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes. *Curr Neurovasc Res.* **8** (4), 258-69 (2011).
75. Shawahna, R., Declèves, X., Scherrmann, J.M. Hurdles with using *in vitro* models to predict human blood-brain barrier drug permeability: a special focus on transporters and metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab.* **14** (1), 120-36 (2013).
76. Vernon, H., Clark, K., Bressler, J.P. *In vitro* models to study the blood brain barrier. *Methods Mol Biol.* **758**, 153-68 (2011).
77. Calabria, A.R., Shusta, E.V. A genomic comparison of *in vivo* and *in vitro* brain microvascular endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* **28** (1), 135-48 (2008).
78. Uchida, Y., Ohtsuki, S., Kamiie, J., Terasaki, T. Blood-brain barrier (BBB) pharmacoproteomics: reconstruction of *in vivo* brain distribution of 11 P-glycoprotein substrates based on the BBB transporter protein concentration, *in vitro* intrinsic transport activity, and unbound fraction in plasma and brain in mice. *J Pharmacol Exp Ther.* **339** (2), 579-88 (2011).
79. Cucullo, L., Aumayr, B., Rapp, E., Janigro, D. Drug delivery and *in vitro* models of the blood-brain barrier. *Curr Opin Drug Discov Devel.* **8** (1), 89-99 (2005).
80. Naik, P., Cucullo, L. *In vitro* blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J Pharm Sci.* **101** (4), 1337-54 (2012).



81. Stanness, K.A., et al. A new model of the blood–brain barrier: co-culture of neuronal, endothelial and glial cells under dynamic conditions. *Neuroreport*. **10** (18), 3725-31 (1999).
82. Santaguida, S., et al. Side by side comparison between dynamic versus static models of blood-brain barrier *in vitro*: a permeability study. *Brain Res*. **1109** (1), 1-13 (2006).
83. Cucullo, L., Marchi, N., Hossain, M., Janigro, D. A dynamic *in vitro* BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system. *J Cereb Blood Flow Metab*. **31** (2), 767-77 (2011).
84. Cucullo, L., Hossain, M., Puvenna, V., Marchi, N., Janigro, D. The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci*. **12** (40), (2011).
85. Cucullo, L., Hossain, M., Tierney, W., Janigro, D. A new dynamic *in vitro* modular capillaries-venules modular system: cerebrovascular physiology in a box. *BMC Neurosci*. **14**:18 (2013).
86. Qutub, A.A., Hunt, C.A. Glucose transport to the brain: a systems model. *Brain Res Brain Res Rev*. **49** (3), 595-617 (2005).
87. Neuhaus, W., et al. A novel flow based hollow-fiber blood-brain barrier *in vitro* model with immortalised cell line PBMEC/C1-2. *J Biotechnol*. **125** (1), 127-41 (2006).
88. Roux, F., Couraud, P.O. Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cell Mol Neurobiol*. **25** (1), 41-58 (2005).
89. Weksler, B.B., et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J*. **19** (13), 1872-4 (2005).
90. Omid, Y., et al. Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an *in vitro* blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res*. **990** (1-2), 95-112 (2003).
91. Weksler, B., Romero, I.A., Couraud, P.O. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids Barriers CNS*. **10** (1), 16 (2013).
92. Cucullo, L., et al. Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J Cereb Blood Flow Metab*. **28** (2), 312-28 (2008).

Materials List for:

## Setting up an *In Vitro* Model of Rat Blood-brain Barrier (BBB): A Focus on BBB Impermeability and Receptor-mediated Transport

Yves Molino<sup>1</sup>, Françoise Jabès<sup>1</sup>, Emmanuelle Lacassagne<sup>2</sup>, Nicolas Gaudin<sup>2</sup>, Michel Khrestchatsky<sup>2</sup>

<sup>1</sup>VECT-HORUS SAS

<sup>2</sup>Aix-Marseille Université, CNRS, NICN UMR 7259

Correspondence to: Michel Khrestchatsky at [michel.khrestchatsky@univ-amu.fr](mailto:michel.khrestchatsky@univ-amu.fr)

URL: <http://www.jove.com/video/51278>

DOI: [doi:10.3791/51278](https://doi.org/10.3791/51278)

### Materials

Name	Company	Catalog Number	Comments
BSA fraction V low endotoxin	PAA	K45-011-500g	4 °C
Penicillin-streptomycin	Invitrogen	15140-122	-20 °C
0.05% Trypsin-EDTA (1X)	Invitrogen	25300-054	-20 °C
DMEM high glucose	Invitrogen	61965-026	4 °C
Fetal bovine serum	Invitrogen	10270-098	-20 °C / 1 year
T75 flasks	Becton Dickinson Falcon	353135	
HEPES buffer (1 M)	Invitrogen	15630-056	4 °C / 1 year
Collagen type IV mouse (10 x 1 mg)	Becton Dickinson	356233	-20 °C / 1 month
Fibronectin humain plasma (5 mg)	Becton Dickinson	356008	-20 °C / 1 month
Vannas spring scissors, straight (9 cm)	Fine Science Tools	91500-09	
Scissors, straight (9 cm)	Fine Science Tools	14568-09	
Forceps Dumont #5/45 (11 cm)	Fine Science Tools	11251-35	
Graefe Forceps, tip width 0.8 mm	Fine Science Tools	11050-10	
Graefe Forceps, curve tip width 0.8 mm	Fine Science Tools	11051-10	
Collagenases / dispase mix (2 x 5 mg)	Roche Diagnostics	05 401 054 001	-20 °C / 3 months
DNase I (100 mg / 569 KU / mg)	Sigma Aldrich	DN25-100 mg	-20 °C / 1 year
Gentamicin (10 mg/ml)	Invitrogen	15710-049	4 °C / 1 year
DMEM/F12	Invitrogen	31331-028	4 °C
Bovine serum from platelet poor plasma (500 ml)	Clinisciences	BT-214-100	-20 °C / 1 year
bFGF (10 µg)	Invitrogen	13256-029	-20 °C / 6 months
Heparine Na salt from porcine mucosa Grade I	Sigma Aldrich	H3149-100KU	4 °C / 1 year
Puromycin	Sigma Aldrich	P8833-10 mg	-20 °C / 6 months
ITSX	Invitrogen	51500-056	4 °C / 1 year
Polyethylene hanging cell insert for 12-well plates	Millipore	PIRP15R48	Porosity: 1 µm Surface: 1.1 cm <sup>2</sup>
Hydrocortisone	Sigma Aldrich	H0888-1 g	-20 °C / 1 year
Mouse anti-CD31 / PECAM	Chemicon	MAB1393, clone TLD-3A12 (1 mg/mL)	1/200 - fixation PFA 4%
Rabbit anti-Von Willebrand	Chemicon	AB7356	1/200 - fixation PFA 4%
Mouse anti-Desmine	Chemicon	MAB3430	1/200 - fixation PFA 4%

Mouse anti-Vimentine	Invitrogen, Zymed	08-0052 clone V9, (58 µg/ml)	1/50 - fixation PFA 4%
Mouse anti-Claudin-5	Invitrogen, Zymed	35-2500, (500 µg/ml)	1/200 - fixation PFA 4%
Rabbit anti-ZO-1	Invitrogen, Zymed	61-7300 (250 µg/ml)	1/200 - fixation PFA 4%
Rabbit anti-Occludine	Invitrogen, Zymed	71-1500 (250 µg/ml)	1/200 - fixation PFA 4%
Alexa fluor 488, 594 conjugated secondary antibodies	Invitrogen		1/800
Lucifer yellow CH, dilithium salt	Sigma Aldrich	L0259	-20 °C
TNF-alpha human	PeptoTech	300-01A	-20 °C
Rat MCP-1 ELISA Kit	PeptoTech	900-K59	4 °C / -20 °C
Mouse anti-P-glycoprotein	Covance, Eurogentec	SIG-38710-1000, clone C219 (1mg/mL)	1/400 - fixation PFA 4% 1/200 (western blot)
Rabbit anti-GLT-1	Abcam	ab41621	1/1000 (western blot)
Rhodamine 123	Sigma Aldrich	83702	4 °C
Verapamil hydrochloride	Sigma Aldrich	V4629	4 °C
Cyclosporine A	Sigma Aldrich	30024	4 °C
Monoclonal anti-α2 Macroglobulin Receptor (CD91, LRP1) against b-chain of amino acid 4291-4344 within an EGF repeat	American Diagnostica	3501 (100 µg/ml)	1/5 - fixation PFA 4%
Mouse anti-LDLR	R&D systems	AF2255 (200 µg/ml)	1/50 - fixation PFA 4%
Rat transferrin-Cy3	Gentaur	JOR160050	4 °C
DiLDL	Invitrogen	L-3482	4 °C

### III. Conclusion

L'établissement d'une barrière, "limitant" le flux paracellulaire entre les deux compartiments, est un prérequis obligatoire à la validation des modèles *in vitro* de BHE et BSME. Entre autres, cela permet d'étudier l'impact de l'inflammation sur la physiologie des monocouches de CEMs ou l'étude des mécanismes de transports spécifiques, en compétition avec le flux paracellulaire, tel que le CMT ou le RMT, dont les ligands captés de la circulation plasmatique, sont orientés par voie transcellulaire vers le parenchyme nerveux.

**Article 2 (publié): Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for delivery across the blood–brain barrier**

## I. Résumé

L'excitotoxicité est un processus pathologique présent dans de nombreux troubles majeurs du SNC. Elle résulte d'une hyperstimulation des récepteurs aux neurotransmetteurs excitateurs (glutamate) entraînant une neurodégénérescence. Cette cascade d'évènements est associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de metalloprotéinases matricielles (matrix metalloproteinases, MMPs) délétères pour le tissu nerveux, plus spécifiquement MMP-9 au niveau cérébral. Par conséquent, l'inhibition de MMP-9 pourrait représenter une stratégie de neuroprotection suite à l'hyperstimulation des récepteurs glutamatergiques. Dans cet objectif, le tissu inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1), un inhibiteur endogène de MMP-9, pourrait représenter un bon candidat (Jourquin *et al.*, 2003). Cependant, l'absence de passage de TIMP-1 à travers la BHE et sa courte demi-vie plasmatique (Kurschat *et al.*, 1995 ; Black *et al.*, 1996) sont des facteurs limitant son potentiel thérapeutique.

L'objectif de cette étude a été de formuler TIMP-1 et le fluorophore 6-coumarin, par encapsulation dans des nanoparticules (NP) de type poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) enrobées ou non avec le surfactant polysorbate 80 (Ps80) afin de favoriser leur pénétration à travers la BHE. TIMP-1 recombinant a été cloné avec un 6x Histag et produit dans la lignée cellulaire HEK293T. La protéine purifiée a été caractérisée par gel d'activité gélatinolytique et reverse gel zymographie. La formulation des NPs a été optimisée et caractérisée par scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), polydispersity index (PDI), zeta potential, taux d'encapsulation et taux de libération protéique en fonction du temps. L'encapsulation de TIMP-1 dans les NPs constituées de 3 % (p/v) de PLGA (PLGA3), ayant une taille moyenne de  $148.5 \pm 25$  nm, a permis d'obtenir les meilleurs résultats en terme de taux d'encapsulation de TIMP-1 (83%) et de libération soutenue de TIMP-1, environ 72 % en 7 jours.

L'interaction des NPs avec les cellules endothéliales de la BHE a été réalisée en utilisant (i) une lignée de cellules endothéliales cérébrales de rat (rat brain endothelial cells 4, RBE4) et (ii) le modèle *in vitro* de BHE de rat constitué d'une culture primaire de CEMCs en insert suspendu en co-culture avec des astrocytes (Molino *et al.*, 2014). Les NPs et les NPs-Ps80 ont été comparées concernant leur toxicité cellulaire, leur captation par les cellules endothéliales et leur pénétration à travers la monocouche de cellules endothéliales du modèle *in vitro* de BHE, du compartiment luminal vers le compartiment abluminal. Les NPs et les NPs-Ps80 n'ont pas montré de toxicité cellulaire apparente, (i) quantifiée par mesure de la perméabilité endothéliale du lucifer yellow (LY,  $Pe_{LY}$ ), (ii) quantifié par dosage de la lactate déshydrogénase (LDH), et (iii) par observation de l'intégrité des

monocouches de CEMCs, suivie par immunocytochimie contre la protéine de jonctions serrées ZO-1. Les NPs sans enrobage de Ps80 sont captées de façon concentration dépendante par les RBE4s par rapport aux NPs-Ps80, qui ne se lient quasiment pas à, et ne s'accumulent pas dans, ces cellules. De plus, les NPs sans enrobage de Ps80 et TIMP-1 seul ne traversent quasiment pas la monocouche de CEMCs, suggérant leur faible libération cellulaire. A contrario, l'enrobage des NPs avec le Ps80 augmente considérablement leur pénétration à travers la monocouche de CEMCs, avec un taux d'accumulation dans le compartiment abluminal de 11.21 % après 30 min d'incubation dans le compartiment luminal. Ces résultats de transport dans le compartiment abluminal, obtenus par dosage de la fluorescence de la 6-coumarin, ont été confirmés par dosage ELISA de TIMP-1.

Ces calibrations de formulation des NPs et les études sur modèles *in vitro* de BHE ont été poursuivies par injection intraveineuse dans la queue de souris des NPs-Ps80 (PLGA3) et confirmation de leur pénétration cérébrale, 3 hr post injection, par immunohistochimie (anticorps anti-Histag) sur des coupes de cerveaux.

## II. Article 2

# Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for delivery across the blood–brain barrier

Mayank Chaturvedi<sup>1</sup>

Yves Molino<sup>2</sup>

Bojja Sreedhar<sup>3</sup>

Michel Khrestchatsky<sup>4</sup>

Leszek Kaczmarek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Neurobiology, Nencki Institute, Warsaw, Poland;

<sup>2</sup>Vect-Horus, Marseille, France;

<sup>3</sup>Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad, India;

<sup>4</sup>Aix-Marseille Université, CNRS, NICN, UMR7259, Marseille, France

**Aim:** The aim of this study was to develop poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles (NPs) for delivery of a protein – tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 (TIMP-1) – across the blood–brain barrier (BBB) to inhibit deleterious matrix metalloproteinases (MMPs).

**Materials and methods:** The NPs were formulated by multiple-emulsion solvent-evaporation, and for enhancing BBB penetration, they were coated with polysorbate 80 (Ps80). We compared Ps80-coated and uncoated NPs for their toxicity, binding, and BBB penetration on primary rat brain capillary endothelial cell cultures and the rat brain endothelial 4 cell line. These studies were followed by in vivo studies for brain delivery of these NPs.

**Results:** Results showed that neither Ps80-coated nor uncoated NPs caused significant opening of the BBB, and essentially they were nontoxic. NPs without Ps80 coating had more binding to endothelial cells compared to Ps80-coated NPs. Penetration studies showed that TIMP-1 NPs + Ps80 had  $11.21\% \pm 1.35\%$  penetration, whereas TIMP-1 alone and TIMP-1 NPs without Ps80 coating did not cross the endothelial monolayer. In vivo studies indicated BBB penetration of intravenously injected TIMP-1 NPs + Ps80.

**Conclusion:** The study demonstrated that Ps80 coating of NPs does not cause significant toxic effects to endothelial cells and that it can be used to enhance the delivery of protein across endothelial cell barriers, both in vitro and in vivo.

**Keywords:** PLGA nanoparticles, drug delivery, protein delivery, sustained release, brain delivery, BBB penetration, RBCEC culture

## Introduction

Many newly developed therapeutic molecules are biopharmaceuticals, such as recombinant proteins, small interfering ribonucleic acids, monoclonal antibodies, and nonviral gene medicines. However, application of these potential therapeutics for central nervous system (CNS) disorders has been a challenging task, as most of them do not cross the blood–brain barrier (BBB). This is due to the fact that the BBB is a physical barrier formed by the tight junctions between endothelial cells, the presence of astrocytic end-feet, and a physiological barrier endowed with efficient efflux pumps, which prevent most molecules and notably high-molecular-weight molecules from passing through.

During recent years, different strategies have been developed to deliver molecules across the BBB.<sup>1</sup> Particularly promising are nanotechnology-based delivery systems, such as liposomes, dendrimers, and nanoparticles (NPs) made of various polymers, eg, poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and poly(butyl cyanoacrylate) (PBCA). PLGA-based nano/microparticles have been widely explored as carriers for controlled

Correspondence: Mayank Chaturvedi; Leszek Kaczmarek  
Laboratory of Neurobiology, Nencki Institute, 3 Pasteur Street, Warsaw 02-093, Poland  
Email m.chaturvedi@nencki.gov.pl; l.kaczmarek@nencki.gov.pl

delivery of macromolecular therapeutics.<sup>2</sup> PLGA-based NPs are advantageous, due to their biodegradable and biocompatible nature; moreover, they have been approved by the US Food and Drug Administration for human use.<sup>3</sup> Furthermore, NP delivery across the BBB can be facilitated by coating with surfactants, such as polysorbate 80 (Ps80; Tween 80).<sup>4</sup>

The objective of this study was to develop PLGA NPs loaded with a 28 kDa protein: tissue inhibitor of matrix metalloproteinases 1 (TIMP-1). TIMP-1 is an endogenous inhibitor of matrix metalloproteinases (MMPs), which are enzymes capable of cleaving extracellular matrix, as well as membrane and secreted proteins, under physiological and pathological conditions. For instance, it has been shown that MMP-9 is elevated in various CNS disorders, including Alzheimer's disease,<sup>5</sup> multiple sclerosis,<sup>6</sup> brain tumors,<sup>7</sup> Guillain-Barré syndrome,<sup>8</sup> spinal cord injury,<sup>9</sup> ischemic stroke,<sup>10</sup> epilepsy,<sup>11</sup> and excitotoxic/neuroinflammatory processes.<sup>12</sup> Moreover, MMP-9 inhibition by its chemical inhibitors has displayed beneficial effects.<sup>13</sup> Therefore, it is suggested that MMP-9 inhibition can be a potential therapeutic target.<sup>14,15</sup> At present, available MMP inhibitors are poorly specific and have a wide range of targets, and development of specific inhibitors is always a challenging task. Moreover, exogenous inhibitors may have unanticipated side effects. Therefore, TIMP-1, the endogenous inhibitor of MMPs with particularly strong affinity for MMP-9, holds great therapeutic hope. However, like most proteins, it does not cross the BBB. Furthermore, TIMP-1 in its native form has a short half-life and low bioavailability.<sup>16</sup> Recently, there have been attempts to increase the bioavailability of TIMP-1 by polyethylene glycolation (PEGylation).<sup>17</sup> Hence, we decided to formulate TIMP-1 in a PLGA-based nanoparticulate formulation to increase its bioavailability and enhance its brain delivery.

Herein, we show formulation optimization of TIMP-1-loaded PLGA NPs and coating with a surfactant (Ps80) to enhance their BBB penetration. These NPs were analyzed using various approaches, such as scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS), polydispersity index (PDI), zeta potential, protein loading, and drug release. For BBB-penetration studies of NPs, we used *in vitro* BBB models based on monolayers of an endothelial cell line (rat brain endothelial 4 [RBE4]) and of primary rat brain capillary endothelial cells (RBCEC) to study TIMP-1 NP binding/uptake, toxicity, and passage across the BBB. Finally, we tested them *in vivo*, by injecting them intravenously via the tail vein in mice.

## Materials and methods

### Materials

For formulation of polymeric NPs, we used PLGA (molecular weight 45,000–75,000), copolymer ratio 50:50, polyvinyl alcohol (PVA; average molecular weight 30,000–70,000), bovine serum albumin (BSA), Coumarin 6 dye, dimethyl tartaric acid (DMT), dichloromethane (DCM), and Ps80 (Tween 80), all purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

### TIMP-1 expression and characterization

We expressed recombinant mouse TIMP-1 as described in our earlier study.<sup>18</sup> In brief, the *TIMP1* gene was cloned along with Histag and expressed in the human embryonic kidney 293 T-cell line. Purification was done using Talon affinity chromatography (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) and to remove imidazole from isolated protein, dialysis was performed at 4°C against 10 mM phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.5. The expressed protein was characterized by Western blot, reverse zymography, and gelatinase assay. Purified TIMP-1 was formulated in PLGA NPs.

### Formulation

We started by optimizing PLGA NPs loaded with the candidate protein (TIMP-1). For this purpose, different formulations were prepared considering PLGA concentration as a variable, and characterized for various physical parameters. Based on encapsulation efficiency, *in vitro* release, mean diameter, PDI, and zeta potential, the formulation was chosen for further *in vitro* studies.

The NPs were synthesized by multiple emulsion and solvent evaporation, modified from Reddy and Labhasetwar.<sup>19</sup> In brief, five formulations with 1%–5% PLGA (50:50), ie, 10, 20, 30, 40, and 50 mg/mL (PLGA1, PLGA2, PLGA3, PLGA4, and PLGA5, respectively), were dissolved in 5 mL of DCM along with 4 mg of DMT. Separately, 500 µg of TIMP-1 and 1 mg of BSA in 500 µL of water were dissolved. The protein was emulsified using a microtip probe sonicator for 2 minutes in an ice bath at 55 W of energy output by dissolving DCM containing PLGA to make a primary emulsion, which was further emulsified in 20 mL of 1% PVA solution in water. In the formulation, BSA was used to stabilize the encapsulated TIMP-1 from interfacial inactivation and DMT was used to facilitate the release of TIMP-1 from NPs. Also, it has been shown that DMT might exert a stabilizing effect by steric inhibition of the interactions between adjacent NPs. In the second aqueous phase we used PVA, although it has been shown that it is difficult to remove PVA after the purification procedures,



which eventually affect the physical properties and cellular uptake of NPs, as discussed by Panyam et al.<sup>20</sup> As mentioned earlier, we adapted the formulation procedure from Reddy and Labhasetwar,<sup>19</sup> who showed high entrapment efficiency and sustained release (up to 60 days) of a 32 kDa protein superoxide dismutase, and thus we followed their study, instead of using any other surfactant. This multiple emulsion was stirred overnight to evaporate DCM, and NPs were collected by centrifugation at  $10,000 \times g$  for 20 minutes at  $4^\circ\text{C}$ . The NPs were washed thrice using water, and supernatant was collected for protein-loading analysis.

We formulated control PLGA NPs carrying BSA as model protein and also Coumarin 6 dye-loaded NPs (which were used for in vitro BBB-penetration studies). The control NPs were made without TIMP-1 with the same procedure including BSA, and dye-loaded NPs were formulated using  $50 \mu\text{g}$  of Coumarin 6 dye in 5 mL DCM. The particles were washed three times to remove PVA and then lyophilized (VirTis; SP Scientific, Warminster, PA, USA) for 48 hours to obtain a dry pellet. The NPs were analyzed by using SEM, TEM, DLS, PDI, zeta potential, protein loading, and drug release.

## Characterization of nanoparticles

### Scanning electron microscopy

For studying NP size and surface morphology, an S520 SEM (Hitachi, Tokyo, Japan) was used. A drop of concentrated aqueous suspension (20 mg freeze-dried TIMP-1 PLGA NPs in 10 mL double-distilled water) was spread over a slab and dried under vacuum. The sample was shadowed in a cathodic evaporator with a 20 nm-thick gold layer. The diameter and surface morphology of NPs in each field was observed.

### Transmission electron microscopy

A JEM 1400 (JEOL, Tokyo, Japan) equipped with a high-resolution digital camera (charge-coupled device Morada; Olympus, Tokyo, Japan) was used for particle-size evaluation. A drop of the sample solution was placed onto a 400-mesh copper grid coated with carbon. About 1 minute after the deposit, the grid was tapped with filter paper to remove the surface water. The samples were air-dried before measurement.

### Size distribution, PDI, and surface charge

Mean particle size, size distribution, PDI, and zeta potential of NPs were determined by photon correlation spectroscopy using a Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, UK) at a fixed angle of  $90^\circ$  and a temperature of  $27^\circ\text{C}$  by measuring

electrophoretic mobility of NPs in a U-type tube. Before measurements, the TIMP-1 PLGA NPs were uniformly dispersed in double-distilled water. A suitably diluted aqueous dispersion of NPs was mounted in the instrument, and mean particle size distribution, PDI, and zeta potential were calculated. Each reported value is the average of six measurements.

### Encapsulation, yield and in vitro protein-release kinetics

For encapsulation studies, we used an indirect method, as described previously.<sup>19</sup> To determine percentage encapsulation efficiency of protein, NP yield, and actual protein loading, the following formulas were used:

% Encapsulation efficiency

$$= \frac{\text{Amount of protein in formulation}}{\text{Amount of protein used for formulation}} \times 100$$

% NP yield

$$= \frac{\text{Weight of NPs}}{\text{Total weight of polymer and protein added}} \times 100$$

% Actual protein loading

$$= \frac{\text{Amount of protein in formulation}}{\text{Weight of NPs}} \times 100$$

For both studies, ie, encapsulation studies and in vitro release assay, we used the Bradford method for protein-concentration determination. In brief, the NPs were suspended in PBS (pH 7.4). Vials containing 10 mg of loaded PLGA NPs dispersed in 5 mL of PBS were incubated at  $37^\circ\text{C}$  on a constant shaking mixer. One vial was withdrawn at each time point (days 1, 2, 3, 5, and 7); the contents of the vial were centrifuged at 8,000 rpm for 10 minutes, and the supernatant containing released BSA/TIMP-1 was quantitated by the Bradford method. The Bradford reagent was obtained from Sigma-Aldrich; the procedure was followed according to the manufacturer's instructions. For protein-stability studies, the same supernatant was used.

### Protein stability

For determining protein stability inside NPs, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot were performed. Based on single bands for TIMP-1, it was assumed that the released protein was stable after release from NPs. For this, the supernatant collected at different time points was run in 12% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride membrane. The

membrane was blocked overnight at 4°C in 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, and 0.02% Ps20 (TBST) containing 10% milk followed by washing three times in TBST for 10 minutes each. For detection, the membrane was incubated overnight in 1:200 dilution of mouse anti-TIMP-1 antibody (AF980; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), and rabbit polyclonal 6× Histag antibody (ab9108; Abcam, Cambridge, UK) in TBST at 4°C. The membrane was washed three times with TBST and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, and the bands were visualized using ECL Plus reagent (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Sweden) substrate solution. Recombinant mouse TIMP-1 with a 6× Histag (WBC022; R&D Systems) was used as a standard for both Western blots. The blots shown in this study are representative replicates selected from at least three independent experiments.

## Evaluation of nanoparticles

The optimized formulation (PLGA3) was chosen based on its encapsulation efficiency and release kinetics for the rest of the *in vitro* studies, ie, for toxicity, binding/uptake, and

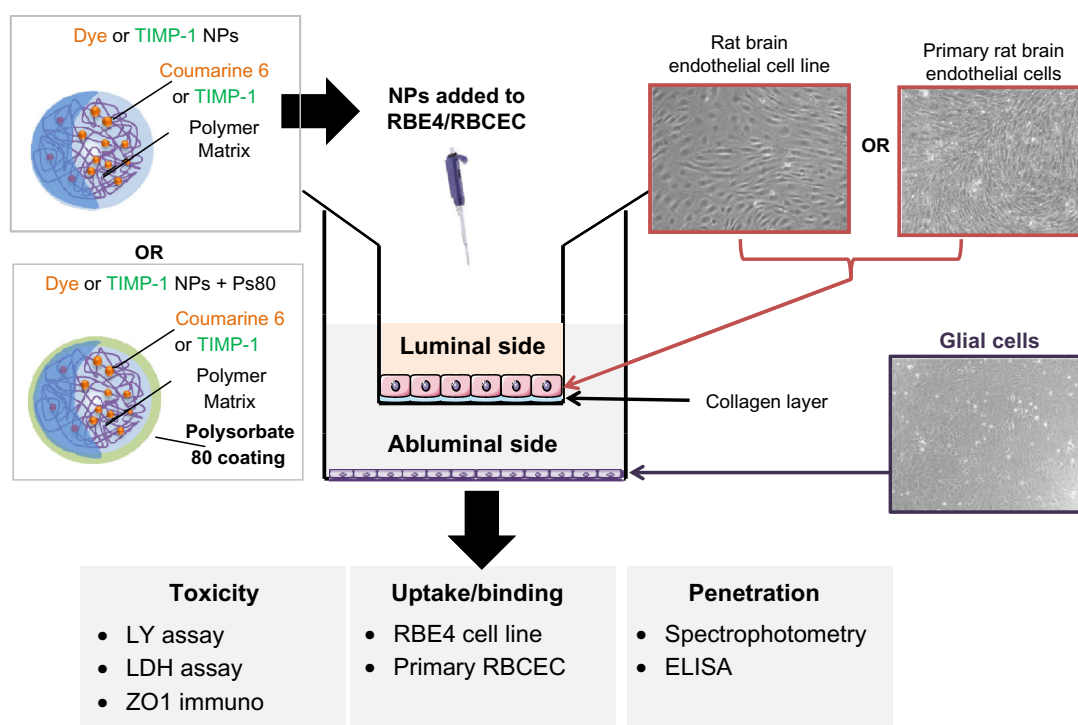
penetration in RBE4 and primary RBCEC *in vitro* BBB models (schematic representation in Figure 1), and for *in vivo* studies following NP tail-vein injection.

## Polysorbate 80 coating of nanoparticles

Before all *in vitro* and *in vivo* experiments, the optimized NPs were coated with Ps80 to improve their BBB delivery. We evaluated BBB penetration of uncoated NPs (ie, TIMP-1 NPs or Dye NPs) with surfactant-coated NPs (TIMP-1 NPs + Ps80 or Dye NPs + Ps80). For Ps80 coating, the NPs were incubated with 1% (w/v) solution of Ps80 for 45 minutes immediately before *in vitro* or *in vivo* experiments, as described by Gelperina et al.<sup>4</sup> For initial studies, we used Coumarin 6 dye-loaded NPs, as the dye is easier to detect, and for advanced studies we used TIMP-1 NPs.

## Cell-culture preparation

For preliminary experiments, we used RBE4 cell line monoculture, and for advanced experiments we used RBCEC co-cultured with astrocytes.



**Figure 1** Schematic illustration of experimental plan for *in vitro* evaluation of NPs: The Coumarin 6 dye-loaded NPs (Dye NPs) and TIMP-1 loaded NPs (TIMP-1 NPs) without Ps80 coating and with Ps80 coating (Dye NPs + Ps80 and TIMP-1 NPs + Ps80) were evaluated *in vitro*. The NPs were evaluated using a rat brain endothelial cell line (RBE4) and primary rat brain capillary endothelial cells (RBCEC) co-cultured with glial cells. The NPs were evaluated for toxicity, uptake/binding and penetration. For toxicity studies, LDH assay, LY assay, and ZO1 (tight junction marker) immunocytochemistry were performed. The uptake and binding studies were done on RBCEC. For penetration studies, fluorescence spectrophotometry was used for dye-loaded NPs and ELISA for TIMP-1 NPs.

**Abbreviations:** NPs, nanoparticles; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; Ps80, polysorbate 80; LDH, lactate dehydrogenase; LY, Lucifer yellow; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; immuno, immunocytochemistry; RBE4, rat brain endothelial cell line; RBCEC, rat brain capillary endothelial cells; ZO1, zona occludens 1.

### Rat brain endothelial cell line monoculture

RBE4 cells are an immortalized cell line derived from RBE cells.<sup>21</sup> RBE4 cells were seeded on rat tail collagen type I (3  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; BD) on Millipore filters (polyethylene twelve-well, pore size 1.0  $\mu\text{m}$ ; Millipore, Billerica, MA, USA) at a density of  $9 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$  and maintained in Eagle's minimum essential medium -alpha with GlutaMax™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and Ham's F10 with GlutaMax (Life Technologies) both at 45% v/v supplemented with 10% fetal calf serum (CliniSciences, Nanterre, France), basic fibroblast growth factor (bFGF; 1 ng/mL; Life Technologies) and Geneticin® (300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Life Technologies). Under these conditions, confluent monolayers were established within 3 days.

### Primary rat brain endothelial cells co-cultured with astrocytes

Primary cultures of astrocytes were prepared from newborn rat cerebral cortex. After removal of the meninges, the brain tissue was forced gently through a 70  $\mu\text{m}$  nylon sieve. Dissociated glial cells were seeded into cell culture flasks and the culture media (Dulbecco's Modified Eagle's Medium [DMEM] supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units/mL antibiotic penicillin, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin) was replaced twice a week. After 1 week of proliferation, the glial cells were gently shaken for 24 hours to remove the microglial cells. Three weeks after seeding, astrocytes were passaged by treatment with trypsin and frozen in liquid nitrogen. Vials of astrocytes were defrosted 5 days before the establishment of the RBCEC co-culture at a density of  $80 \times 10^3$  cells per well of a twelve-well plate.

RBCEC culture was adapted from previously described techniques.<sup>22-24</sup> Briefly, the endothelial cells were seeded on type IV collagen and fibronectin (both 0.5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; BD) on Millipore filters (polyethylene twelve-well, pore size 1.0  $\mu\text{m}$ ) at a density of  $1.6 \times 10^5$  cells/ $\text{cm}^2$  and maintained in DMEM/Ham's F12 supplemented with 20% bovine platelet-poor plasma-derived serum named Endothelial Cell Media (ECM; CliniSciences, Nanterre, France), composed of bFGF, (2 ng/mL), heparin (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Life Technologies), gentamicin (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Life Technologies) and HEPES (4-[2-hydroxyethyl]-1-piperazineethanesulfonic acid; 2.5 mM; Life Technologies). Then, the filters were transferred into the wells containing the astrocytes and the culture medium was replaced with ECM supplemented with hydrocortisone at 500 nM for differentiation and expression of junction-related proteins. Under these conditions, *in vitro* models were established within 3 days.

### In vitro investigations

The NPs with and without Ps80 were assessed for three *in vitro* evaluation parameters: first, toxicity by Lucifer yellow (LY) assay, lactate dehydrogenase (LDH) assay, and immunocytochemistry for ZO1 tight junction markers; second, uptake/binding studies by confocal microscopy of RBCEC; and third, BBB-penetration studies using RBE4 and RBCEC by determining the passage of NPs with and without Ps80 coating across the cell monolayers using spectrophotometry for Dye NPs and TIMP-1 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for TIMP-1 NPs.

### Toxicity studies

To determine the toxicity of NPs on the BBB, we performed LY and LDH assays.

Lucifer yellow assay: LY (LY CH lithium salt; Sigma-Aldrich) is a small molecule known not to pass the BBB. LY was used as an integrity control of the barrier to ensure preservation of the barrier during the experiments and absence of toxicity of the compound that is co-incubated with LY. The inserts containing the RBCEC monolayer were gently washed and transferred to clean twelve-well plates. Both the upper and lower chambers were washed with prewarmed DMEM/F12 without phenol red. LY was incubated in the upper chamber (apical compartment) of the culture system in contact with endothelial cells for 60 minutes at 37°C. After this time, the medium of the lower chamber was collected, and fluorescence was quantified by fluorometric analysis with a Beckman DTX 800 Multimode Detector (Beckman Coulter, Inc., Pasadena, CA, USA) with excitation at 430/485 nm and emission at 535 nm. During each 60-minute experiment, the average cleared volume was plotted versus time, and the slope estimated by linear regression analysis. The slope of the clearance curve for the collagen IV fibronectin precoated control filter was denoted PSf, and the slope of the clearance curve for the culture was denoted PSt. The PS value for the endothelial monolayer (PSe) was calculated from:

$$1/PSe = 1/PSt - 1/PSf$$

The PSe values were divided by the area of the porous membrane (1.1  $\text{cm}^2$  for plates with 12-well Millipore inserts) to establish the permeability coefficient (Pe;  $10^{-3}$  cm/minute). The results are presented in percentages compared to the control cells alone, expressed as 100%.

Lactate dehydrogenase assay: Cytotoxicity was assessed using the LDH Cytotoxicity Assay Kit II (Abcam). LDH is an enzyme that converts pyruvic acid to lactic acid, and it

can be readily detected when cell membranes are no longer intact. For this assay, RBE4 cells were treated with different concentrations of Dye NPs (20, 2, and 0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and conditioned culture media was collected from the upper compartment at different time points (30 minutes and 120 minutes). For RBCEC, the highest concentration of NPs (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was used, and medium was collected after 60 minutes. The activity of LDH in the conditioned cell-culture medium was measured in triplicate with a colorimetric assay at 450 nm wavelength.

**Immunocytochemistry for ZO1:** To visualize tight junction morphology, immunocytochemistry was performed using ZO1. The NPs were incubated with RBCEC in 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration, with or without Ps80 coating for 60 minutes. Cells were fixed by removing the medium from the cultures, washing the cells twice with PBS, and further incubating in 4% paraformaldehyde for 10 minutes and washing three times with PBS followed by mounting. The cells were permeabilized for 10 minutes with TBST followed by washing with PBS twice. Blocking was done using 3% BSA for 30 minutes followed by washing once with PBS again. The cells were then incubated with ZO1 and TIMP-1 (1:100) antibodies in a solution of 1% BSA for 1 hour at room temperature. After two washes, cells were incubated with secondary antibodies – Alexa 488, 594 (1:500) and Hoechst (1:1000) – for 30 minutes at room temperature, followed by three washes with PBS. Finally, cells were mounted with Vectashield® mounting media (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and visualized under confocal microscopy (LSM 780; Carl Zeiss, Jena, Germany) equipped with a 63 $\times$  oil-immersion objective.

#### Nanoparticle uptake/binding

For NP-uptake/binding studies, we first tested dye-loaded NPs on the RBE4 cells. For this, NPs without Ps80 coating (Dye NPs) and with Ps80 coating (Dye NPs + Ps80) were incubated in different concentrations of 40, 4 and 0.4  $\mu\text{g}/\text{well}$ . The cells were incubated at 37°C for 120 minutes followed by cutting of the insert membranes, fixing the cells, and mounting on slides.

**Fluorescence microscopy and intensity analysis:** Fluorescence photomicrographs were taken using a DMI 6000 B microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) using Leica Application Suite Advanced Fluorescence software. Pictures were taken with a 2.5 $\times$  optical zoom lens objective using an L5 blue excitation filter (450 $\pm$ 64 nm) with a pixel resolution of 1,392 $\times$ 1,024.

#### Penetration of nanoparticles across cell monolayers

To evaluate NP penetration across the RBE4 or RBCEC cell monolayers, the Dye NPs and Dye NPs + Ps80 were incubated for 30/120 minutes at 37°C in different concentrations (20, 2, and 0.2  $\mu\text{g}/\text{well}$ ). To estimate BBB penetration we determined the amount of NPs in the lower compartment by fluorescence spectrophotometry. For TIMP-1 NPs and TIMP-1 NPs + Ps80, a TIMP-1 ELISA was used.

**Fluorescence spectrophotometric assay:** In the group incubated with Dye NPs or Dye NPs + Ps80, fluorescence spectrophotometry was done. For assessing the Coumarin 6 amount in the lower compartment, the medium was collected from the lower compartment from each group, and fluorescence was quantified by a microplate reader (444/505 nm). The assay was done using the SpectraMax® M5e (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Each experiment was repeated at least three times.

**TIMP-1 ELISA:** For determining the penetration of NPs across cell monolayers, we determined the amount of TIMP-1 in the lower compartment. For this, we used a TIMP-1 Mouse ELISA Kit (Abcam). All reagents and samples were prepared as instructed by the supplier. The medium from the lower compartment of the cultures was collected after 30 minutes for the RBE4 cell line and 60 minutes for RBCEC. The NPs were further incubated overnight at 37°C to release the protein. The next day, protein release was determined by a TIMP-1 ELISA. The method and dilution of samples were followed as per the manufacturer's instruction, and the plate was read at 450 nm in an ELISA 96-well plate reader.

#### In vivo evaluation of nanoparticles for BBB penetration

For in vivo evaluation of BBB penetration, TIMP-1 NPs + Ps80 were intravenously injected in mice, and immunocytochemistry for Histag was done to detect BBB penetration of TIMP-1 NPs + Ps80.

#### Animals

All the experiments with animals were carried out according to guidelines established by the Animal Ethical Committee of the Nencki Institute of Experimental Biology, based on national and EU laws. Special care was taken to minimize suffering and the number of animals used. For in vivo studies, we used twelve mice. The animals were kept in the laboratory animal facility, with free access to food and water, with a 12-hour light/dark cycle.

### Intravenous injection and perfusion

For intravenous administration, TIMP-1 NPs + Ps80 were suspended in 500  $\mu$ L of PBS (pH 7.4) to obtain the required concentration of TIMP-1. The intravenous injections were done using Bioseb<sup>®</sup> MTI Mouse Tail Illuminator (Bioseb, Vitrolles, France). Each animal was given intravenously a preparation containing 100  $\mu$ g of TIMP-1 or PBS (pH 7.4) as vehicle. TIMP-1 loaded NPs were injected through the tail vein of mice (n=4). Three hours after injection, mice were injected with pentobarbital (200 mg/kg, intraperitoneally) and perfused transcardially, first with PBS and then with 4% paraformaldehyde. Brains were isolated, and tissue sectioning was done by cryoembedding the brain tissue in tissue freezing medium, (Tissue-Tek<sup>®</sup> Sacura, the Netherlands) and 300  $\mu$ m-thick slices were cut.

### Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, slices were mounted on slides and blocked for 2 hours in 5% normal donkey serum in PBST. After 2 hours, slices were incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal anti-6 $\times$  Histag antibody (1:500) (Abcam). Subsequently, slices were washed with PBST for 15 minutes at room temperature. After washing, samples were incubated with a fluorescent Alexa 555 secondary antibody (1:500; Life Technologies) for 2 hours at room temperature and washed again with PBST 4 times for 10 min. Finally, slices were mounted with Vectashield mounting media, counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) and visualized under a confocal microscope (TCS SP5; Leica Microsystems) equipped with a 40 $\times$  oil-immersion objective using the 555 nm Argon laser (for excitation of Alexa 555) at a pixel resolution of 1,024 $\times$ 1,024 and 4.5 optical zoom. The Z-stacks of optical slices were acquired in 0.4  $\mu$ m steps. The compiled Z-stack was analyzed using ImageJ software version 1.46r (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

### Statistical analysis

The values for evaluation of physicochemical parameters in Tables 1 and 2 are means  $\pm$  standard deviation, where n=3. The rest of the data in graphs are represented as

means  $\pm$  standard error of mean, and statistical comparisons were carried out between the groups using two sample *t*-test assuming unequal variances. A significance value of  $P < 0.05$  was accepted and considered as relevant.

## Results

### Formulation optimization and characterization

We tested five different concentrations of 50:50 PLGA as a process variable (1% w/v to 5% w/v), keeping the remaining parameters constant. The formulations were characterized for various physical parameters: encapsulation efficiency, mean diameter, PDI, and zeta potential (Figure 2). On the basis of these parameters, the optimal formulation was chosen for the rest of the in vitro and in vivo experiments.

### Particle morphology, size, size distribution, PDI, and zeta potential

The particles were mostly spherical in shape, and mean size of TIMP-1 NPs was 81.1 $\pm$ 28.6 nm for 1% w/v (for PLGA1), which increased to 432.6 $\pm$ 46.2 nm for 5% w/v (for PLGA5) (see Table 1). The representative SEM and TEM for PLGA3 are shown in Figure 3A and B, respectively. The mean hydrodynamic diameter of NPs was much higher when measured by DLS, eg, PLGA3 NPs had a mean hydrodynamic diameter of 330 nm with a PDI of 0.159 (Figure 3C). This discrepancy in size between the SEM and DLS measurements may be due to hydration of the multilayered PVA that remained associated with the NPs at the interface despite repeated washing.<sup>19,25</sup> The PDI and zeta potential were found to increase with the increase in PLGA concentration (Table 1). The results are in consensus with results published by Dey et al.<sup>26</sup> The zeta potential of TIMP-1-NP PLGA3 formulation was -19.8 $\pm$ 0.8 mV.

### Encapsulation efficiency, nanoparticle yield, and actual protein loading

Based on the results of various formulations, increasing the amount of polymer (1%–3% w/v) increased the

**Table 1** Physicochemical parameters of the TIMP-1-loaded PLGA nanoparticles with different polymer concentrations

Formulation	PLGA concentration (mg/mL)	Encapsulation efficiency (%)	Mean diameter (nm)	Polydispersity index (PDI)	Zeta potential (mV)
PLGA1	10	61.81 $\pm$ 2.3	81.1 $\pm$ 28.6	0.21 $\pm$ 0.04	-26.4 $\pm$ 1.6
PLGA2	20	71.43 $\pm$ 1.6	112.0 $\pm$ 13.2	0.29 $\pm$ 0.02	-24.0 $\pm$ 3.5
PLGA3	30	83.42 $\pm$ 2.3	150.9 $\pm$ 21.5	0.41 $\pm$ 0.01	-19.8 $\pm$ 0.8
PLGA4	40	81.63 $\pm$ 5.6	280.8 $\pm$ 73.3	0.47 $\pm$ 0.06	-16.7 $\pm$ 0.9
PLGA5	50	79.74 $\pm$ 5.9	432.6 $\pm$ 46.2	0.56 $\pm$ 0.12	-13.2 $\pm$ 1.5

**Notes:** Values represent means  $\pm$  standard deviation, n=3. All of the other formulation parameters were fixed.

**Abbreviations:** TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid).

**Table 2** Physicochemical parameters of PLGA3 formulation

Parameter	Measurement
Mean hydrodynamic diameter	330 nm
Zeta potential	-19.8±0.8 mV
Polydispersity index	0.41±0.01
% Encapsulation efficiency	83.42±2.3
% Nanoparticle yield	65.43±3.4
% Actual protein loading	1.07±0.5

**Note:** Values represent mean ± standard deviation, n = 3.

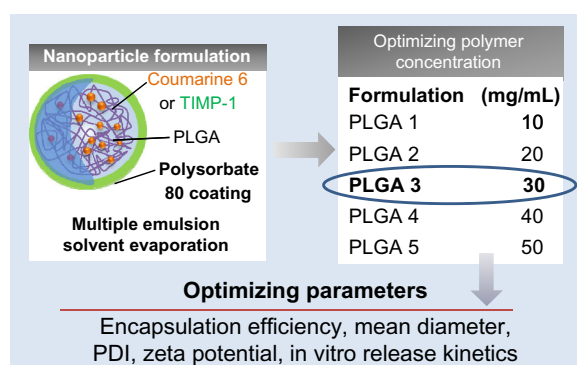
**Abbreviation:** PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid).

encapsulation efficiency, but further increasing the polymer concentration did not further increase encapsulation (Table 1).

The PLGA3 formulation (3% w/v) had maximum encapsulation efficiency, 83.42%±2.3%, ie, 83.42% of the added protein was entrapped into NPs. Percentage NP yield and percentage actual protein loading were calculated as described earlier by the formulas, and were found to be 65.43%±2.3% and 1.07%±0.5% respectively, for the PLGA3 formulation (Table 2). As the results show, the PLGA3 formulation with 30 mg/mL polymer concentration had the highest encapsulation efficiency.

### In vitro release profile and protein stability

The in vitro release profiles of different formulations were assessed (Table 3) to identify the best release kinetics in order to select an optimal formulation. The release kinetics of all formulations demonstrated a similar sustained release, showing an initial burst followed by diffusion. The release of TIMP-1 from NPs was sustained; in particular, PLGA3 NPs had 21.0%±0.8% of release in 24 hours, and 72.0%±2.8% in 7 days (Figure 4). SDS-PAGE and Western blots were performed for protein stability, and we observed a single band for TIMP-1, which suggested that the released protein



**Figure 2** Formulation optimization.

**Abbreviations:** TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid); PDI, polydispersity index.

was stable after release from NPs. The representative blot for PLGA3 NPs is shown in the inset in Figure 4. The control formulations, using BSA as model protein, demonstrated almost identical physical properties as TIMP-1 NPs. Hence, here we show the characterization data only from TIMP-1-loaded NPs.

From the characterization data obtained, the PLGA3 formulation with 3% w/v polymer (Figure 2) was selected as optimal for the in vitro and in vivo experiments, considering encapsulation efficiency and in vitro release profile.

### In vitro evaluation

In vitro studies were done on the RBE4 cell line and RBCEC for toxicity, uptake/binding and, BBB-penetration studies.

### Toxicity studies

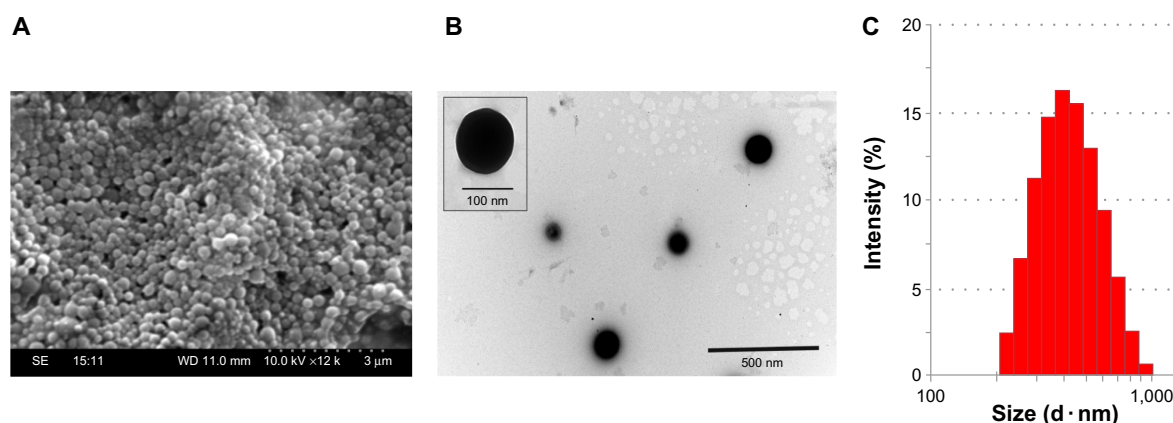
For studying toxicity of NPs on endothelial cells, we used an LY assay and an LDH assay. The LY assay on RBCEC showed that in neither of the cell inserts treated with Dye NPs/TIMP-1 NPs or Dye NPs + Ps80/TIMP-1 NPs + Ps80 was there significant increase of endothelial permeability due to toxicity (Figure 5A). Moreover, the LDH assay also showed that none of these NPs were toxic to the RBCEC (Figure 5B). As a complementary approach, we assessed the effects of NPs on the expression and distribution of the tight junction marker ZO1. The immunocytochemistry from RBCEC incubated with TIMP-1 NPs + Ps80 and TIMP-1 NPs showed that the NPs caused no significant change in ZO1 distribution (Figure 5C).

### Uptake/binding of nanoparticles

In the NP-uptake/binding studies, we tested Dye NPs and Dye NPs + Ps80. The results showed that NPs that were coated with Ps80 had less binding to NPs compared to uncoated NPs on the RBE4 cell line (Figure 6). The binding of NPs was concentration-dependent, ie, both NP types at higher concentration bound more to the cells, and this value decreased as the concentration decreased.

### In vitro BBB penetration

For penetration studies, the Dye NPs/Dye NPs + Ps80 were incubated in different concentrations with the RBE4 cell line, and after 60 minutes the amount of dye in the lower compartment was determined and compared to the initial amount of dye incubated. The results indicated (Figure 7A) that the Dye NPs (without Ps80 coating) did not penetrate across the monolayer. On the other hand, Dye NPs + Ps80 crossed the cell monolayer, and, unexpectedly the Dye NPs + Ps80



**Figure 3 (A–C)** Characterization results of PLGA3 NPs loaded with TIMP-1. **(A)** Representative scanning electron micrograph of TIMP-1-loaded PLGA NPs. **(B)** Representative transmission electron micrograph of TIMP-1-loaded PLGA NPs; scale bar 500 nm. **(C)** Particle-size analysis by dynamic light scattering. **Abbreviations:** NPs, nanoparticles; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid).

at lower concentration (4.0  $\mu\text{g/mL}$ ) had higher penetration,  $23.99\% \pm 2.3\%$ , than at the higher concentration (40.0  $\mu\text{g/mL}$ ), which was characterized by  $3.34\% \pm 0.7\%$  penetration. When we further lowered the Dye NPs + Ps80 concentration (down to 0.4  $\mu\text{g/mL}$ ), we observed no penetration. When the same experiment was done on the RBCEC with Dye NPs and Dye NPs + Ps80 with the 4  $\mu\text{g/mL}$  concentration, Dye NPs + Ps80 showed  $14.32\% \pm 2.31\%$  penetration, while Dye NPs showed no penetration.

For assaying penetration of TIMP-1 NPs and TIMP-1 NPs + Ps80, we used a TIMP-1 ELISA. NPs (4  $\mu\text{g/mL}$ ) were incubated on the RBE4 cell line monolayer, and samples of the lower-compartment media were taken at 30 minutes and 120 minutes. TIMP-1 content was compared to amounts of TIMP-1 in NPs based on actual protein loading in NPs. On the RBE4 cell line (Figure 7B), TIMP-1 NPs + Ps80 penetration across the cell monolayer was  $13.3\% \pm 1.1\%$  and  $21.6\% \pm 1.7\%$  after 30 and 120 minutes, respectively. Uncoated TIMP-1 NP penetration was only  $1.10\% \pm 0.3\%$ . On RBCEC, after 60 minutes,  $11.21\% \pm 1.35\%$  of TIMP-1

was detected in the lower compartment in cell inserts treated with TIMP-1 NPs + Ps80. TIMP-1 NPs and TIMP-1 (native protein alone) showed no permeability across the endothelial cell monolayer. The *in vitro* experiments provide strong evidence that with the help of the Ps80-coated NPs, protein could successfully traverse the BBB.

### In vivo BBB penetration

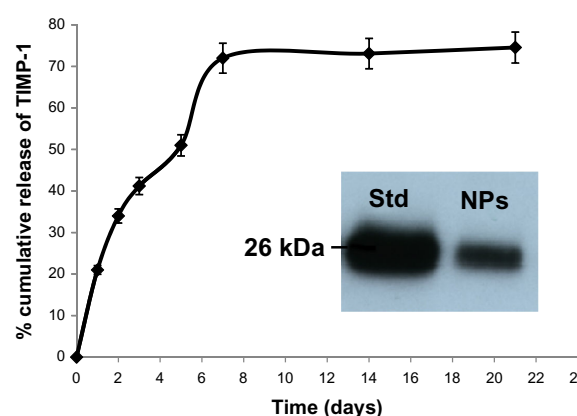
For *in vivo* evaluation of NP passage across the BBB and/or accumulation in the nervous tissue, we injected the TIMP-1 NPs + Ps80 into the tail vein and cardiually perfused the mice 3 hours later. The immunohistochemistry was done using a 6 $\times$  Histag antibody, to recognize solely the recombinant TIMP-1 protein. The results showed that TIMP-1 NPs + Ps80

**Table 3** In vitro release profile of TIMP-1 loaded PLGA nanoparticles with different polymer concentrations

Formulation	Day				
	1	2	3	5	7
PLGA1	14.7 $\pm$ 0.8	19.8 $\pm$ 0.62	22.5 $\pm$ 0.3	25.2 $\pm$ 0.3	25.3 $\pm$ 0.8
PLGA2	17.2 $\pm$ 2.3	23.9 $\pm$ 1.5	34.9 $\pm$ 2.7	56.3 $\pm$ 4.6	65.0 $\pm$ 4.9
PLGA3	21.0 $\pm$ 0.8	34.0 $\pm$ 0.9	41.2 $\pm$ 2.9	51.0 $\pm$ 2.6	72.0 $\pm$ 2.8
PLGA4	19.1 $\pm$ 0.9	22.2 $\pm$ 1.2	37.7 $\pm$ 2.3	62.2 $\pm$ 3.5	63.5 $\pm$ 3.7
PLGA5	18.6 $\pm$ 0.4	25.5 $\pm$ 1.1	31.1 $\pm$ 1.1	40.0 $\pm$ 2.1	41.3 $\pm$ 2.1

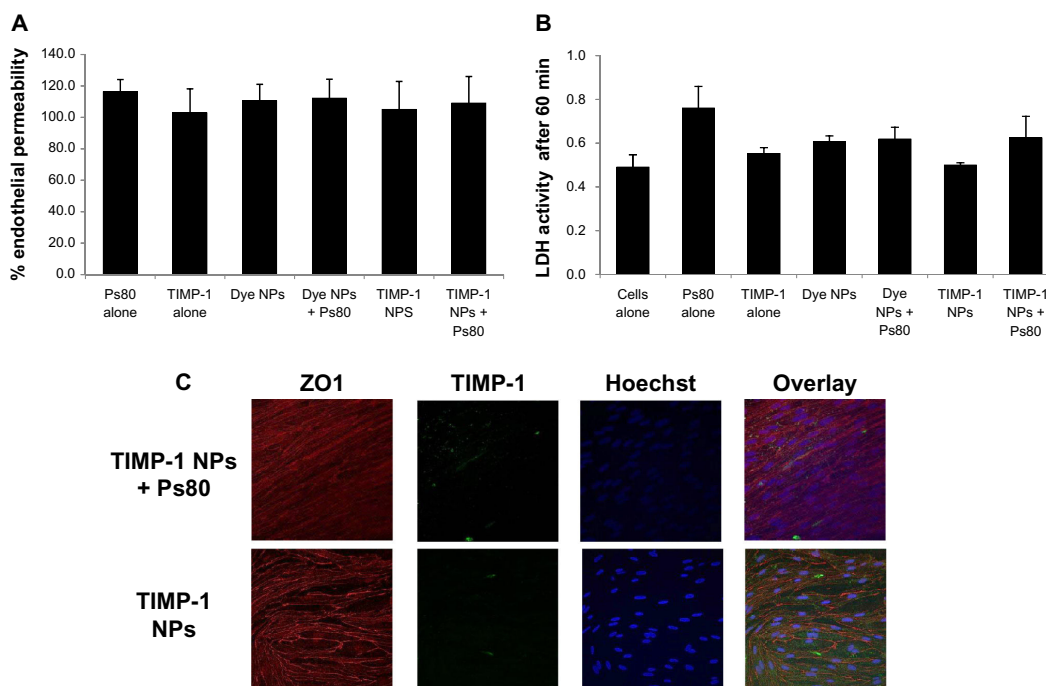
**Note:** Values represent means  $\pm$  standard deviation, n=3.

**Abbreviations:** TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid).



**Figure 4** TIMP-1 release and stability: release of TIMP-1 from optimal PLGA3 NPs under *in vitro* conditions. Inset is representative Western blot of the protein released from the NPs, suggesting that release of TIMP-1 is stable after 48 hours. Data are means  $\pm$  standard error of mean; n=3.

**Abbreviations:** NPs, nanoparticles; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid); Std, standard.



**Figure 5 (A–C)** Toxicity studies. **(A)** LY assay on RBCEC, showing no significant impact of NPs on endothelial cell permeability for LY compared to control (no NPs), indicating that NPs caused no significant opening of the endothelial cell monolayer. Ps80 alone and TIMP-1 alone were used as controls. **(B)** LDH assay, also showing that NPs were not toxic to the RBCEC compared to control. Ps80 alone and TIMP-1 alone were used as controls. **(C)** Representative fluorescence photomicrographs of ZO1 immunocytochemistry on RBCEC treated with TIMP-1 NPs and TIMP-1 NPs + Ps80, indicating no significant difference between the groups.

**Note:** Values represent means ± standard error of mean of three independent experiments.

**Abbreviations:** LY, Lucifer yellow; RBCEC, primary rat brain capillary endothelial cells; NPs, nanoparticles; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; Ps80, polysorbate 80; LDH, lactate dehydrogenase; LY, Lucifer yellow.

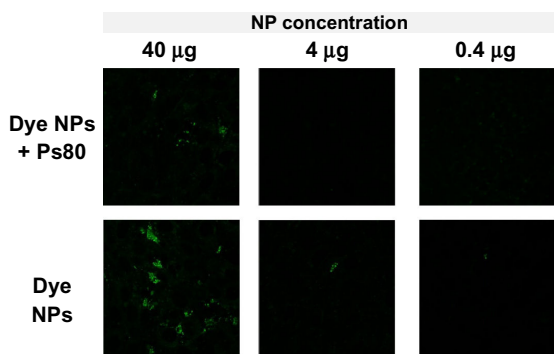
penetrated into the brain, as we found Histag signal in the brain sections (Figure 8). As a control, we used PBS as vehicle, and no signal was detected in this group.

## Discussion

Proteins are the most rapidly growing class of pharmaceuticals for which controlled or targeted release is used to

increase specificity, to lower toxicity, and to decrease the risk associated with treatment.<sup>27</sup> The objective of this study was to develop protein-loaded PLGA NPs for brain delivery of a protein. The protein of interest in our study was TIMP-1, an inhibitor of MMP-9, a potential therapeutic target for various disorders (see earlier). However, native TIMP-1 has low bioavailability and does not cross the BBB. We assessed its delivery using PLGA NPs coated with Ps80, and we found that such entrapment of TIMP-1 allows for the sustained – over the course of days – protein release and the efficient penetration of TIMP-1 through the BBB, both in vitro and in vivo.

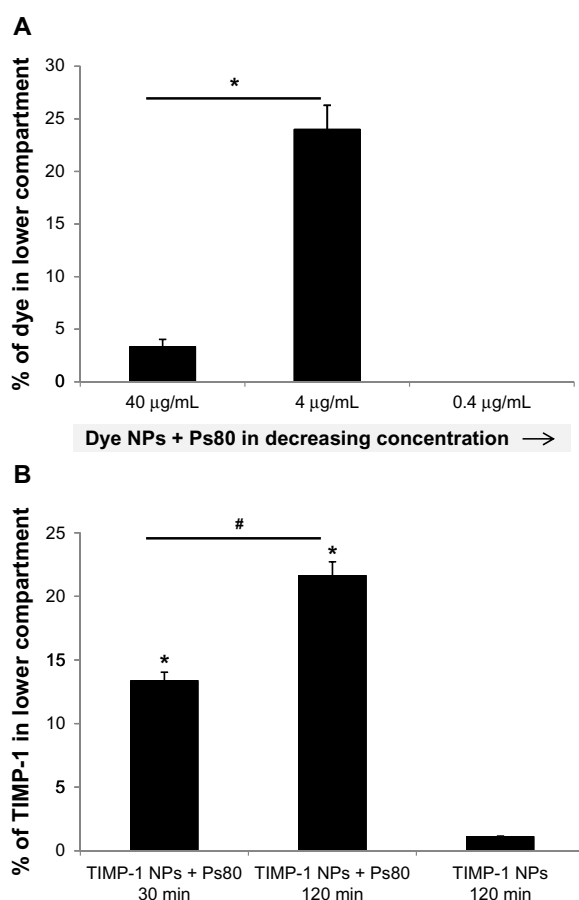
Since every protein is unique and there is no a priori approach for precise prediction of the entrapment levels and possibly protein stabilization in the NPs, we started with formulation optimization for TIMP-1 NPs based on entrapment efficiency, in vitro release, and other parameters. Hence, we made five different formulations considering PLGA concentration as a variable, while other formulation parameters remained constant. The PLGA3 NPs were chosen as optimal based on various physicochemical parameters. In light of the optimization results presented in this study, modification of



**Figure 6** Uptake/binding studies using Coumarin 6 dye-loaded NPs (Dye NPs): representative fluorescence photomicrographs showing that the Dye NPs (without Ps80 coating) have more binding/uptake to RBE4 compared to Dye NPs + Ps80 (with Ps80 coating) and hence we do not see any signal. With decrease in NP concentration, the binding is also decreased.

**Abbreviations:** NPs, nanoparticles; Ps80, polysorbate 80; RBE, rat brain endothelial.





**Figure 7** In vitro blood-brain barrier penetration.

**Notes:** (A) Spectrophotometric assay suggests that Coumarin 6 dye-loaded NPs (Dye NPs) + Ps80 (coated with Ps80) had higher penetration, while uncoated Dye NPs did not cross the cell monolayer. Values represent means  $\pm$  standard error of mean of three independent experiments, where asterisk represents  $P < 0.05$  versus group with Dye NPs + Ps80 (40  $\mu\text{g/mL}$ ). (B) For TIMP-1-loaded NPs, a TIMP-1 ELISA showed that TIMP-1 NPs + Ps80 (coated with Ps80) had much higher penetration compared to TIMP-1 NPs (uncoated NPs). Moreover, the penetration was time-dependent. After 120 minutes, there was a higher amount of TIMP-1 detected in the lower compartment compared to 30 minutes. Values represent mean  $\pm$  standard error of mean of three independent experiments, where asterisks represent  $P < 0.05$  versus group with TIMP-1 NPs after 120 min of incubation and #  $P < 0.05$  versus group with TIMP-1 NPs + Ps80 after 30 minutes.

**Abbreviations:** NPs, nanoparticles; Ps80, polysorbate 80; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

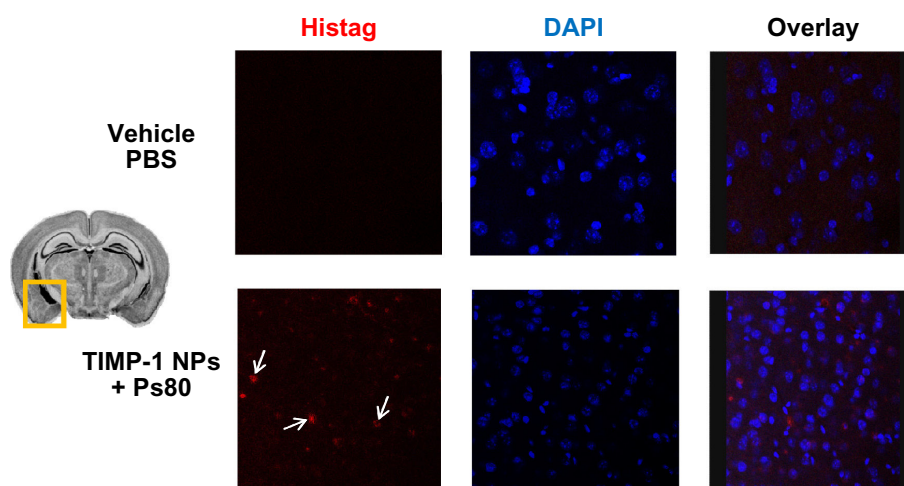
PLGA concentration in formulation has significant effects on encapsulation efficiency, particle size, and in vitro release. Initially, increase in polymer concentration increases particle size with increase in encapsulation efficiency, as reported previously with protein-loaded PLGA NPs.<sup>28</sup> However, in our study, further increase in polymer concentration did not increase encapsulation efficiency, although the particle size indeed increased.

Release of cargo from NPs takes place through several mechanisms, including surface and bulk erosion, disintegration, diffusion, and desorption. In our study, the five different

PLGA formulations with concentrations ranging from 1% to 5% showed sustained release of protein from the PLGA matrix. The initial burst effect was observed with all of the five formulations, which indicated a homogeneous encapsulation of TIMP-1 in the PLGA matrix. During the later phases, the release was mediated through both diffusion of protein and degradation of the polymer matrix itself. PLGA3 formulation with 3% polymer showed maximum cumulative release of protein (almost 72%) from the polymer matrix after 7 days.

For enhancing BBB penetration of NPs, we coated the NPs with Ps80 (Dye NPs + Ps80 and TIMP-1 NPs + Ps80), as Ps80 has been shown to enhance the penetration of NPs across endothelial cells.<sup>4</sup> Protein-loaded NPs with Ps80 coating have never been evaluated for delivery of TIMP-1. Therefore, we evaluated NP-based TIMP-1 delivery both in vitro and in vivo. Toxicity studies using LDH assay, LY assay, and ZO1 immunocytochemistry for both Ps80-coated and uncoated NPs suggest that the NPs are nontoxic and do not affect tight junction organization, although one of the various hypothesized mechanisms of BBB penetration of NPs is solubilization of the endothelial cell-membrane lipids by the surfactant used on formulation.<sup>29</sup> Our toxicity results can be interpreted in various ways. Firstly, if solubilization of cell-plasma membranes occurs, it does not induce significant toxicity to be detected by the LDH assay. Secondly, Ps80-coated NPs may penetrate the endothelial cells by solubilization of endothelial membrane by the surfactant, which may cause reversible cytotoxicity for a short time, which we could not detect in our results. The reversible-disruption hypothesis was also mentioned earlier by Rempe et al in their experiment using Ps80-coated PBCA NPs.<sup>30</sup> Finally, it may be possible that the surface solubilization is not one of the mechanisms for Ps80-coated NPs to penetrate through endothelial cells, as we did not detect cytotoxicity. Instead, there may be receptor-mediated transcytosis or some other mechanism involved in transportation.

Uptake/binding studies from NPs revealed that in in vitro conditions, NPs without Ps80 coating had better binding to endothelial cells as compared to Ps80-coated NPs. This is in contrast with the results generated by the penetration studies of NPs across the cell monolayer, where NPs + Ps80 had a systematic higher penetration rate, while uncoated NPs showed very low or no penetration. This suggests that although uncoated NPs had higher binding on cells, they stayed entrapped and did not penetrate across the cell monolayer. We therefore expect that coating with hydrophilic Ps80 (similar to PEGylation) may extend the circulation time

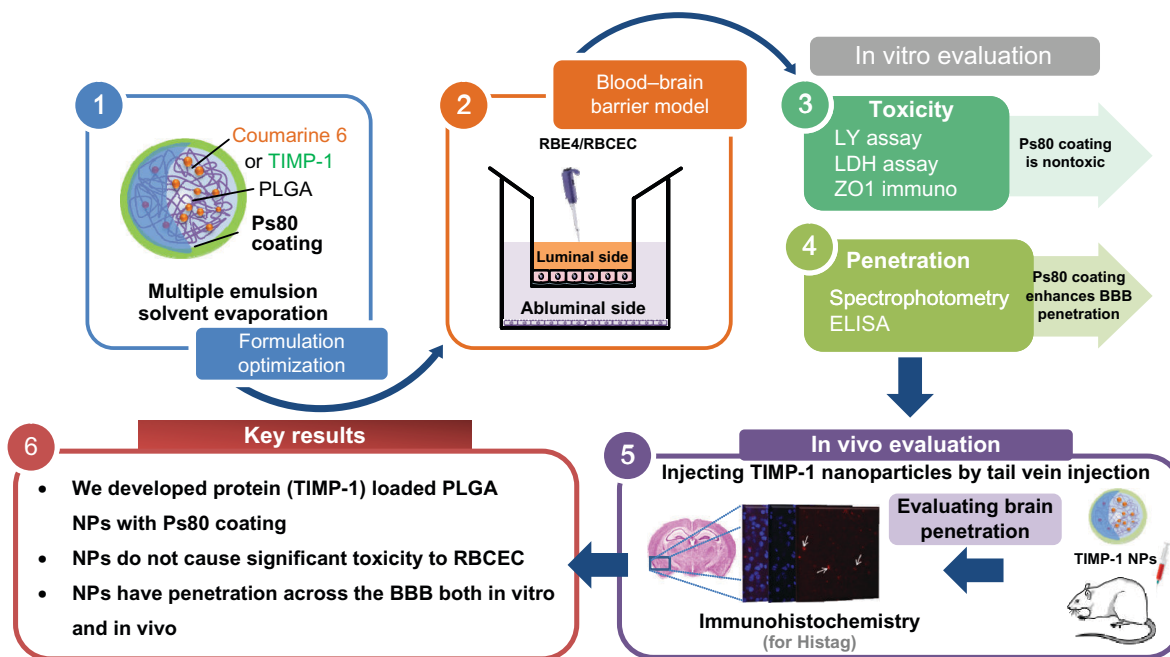


**Figure 8** In vivo blood–brain barrier (BBB) penetration. **Notes:** Representative fluorescence photomicrographs of immunohistochemistry on brain sections, of the specified area (marked with orange box) using a 6× Histag antibody to detect the TIMP-1-Histag fusion protein. The nucleus was labeled with DAPI. The TIMP-1 NPs + Ps80 group shows labeling indicating BBB penetration of TIMP-1 NPs + Ps80 as indicated by white arrows.

**Abbreviations:** TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; NPs, nanoparticles; Ps80, polysorbate 80; PBS, phosphate-buffered saline.

of NPs. Further investigation on uptake mechanisms, drug-uptake kinetics, and retention in the endothelial cells using NPs compared to NPs coated with Ps80 in vivo will be useful to establish the efficacy of NPs in therapeutic applications.

The in vitro BBB-penetration experiments showed strong evidence that the NPs with Ps80 coating have the ability to cross cell monolayers of primary endothelial cells. As shown in the result, due to some unknown reasons, only an optimum



**Figure 9** Graphical Summary. **Notes:** 1. In this study, we formulated TIMP-1 loaded NPs using multiple emulsion solvent evaporation method. The NPs were coated with Ps80 to improve their BBB penetration. 2. We used RBE4/RBCEC as our in vitro BBB model. 3. We compared toxicity of Ps80 coated and non-coated NPs using LY assay, LDH assay, and ZO1 immuno. And we have shown that either of the NPs are nontoxic to endothelial cells. 4. Next, we evaluated the BBB penetration for dye NPs using spectrophotometry and ELISA for TIMP-1 NPs and we have shown that Ps80 coated enhances the in vitro BBB penetration. 5. Finally, we evaluated in vivo BBB penetration by injecting the Ps80 coated TIMP-1 loaded PLGA NPs through tail vein injection and it showed that BBB penetration of intravenously injected TIMP-1 NPs + Ps80. 6. To summarize, we have developed TIMP-1 loaded PLGA NPs which can deliver TIMP-1 in a sustained release manner and can cross the BBB. The in vitro and in vivo results have shown that NPs are nontoxic to endothelial cells and they have BBB penetration.

**Abbreviations:** NPs, nanoparticles; TIMP, tissue inhibitor of matrix metalloproteinases; Ps80, polysorbate 80; LDH, lactate dehydrogenase; LY, Lucifer yellow; BBB, blood-brain barrier; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; immuno, immunocytochemistry; RBE4, rat brain endothelial cell line; RBCEC, rat brain capillary endothelial cells; PLGA, Poly(lactic-co-glycolic acid); ZO1, zona occludens 1.

concentration of Ps80-coated NPs (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) had peak penetration, while increasing or decreasing the concentration of Ps80-coated NPs decreased the penetration. These results remain unexplained, and further study in this direction may give an insight into the mechanism of transport of these NPs. The transport mechanisms of NPs across the endothelial cell monolayer are yet to be understood;<sup>31</sup> there are various hypothesized mechanisms in the literature, such as the surfactants used in the coating of NPs may solubilize the endothelial cell-membrane lipids, thus enhancing NP transport.<sup>32,33</sup> Another hypothesized mechanism is through adsorption of the surface of plasma proteins (like apolipoprotein E) on the NP surface, which can lead to NP uptake by endothelial cells via the low-density lipoprotein receptor.<sup>29</sup> Likewise, in our case, the Ps80 coating may have promoted adsorption of plasma proteins on the NP surface, leading to BBB uptake and transcytosis via receptors involved in receptor-mediated transcytosis, such as members of the low-density lipoprotein-receptor family. The immunohistochemistry results following *in vivo* studies showed direct evidence that the NPs have some BBB-penetration properties. Further studies are needed to understand the mechanism of NP transport across the BBB *in vivo* and to assess the pharmacological potential of TIMP-1 delivery into the brain.

## Future perspectives

### Therapeutic potential of TIMP-1

As mentioned earlier, there is enhanced expression and activity of MMP-9 in numerous CNS disorders, such as ischemic stroke, epilepsy, and excitotoxic/neuroinflammatory processes, which causes deleterious effects. Therefore, it is suggested that MMP-9 inhibition can be used for neuroprotection. At present, available MMP-9 inhibitors are poorly specific and have a wide range of targets. Development of specific inhibitors is always a challenging task. Moreover, exogenous inhibitors may have unanticipated side effects. Therefore, TIMP-1, being an endogenous inhibitor of MMP-9, has therapeutic potential.<sup>15</sup> TIMP-1 has shown neuroprotective effects in various *in vitro* and *in vivo* studies using viral vectors. The major obstacle of using TIMP-1 as a therapeutic agent is its short half-life *in vivo* and brain permeability. There have been attempts to extend its bioavailability, such as by PEGylation,<sup>17</sup> so in future it can be developed as a neuroprotective. We believe that Ps80-coated PLGA NPs may significantly improve in bioavailability and will be able to be used as a neuroprotective in future. Previously, we have shown that these TIMP-1-loaded NPs have neuroprotective effects in organotypic hippocampal cultures.<sup>18</sup> Furthermore, we have also shown their ability to control MMP-9 activity in the brain, following direct injection.<sup>34</sup> In the future, we would

like to do further *in vivo* studies using Ps80-coated TIMP-1 PLGA NPs to evaluate their pharmacological effects.

### Brain delivery of NPs

For improving brain delivery of NPs, there are various approaches, such as appending endothelial receptor-specific antibodies, which can improve brain penetration through transcytosis. However, these strategies require chemical conjugation involving complexity in NP formulation. While Ps80 coating of PLGA NPs is a fast and simple method to improve the brain penetration of drugs, including macromolecules as we have shown here, this method should be explored more.

## Conclusion

To our knowledge, this is the first study showing delivery of a protein (TIMP-1) using Ps80-coated NPs across the BBB. We developed TIMP-1-loaded PLGA NPs and coated them with Ps80 for enhancing BBB penetration. We performed toxicity studies of the NPs, which suggested that these NPs do not cause significant toxicity to RBCEC. Further, we tested uptake/binding of these NPs on RBE cells, which showed NPs without Ps80 have more binding to cells compared to NPs with Ps80 coating. The study also demonstrated that Ps80 coating of NPs can be used to enhance the delivery of protein across endothelial cell barriers, both *in vitro* and *in vivo*. Further studies are required to evaluate their penetration across the BBB.

## Acknowledgments

This study was supported by European regional development funds of the European Union funded through the Foundation of Polish Science (grant MPD4-5071). Also, we would like to thank the Laboratory of Electron Microscopy at Nencki Institute for their help. YM acknowledges the support of the French National Research Agency (ANR; VECToBrain project). MK acknowledges support from the National Center for Scientific Research (CNRS), Aix-Marseille Université (AMU), and grants from the ANR (TIMPAD, VECToBrain, and PREVENTAD). Finally, we would like to thank COST Action ECMNet (BM1001) for providing STSM fellowship for MC's stay in UMR 7259 – CNRS Marseille, France.

## Disclosure

Michel Khrestchatisky is director of the UMR7259 National Center for Scientific Research Aix-Marseille Université Laboratory and founder and shareholder in the biotechnology company Vect-Horus. The other authors report no conflicts of interest in this work.

## References

- Vlieghe P, Khrestchatsky M. Medicinal chemistry based approaches and nanotechnology-based systems to improve CNS drug targeting and delivery. *Med Res Rev.* 2012;33(3):457–516.
- Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release.* 2008;125(3):193–209.
- Panyam J, Labhasetwar V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv Drug Deliv Rev.* 2003;55(3):329–347.
- Gelperina S, Maksimenko O, Khalansky A, et al. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;74(2):157–163.
- Lorenzi S, Albers DS, Relkin N, et al. Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in patients with Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2003;43(3):191–196.
- Sang QX, Muroski M, Roycik M, et al. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is a putative therapeutic target of chronic obstructive pulmonary disease and multiple sclerosis. *Curr Pharm Biotechnol.* 2008;9(1):34–46.
- Rooprai H, McCormick D. Proteases and their inhibitors in human brain tumours: a review. *Anticancer Res.* 1997;17(6B):4151–4162.
- Sharshar T, Durand MC, Lefaucheur JP, et al. MMP-9 correlates with electrophysiologic abnormalities in Guillain-Barré syndrome. *Neurology.* 2002;59(10):1649–1651.
- Zhang H, Chang M, Hansen CN, Basso DM, Noble-Haesslein LJ. Role of matrix metalloproteinases and therapeutic benefits of their inhibition in spinal cord injury. *Neurotherapeutics.* 2011;8(2):206–220.
- Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett.* 1997;238(1–2):53–56.
- Yin P, Yang L, Zhou HY, Sun RP. Matrix metalloproteinase-9 may be a potential therapeutic target in epilepsy. *Med. Hypotheses.* 2011;76(2):184–186.
- Jourquin J, Tremblay E, Decanis N, et al. Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainate. *Eur J Neurosci.* 2003;18(6):1507–1517.
- Koistinaho M, Malm TM, Kettunen MI, et al. Minocycline protects against permanent cerebral ischemia in wild type but not in matrix metalloproteinase-9-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005;25(4):460–467.
- Kaczmarek L. MMP-9 inhibitors in the brain: can old bullets shoot new targets? *Curr Pharm Des.* 2012;19(6):1085–1089.
- Chaturvedi M, Kaczmarek L. MMP-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke. *Mol Neurobiol.* Epub September 12, 2013.
- Sa Y, Hao J, Samineni D, et al. Brain distribution and elimination of recombinant human TIMP-1 after cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Neurol Res.* 2011;33(4):433–438.
- Batra J, Robinson J, Mehner C, et al. PEGylation extends circulation half-life while preserving in vitro and in vivo activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *PLoS One.* 2012;7(11):e50028.
- Chaturvedi M, Figiel I, Sreedhar B, Kaczmarek L. Neuroprotection from tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and its nanoparticles. *Neurochem Int.* 2012;61(7):1065–1071.
- Reddy MK, Labhasetwar V. Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia-reperfusion injury. *FASEB J.* 2009;23(5):1384–1395.
- Panyam J, Dali MM, Sahoo SK, et al. Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J Control Release.* 2003;92(1–2):173–187.
- Roux F, Durieu-Trautmann O, Chaverot N, et al. Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol.* 1994;159(1):101–113.
- Roux FS, Mokni R, Hughes CC, Clouet PM, Lefauconnier JM, Bourre JM. Lipid synthesis by rat brain microvessel endothelial cells in tissue culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1989;48(4):437–447.
- Roux F, Couraud PO. Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25(1):41–57.
- Deli MA, Ábrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25(1):59–127.
- Prabha S, Zhou WZ, Panyam J, Labhasetwar V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int J Pharm.* 2002;244(1–2):105–115.
- Dey SK, Mandal B, Bhowmik M, Ghosh LK. Development and in vitro evaluation of Letrozole loaded biodegradable nanoparticles for breast cancer therapy. *Braz J Pharm Sci.* 2009;45(3):585–591.
- Makadia HK, Siegel SJ. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers.* 2011;3(3):1377–1397.
- Bilati U, Allémann E, Doelker E. Poly(D, L-lactide-co-glycolide) protein-loaded nanoparticles prepared by the double emulsion method-processing and formulation issues for enhanced entrapment efficiency. *J Microencapsul.* 2005;22(2):205–214.
- Kreuter J. Mechanism of polymeric nanoparticle-based drug transport across the blood-brain barrier (BBB). *J Microencapsul.* 2013;30(1):49–54.
- Rempe R, Cramer S, Hüwel S, Galla HJ. Transport of poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles across the blood-brain barrier in vitro and their influence on barrier integrity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;406(1):64–69.
- Reimold I, Domke D, Bender J, Seyfried CA, Radunz HE, Fricker G. Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2008;70(2):627–632.
- Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;47(1):65–81.
- Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol.* 2004;4(5):484–488.
- Knapska E, Liudyno V, Kiryk A, et al. Reward learning requires activity of matrix metalloproteinase-9 in the central amygdala. *J Neurosci.* 2013;33(36):14591–14600.

### International Journal of Nanomedicine

### Publish your work in this journal

The International Journal of Nanomedicine is an international, peer-reviewed journal focusing on the application of nanotechnology in diagnostics, therapeutics, and drug delivery systems throughout the biomedical field. This journal is indexed on PubMed Central, MedLine, CAS, SciSearch®, Current Contents®/Clinical Medicine,

Submit your manuscript here: <http://www.dovepress.com/international-journal-of-nanomedicine-journal>

### Dovepress

Journal Citation Reports/Science Edition, EMBASE, Scopus and the Elsevier Bibliographic databases. The manuscript management system is completely online and includes a very quick and fair peer-review system, which is all easy to use. Visit <http://www.dovepress.com/testimonials.php> to read real quotes from published authors.

### III. Conclusion

L'effet neuroprotecteur des NPs-TIMP-1 avait été évalué sur des cultures organotypiques d'hippocampes traitées avec du kainate afin d'induire l'excitotoxicité (Chaturvedi *et al.*, 2012). Cette étude avait confirmé que les NP-TIMP-1 entraînent un effet protecteur par diminution de la libération de la LDH et inhibition de l'activité de MMP-9, qu'elles soient administrées avant ou après le traitement au kainate. Dans le cadre du présent projet, l'encapsulation de TIMP-1 dans des NPs avait pour objectifs : (i) une meilleure caractérisation des NPs-TIMP-1 générées, (ii) la poursuite de l'évaluation d'une stratégie de traitement de la neurodégénérescence induite par excitotoxicité, en limitant limiter l'effet délétère des MMPs dans ce processus et (iii) d'évaluer la pénétration cérébrale et la libération soutenue de TIMP-1 dans le parenchyme nerveux.

Dans cette étude collaborative, nous avons montré que les NPs encapsulées avec la 6-coumarin et TIMP-1 et leur enrobage avec le surfactant Ps80 n'entraînent pas de toxicité pour les monocouches de cellules endothéliales cérébrales et que ces constructions peuvent être exploitées pour favoriser le passage d'une protéine à travers la BHE *in vitro* et *in vivo*. L'ajout de Ps80 en surface des NPs a permis de réduire leur accumulation dans les cellules endothéliales, comparés aux NPs non traitées, au profit de l'augmentation de leur pénétration à travers la monocouche de CEMCs *in vitro* et à travers la BHE *in vivo*.

**Article 3 (soumis): The LDLR promotes transcytosis of LDL and peptide vectors developed for cargo delivery to the brain in an *in vitro* model of the blood-brain barrier**

## I. Résumé

La diffusion de principes actifs de la circulation plasmatique vers la zone d'efficacité tissulaire, tel que cela se produit en périphérie, est entravée au niveau du SNC par la présence d'un endothélium présentant des propriétés spécifiques de ce tissu, appelé BHE. La présence de mécanismes de transports spécifiques à travers la BHE, dont le RMT, permet de répondre à la forte demande métabolique cérébrale. Le RMT consiste en une captation de ligands plasmatiques par un récepteur exprimé à la membrane plasmique apicale de l'endothélium, une endocytose du complexe et un transfert de tout ou partie du ligand initial à travers les cellules endothéliales. Ce mécanisme naturel est exploité par la communauté scientifique pour favoriser le transport d'agents pharmacologiques (molécules d'imagerie ou thérapeutiques) à travers la BHE, grâce au développement de vecteurs (peptides ou anticorps) ciblant ces récepteurs, conjugués aux agents pharmacologiques, selon une approche « cheval de Troie ». La majorité des études décrites dans la littérature consistent à quantifier l'efficacité thérapeutique, post injection intraveineuse des conjugués, dans des modèles pathologiques ou encore le pourcentage de la drogue injectée par gramme de tissu nerveux (% ID/g of tissu). Cependant, ces études restent souvent limitées dans la compréhension de leur inefficacité en cas d'échec thérapeutique ou de faible quantification de la drogue dans le tissu nerveux. Les modèles *in vitro* de BHE permettent de compléter au niveau cellulaire, l'étude de ces mécanismes de transport afin de mieux comprendre les déterminants d'un transfert efficace. Dans ce manuscrit, nous avons étudié le low density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR), connu pour être exprimé à la BHE, en tant que cible potentielle permettant d'endocyter et engager vers une voie transendothéliale des ligands naturels, vecteurs peptidiques et conjugués développés dans le cadre du partenariat entre la société VECT-HORUS et le laboratoire NICN.

Dans une première série d'expériences, nous avons mis en évidence l'expression de notre cible, le LDLR, au niveau de la membrane plasmique apicale de l'endothélium cérébral. Des approches de RT-qPCR sur tissu total ou de western blot sur préparation de membranes plasmiques ont permis de quantifier l'expression du LDLR dans notre tissu d'intérêt, à savoir les monocouches de CEMCs, comparées (i) aux microvaisseaux cérébraux (MVC) fraîchement extraits, (ii) au cortex total et (iii) à deux organes contrôles, connus pour exprimer le LDLR, les glandes surrénales et le foie. A cette étape, des animaux knock out pour le LDLR (*ldlr -/-*) ont été utilisés afin de valider la spécificité de plusieurs anticorps anti-LDLR dans les approches de western blot et sur tissus. La validation de l'expression du LDLR à la membrane apicale des CEMCs a été réalisée grâce à une approche combinant des gradients de sucrose et la détection des fractions apicales et basolatérales par western blot. Nous avons ensuite analysé le potentiel du LDLR à lier et endocyter un de ses ligands

endogènes, le LDL, ainsi qu'un anticorps anti-LDLR, par des approches de cytométrie de flux et d'immunocytochimie en incubation à 4 °C et 37 °C sur les monocouches de CEMCs WT et *ldlr* <sup>-/-</sup>. La capacité du LDLR à promouvoir le transfert du LDL du compartiment luminal vers le compartiment abluminal à travers les monocouches de CEMCs WT et *ldlr* <sup>-/-</sup> a ensuite été quantifiée par fluorimétrie. Cette première série d'expériences a permis de montrer que l'endocytose du LDL et son accumulation dans le compartiment vésiculaire puis le transfert de tout ou partie de sa charge endosomale à travers les monocouches de CEMCs étaient exclusivement LDLR-dépendants.

Afin d'approfondir le mécanisme de RMT dans lequel semble être impliqué le LDLR, nous avons mis en place d'une approche de pulse-chase afin d'explorer le trafic intracellulaire des deux entités du complexe LDLR/LDL post endocytose. L'approche consiste en une première étape de synchronisation de la liaison de surface de ligands du LDLR à 4°C (pulse), suivie de lavages permettant d'éliminer la liaison et l'endocytose de nouveaux ligands lors du changement de température à 37 °C (chase). Pendant cette étape, les monocouches de CEMs ont été incubées avec deux marqueurs permettant de révéler le compartiment lysosomal et la voie transcellulaire empruntée par la transferrine (Tf). Nous avons choisi la Tf car son récepteur (TfR), impliqué dans un mécanisme de RMT à la BHE, est considéré par la communauté scientifique comme une cible valide pour l'adressage de principes actifs vectorisés vers le tissu nerveux. Afin d'étudier le trafic intracellulaire des vésicules contenant le LDLR et/ou ses ligands, nous avons évalué leurs pourcentages de co-localisation avec le compartiment lysosomal et la voie Tf-positif par analyse d'images quantitative, selon une cinétique de 15 min, 30 min et 60 min. Ces études ont permis de mettre en évidence que (i) le LDL et la Tf co-localisent à la membrane apicale des CEMCs, suggérant une voie d'entrée similaire dans la cellule, (ii) le LDL ainsi que le LDLR s'engagent progressivement vers la voie Tf-positif (endosomes précoces, tardifs et de recyclage) et (iii) le LDL évite le compartiment lysosomal à la BHE. La combinaison des approches nous a permis de mieux comprendre les aspects mécanistiques du LDLR exprimé à la BHE et valide son utilisation dans notre approche en tant que récepteur présenté à la membrane apicale des CEMCs, capable d'endocyter le LDL et de promouvoir son transfert à travers la monocouche de CEMCs via une voie transcellulaire.

En parallèle de cette caractérisation de la cible, une famille de peptides, ligands du LDLR, non compétitifs avec le LDL, ont été caractérisés pour leur potentiel à être transférés du compartiment luminal vers le compartiment abluminal, par voie transcellulaire à travers les monocouches de CEMCs. Lors de la sélection du premier hit, le peptide VH411, nous n'avons pas encore validé les modèles *in vitro* de BHE présentés dans le premier article. Afin de mettre en évidence la capacité de transfert du peptide VH411 (15 acides aminés) à travers une monocouche de CEMCs, nous avons



utilisés un modèle *in vitro* de BHE bovin fourni par la société CELLIAL technologies. Ces essais avaient permis de mettre en évidence (i) l'absence de toxicité endothéliale des peptides (hits et contrôles) après 24 hr d'incubation à 10  $\mu$ M, (ii) leur accumulation intracellulaire et (iii) leur accumulation dans le compartiment abluminal en fonction du temps, comparé à un peptide « scramble », ne présentant aucune affinité pour le LDLR. En parallèle de ces études, les peptides avaient été optimisés dans le cadre d'approches *in vivo* de détermination de leur Kin (perfusion intracarotidienne) et de leur biodistribution tissulaire, avec notamment la réduction du nombre d'acides aminés, l'optimisation de leur affinité apparente à pH neutre pour le LDLR et leur stabilité plasmatique. Ces approches avaient permis la sélection du peptide VH434, constitué de 8 acides aminés naturels et un dérivé, le peptide VH4127 dont certains acides aminés avaient été remplacés par des analogues synthétiques ou énantiomères de conformation D. Le choix du traceur s'est orienté vers un fragment Fc d'un anticorps IgG1 humain en tant que cargo protéique, quantifiable par ELISA et permettant une meilleure sensibilité de quantification par rapport à la fluorimétrie. Un premier conjugué a été créé en tant que protéine recombinante présentant un peptide VH434 en C-ter du fragment Fc monomérique (dimérisation à l'expression) ou par couplage chimique entre les peptides VH4127 et les lysines du fragment Fc. Dans ce cas, la valence ou le couplage du nombre de peptides par fragment Fc dimérique peut être modulée en ajustant la réaction. Dans cette étude, elle a été fixée à 10 peptides par fragment Fc dimérique, (VH4127)<sub>10</sub>-Fc, appelé VH4127-Fc. Une première série d'expériences a permis de confirmer la fonctionnalité de la nouvelle entité sur les monocouches de CEMCs WT et *ldlr* <sup>-/-</sup>, à savoir le maintien de l'affinité du conjugué pour le LDLR et le maintien de la détection du fragment Fc par un anticorps secondaire selon des approches d'immunocytochimie et ELISA anti-Fc. Le potentiel de transfert transendothélial des conjugués a été mis en évidence par quantification ELISA (i) de leur accumulation intracellulaire et saturation dose dépendante et (ii) de leur capacité à être libérés par les cellules, suite à leur transfert du compartiment luminal vers le compartiment abluminal selon un processus dépendant de la température.

L'approche de pulse-chase mise en place pour le LDL a été également appliquée aux conjugués avec certaines modulations du protocole, notamment le remplacement de la Tf par le LDL. De plus, la détection d'une interaction protéine-protéine dans le compartiment lysosomal/acide pouvant être altérée, nous avons ajouté une étape de couplage supplémentaire de 4 Alexa fluor 647 par conjugué VH4127-Fc (VH4127-Fc-A647), n'altérant pas ses propriétés et permettant une observation directe du conjugué. L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence que les conjugués (i) co-localisent en surface cellulaire avec leur cible LDLR, (ii) ne s'accumulent pas dans le compartiment lysosomal et (iii) suivent majoritairement, en tant que ligands du LDLR, le trafic intracellulaire du LDL, permettant leur accumulation dans le compartiment abluminal des modèles de BHE *in vitro*.

## II. Article 3

### THE LDLR PROMOTES TRANSCYTOSIS OF LDL AND PEPTIDE-VECTORS DEVELOPED FOR CARGO DELIVERY TO THE BRAIN IN AN *IN VITRO* MODEL OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER

Yves Molino\*#, Karine Varini°#, Françoise Jabès\*, Marion David\*, Nicolas Gaudin°, Anne Bernard°, Pascaline Lécorché\*, Guillaume Jacquot\*, Michel Khrestchatisky°

\* Vect-Horus SAS, Faculté de Médecine, 13344, Marseille, France.

° Aix Marseille Université, CNRS, NICN UMR 7259, 13344, Marseille, France

# Authors contributed equally to this work

e-mails :       yves.molino@vect-horus.com  
                  karine.varini@vect-horus.com  
                  francoise.jabes@vect-horus.com  
                  marion.david@vect-horus.com  
                  nicolas.gaudin@vect-horus.com  
                  anne.bernard@univ-amu.fr  
                  pascaline.lecorche@vect-horus.com  
                  guillaume.jacquot@vect-horus.com

#### **Corresponding author:**

Dr Michel Khrestchatisky, NICN UMR 7259, Faculté de Médecine de Marseille Secteur Nord, 51 Bd  
Pierre Dramard, CS80011, 13344, Marseille Cedex 15, France  
Phone number: +33 (0) 4 91 69 87 29; Fax: + 33 (0) 4 91 25 89 70  
e-mail : michel.khrestchatisky@univ-amu.fr

**Key words:** blood-brain barrier (BBB) *in vitro* models, receptor-mediated transcytosis (RMT), low-density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR), intracellular trafficking, peptide, drug delivery.

## ABSTRACT

The blood-brain barrier (BBB) prevents the entry of many drugs in the brain and is thus a major obstacle in the treatment of central nervous system (CNS) diseases. Some receptors expressed at the BBB promote the transendothelial transfer of their natural ligands from blood to brain, a process referred to as receptor-mediated transcytosis (RMT). A few molecules ranging from antibodies to peptides that target receptors of the BBB have been developed and described for their potential to transport cargos across the BBB. There is some evidence that the low-density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR) is expressed at the BBB and may participate in the transcytosis of endogenous ligands. We previously described a family of peptide-vectors that were developed to target the LDLR. In the present study, we used an *in vitro* BBB model to validate the specific LDLR-dependent transcytosis of LDL via a non-degradative route, in particular by comparing primary endothelial cell monolayers from wild-type (WT) and LDLR knock-out animals (*ldlr*  $-/-$ ). Next, we show that the LDLR-targeting peptide-vectors we developed promote binding to apical LDLR and transendothelial transfer of a protein cargo across the BBB monolayers via the same route than LDL. We thus provide further evidence that the LDLR is a relevant receptor for CNS drug delivery via RMT and that the peptides we developed have the potential to be used as vectors to transport drugs, including proteins or antibody-based, across the BBB.

## INTRODUCTION

Many drugs are ineffective in treating central nervous system (CNS) diseases due in part to the blood-brain barrier (BBB) that substantially impedes the delivery of therapeutic agents to the nervous tissue. Hence, new strategies to increase CNS drug delivery represent major pharmacological challenges in the coming years [1]. Specific peptide domains of proteins, some discovered by serendipity, that cross cell membranes such as cell penetrating peptides (CPPs), have been developed as “vectors” to deliver pharmacological agents to the nervous tissue [2]. Other strategies involve the development of vector molecules that promote more specific CNS drug delivery across the BBB via specific receptors involved in receptor-mediated transcytosis (RMT) of their endogenous ligands [3]. For instance, antibodies that bind the insulin receptor (IR) or the transferrin receptor (TfR) have been developed as vectors to carry pharmacological payloads including proteins and therapeutic antibodies across the BBB [4]. Members of the low-density lipoprotein (LDL) receptor (LDLR) family and their natural apolipoprotein (Apo) ligands such as ApoB and ApoE have also been considered for their potential to efficiently deliver nanoparticle-loaded therapeutics to the brain [5] via RMT across the BBB [6]. The receptor-associated protein RAP (39 kDa), or the p97 protein (80 kDa) also known as melanotransferrin (MTf), both bind members of the LDLR-related protein (LRP) subfamily and showed efficient transfer across the BBB [7, 8]. However, drug delivery strategies based on apolipoproteins or full size endogenous ligands may appear difficult to implement at the industrial level and alternative strategies were designed to reduce significantly the size of CNS drug delivery agents. In addition, their clinical use may be further limited by competition or saturating levels of the circulating endogenous ligands.

The rational design of peptide-vectors that target receptors involved in RMT was implemented with the characterization of peptides that encompass consensus minimal sequences of the binding domains (BD) of different protein ligands [9]. These include MTfp, a peptide that represents 2% of the melanotransferrin (MTf) protein) [10], the angiopep-2 peptide (Ang-2), a 19 amino-acid linear peptide derived from aprotinin, a ligand of LRP1 [11, 12], a 38 amino acid LDLR-targeted linear peptide derived from ApoB-BD [13, 14], and several ApoE-BD linear peptides between 9 to 23 residues [15, 16]. All these peptides were engineered to promote the transfer of drugs including therapeutic proteins and antibodies across the BBB. However, the precise mechanism by which such peptide-vectors are engaged in transcytosis across the BBB is not known.

The LDLR belongs to a family of single transmembrane glycoproteins generally recognized as cell surface endocytic receptors whose intracellular trafficking was described for LDL particles in epithelial cells [17] and that are expressed with some degree of tissue specificity [18]. Brain cholesterol (essentially in an unesterified, free form), which accounts for 20-25% of the total body sterols in humans primarily results from *de novo* synthesis and there is limited evidence that

cholesterol is transported across the BBB [19]. The presence of the LDLR at the BBB [20] thus raises the question of its involvement in RMT and whether it is a target of interest for the transendothelial transfer of pharmaceutical agents.

In order to address these questions we first investigated LDLR expression and its apical or basolateral plasma membrane distribution in primary endothelial cells in *in vitro* models of the BBB and in purified brain microvessels (BMV). Next, using *in vitro* models of the BBB based on wild-type (WT) and *ldlr*<sup>-/-</sup> brain microvascular endothelial cells (BMEC) [21], we assessed the potential of the LDLR to transport ligands across the BMEC monolayers via a transendothelial route and studied both LDLR and LDL intracellular trafficking within different vesicular compartments. Finally, we used the LDLR-targeted peptide-vectors we rationally designed [22] to assess their potential to i) cross BMEC monolayers when conjugated to a TAMRA fluorophore, and ii) promote the transendothelial transfer of a protein cargo (Fc fragment from a human IgG1 antibody). Our results show that the LDLR is a relevant receptor for CNS drug delivery via RMT and that the peptides we developed have the potential to be used as vectors for the transport of drugs, including proteins or antibody-based, across the BBB.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

Procedures involving animals conform to National and European regulations (EU directive N°2010/63) and to authorizations delivered to our animal facility (N° C13 055 08) and to the project (N° 00757.02) by the French Ministry of Research and Local Ethics Committee. All efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

### **Establishment of stable cell lines expressing human, rat and mouse LDLR-EGFP**

Full length coding region for LDLR were amplified by RT-PCR from human, rat and mouse (hLDLR, rLDLR and mLDLR) brain total RNA (Clontech laboratories, Mountain View, CA, USA) using the following pairs of forward (F) and reverse (R) primers, respectively:

Fh: ATATATAAGCTTCGAGGACACAGCAGGTCGTGAT,

Rh: TTAATTGTCGACCACGCCACGTCATCCTCCAGACT,

Fr: ATATATAAGCTTACATTTCCGGTCTGTGATCC,

Rr: TTAATTGTCGACCACGCCACGTCATCCTCCAGACT,

Fm: TTAATTACCGGTCATGCCACATCCTCCAG,

Rm: TTAATTGGTACCGTTGCCACATCGTCCTCCAG.

The PCR products were cloned in frame (C-terminal) with enhanced green fluorescent protein (EGFP) in the pEGFP-N1 vector (Clontech) and plasmid constructs were fully sequenced. Chinese Hamster Ovary cells (CHO-K1, ATCC number CCL-61TM) were transfected using JetPei (Polyplus Transfection, Illkirch France) with the different plasmid constructs. Clones with stable LDLR-EGFP expression were selected with geneticin 800 µg/mL (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), amplified and tested for the plasma membrane expression of the fusion proteins by western blotting and immunocytochemistry. Cell lines were referred to as CHO-hLDLR-EGFP, CHO-rLDLR-EGFP or CHO-mLDLR-EGFP. Forty-eight hours before experiments, the cell lines were seeded on cover slips at a density of  $40 \cdot 10^3$  cell/cm<sup>2</sup> in a humidified cell culture incubator with 5 % CO<sup>2</sup>.

### ***In vitro* BBB models**

Because our study required LDLR deficiency to validate our results on LDLR-mediated transport of Dil-LDL and vectorized-Fc across the BBB, we set up rat and mouse syngeneic *in vitro* BBB models that allowed comparison between WT and *ldlr* <sup>-/-</sup> BMECs. For independent validation of some of the results, we also used a commercially available bovine *in vitro* BBB model from Cellial Technologies (Lens, France) [23].

### *Rat and mouse syngeneic in vitro BBB models*

#### *Production of astrocytes*

Rat and mouse cerebral astrocytes were obtained respectively from neonatal Wistar rats and C57Bl6 mice (Elevage Janvier, St Berthevin, France) as previously described [21]. Briefly, meninges were carefully removed and the cortical pieces were mechanically then enzymatically dissociated in a solution of trypsin 0.05%-EDTA 0.02% (Life Technologies) for 5 min at 37 °C (3 cortical pieces in 6 mL). Dissociated cells were seeded into cell culture flasks in glial cell media (GCM) containing DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin 100 units/mL and streptomycin 100 µg/mL (Life Technologies), that was replaced twice a week. After 1 week of proliferation, the glial cells were gently shaken on an orbital shaker at 60 rpm during 48 hr at 37 °C to remove microglial cells. Three weeks after seeding, cultures enriched in astrocytes were passaged by treatment with trypsin 0.05% - EDTA 0.02% solution and frozen in liquid nitrogen for later use.

#### *Production of BMEC primocultures*

Primary cultures of BMEC were prepared from 5-6 week old Wistar rats, C57Bl/6 mouse brains (Elevage Janvier), Sprague Dawley *ldlr*<sup>-/-</sup> rats (SAGE Labs, Boyertown, PA, USA) or C57Bl/6 *ldlr*<sup>-/-</sup> mice (The Jackson Laboratory, Sacramento, CA, USA). Briefly, the cerebellum, the optic nerves, the midbrain and the meninges were carefully removed from forebrains under a stereomicroscope. Then, the cortical pieces were mechanically dissociated with a Dounce homogenizer and digested with an enzymatic solution containing a mix of collagenase/dispase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), DNase type I 35 µg/mL – 20 K units/mL (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and gentamycin 50 µg/mL (Life Technologies) in a shaker for 30 min at 37 °C as previously described [21]. The digested tissues were separated by a density-dependent centrifugation in 25% bovine serum albumin (BSA) low endotoxin level (PAA Laboratories, Velizy-Villacoublay, France) in HBSS 1X (Life Technologies) at 3600 x g for 15 min at RT. The microvessels obtained in the pellet were further digested with the same enzymatic solution for 1 hr at 37 °C in a shaker. The digested microvessels were centrifuged at 1000 x g for 5 min and seeded on T75 flask, pre-coated 48 hr earlier with collagen type IV and fibronectin both at 1 µg/cm<sup>2</sup> (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), in endothelial cell media (ECM) containing DMEM/F12 supplemented with 20% bovine platelet poor plasma derived serum (Alfa Aesar, Ward Hill, MA, USA), basic fibroblast growth factor (bFGF) 2 ng/mL, heparin 100 µg/mL, gentamycin 50 µg/mL and HEPES 2.5 mM (all from Life Technologies). For the first two days, puromycin 4 µg/mL (Sigma Aldrich) was added to the ECM. On the third day, the cells were washed and puromycin 2 µg/mL was added for two more days. On the fifth day, the cells were washed and ITSX supplement containing insulin, transferrin and sodium selenite (Life Technologies) was added for two more days until the cultures reached 90% confluence.

### *Rat and mouse in vitro BBB models*

Five days before the establishment of the co-culture, astrocytes were thawed and plated in GCM at a density of  $30 \cdot 10^3$  cells per  $\text{cm}^2$  in 12-well or 6-well plates. Two days before the establishment of the co-culture, the purified endothelial cells were passaged by a brief treatment with trypsin 0.05% - EDTA 0.02% solution and immediately seeded at a density of  $160 \cdot 10^3$  cells/ $\text{cm}^2$  in the luminal compartment of the 12-well or 6-well plates polyethylene insert filters with a pore size of  $1 \mu\text{m}$  (Merck Millipore, Billerica, MA, USA), pre-coated 48 hr earlier with collagen type IV and fibronectin, both  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (BD Biosciences). The day before the establishment of the co-culture, the astrocyte culture media was replaced by ECM supplemented with hydrocortisone 500 nM and  $\frac{1}{3}$  conditioned medium from the abluminal compartment of a previous co-culture (3 days of contact between BMECs and astrocytes). BMEC monolayers and astrocytes were set together in co-culture on the first day of differentiation. Forty-eight hours after plating, a monolayer of BMECs covered the entire filter surface. The luminal compartment of the filters was replaced with ECM supplemented with hydrocortisone 500 nM and the filters were transferred into the wells containing the astrocytes. Under these conditions, *in vitro* models differentiate, express junction-related proteins within 3 days and remain optimally differentiated during 3 more days.

### *Bovine in vitro BBB model*

Briefly, the model distributed by Cellial Technologies [23] was based on bovine BMECs cultured on Millicell polycarbonate insert filters, pore size  $0.4 \mu\text{m}$ , 30 mm diameter (Merck Millipore), treated with rat tail collagen type I. BMECs were grown in the presence of DMEM medium supplemented with horse serum 10 % and new born calf serum 10 %, glutamine 2 mM, gentamicin  $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  and bFGF  $1 \text{ ng}/\text{ml}$ , added every two days. In parallel, primary mixed astrocytes established from neonatal rat cerebral cortex were distributed in microplate wells at a density of  $1.2 \cdot 10^5$  cells/mL with DMEM supplemented with 10 % FBS and changed twice a week. All reagents were from Life Technologies. The BMECs were then distributed on the luminal surface of the filters in 2 mL co-culture and the medium was changed three times a week. Under these conditions, BMECs form a monolayer. Transport assays across the bovine *in vitro* BBB model were carried out between 5 and 7 days after confluence was reached.

### **Tissue sampling**

For the sampling of adrenal glands (Ag) and liver (L), both tissues known to be enriched in LDLR and used as positive controls, and cerebral cortex (Cx), the rats and mice were anesthetized with an intra-peritoneal injection of a mix of ketamine  $140 \text{ mg}/\text{Kg}$  (Imalgene TM, Merial, Lyon, France) and xylazine  $10 \text{ mg}/\text{Kg}$  (Rompun TM, Bayer Healthcare, Loos, France). The abdominal cavity



was opened to access the heart for left cardiac ventricular perfusion at 3 mL/min with NaCl 0.9 % (w/v). After the removal of the brain from the skull, the cerebellum, the optic nerves and the midbrain were removed under a stereomicroscope to leave a shell of cortex. The adrenal glands, the liver and the cortices of WT (Cx WT) and *ldlr*<sup>-/-</sup> (Cx *ldlr*<sup>-/-</sup>) rodents were mechanically dissociated in PBS 1X Triton X100 0.1 % by passing through a cell strainer of 70 µm. The filtrate was then centrifuged at 13 000 x g for clarification and called lysate (Lt). The digested BMVs were prepared as described above but they were washed with PBS 1X instead of plating. The non-digested BMVs (nd-BMV) were prepared as described above without the two digestion steps. The CHO-LDLR-EGFP cell lines and the BMEC monolayers were pre-incubated on ice with a solution of DPBS 1X (without calcium and magnesium, Life Technologies) and EDTA 0.25 mM, then mechanically detached with a cell scraper and centrifuged at 1200 x g for 10 min. All samples were freeze-dried at -80 °C for later use.

### **RNA extraction and RT-qPCR analysis**

Using the RNeasy Lipid Tissue Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), total RNA was prepared from adrenal glands, liver, cortex, enzymatically digested BMVs and BMEC monolayers from mice and rats. Single-strand cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using oligo(dT)<sub>12-18</sub> primers and Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (both from Life Technologies) under the conditions indicated by the manufacturer. qPCR experiments were carried out with the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All reactions were performed according to the manufacturer's instructions using TaqMan Fast Universal PCR Master Mix and probes from the TaqMan Gene Expression Assays with the following references: rat LDLR (Rn00598442), mouse LDLR with target sequences in exons 1-2, (Mm00440169), mouse LDLR with target sequences in exons 14-15 (Mm01151335). Rat GAPDH (Rn01775763) and mouse GAPDH (Mm99999915) were used as references. Twenty-five ng of cDNA was used for each qPCR. Samples were run in duplicates on the same 96-well plates and analyzed with the 7500 Software v2.0 (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions started with initial denaturation at 95 °C for 20 seconds, followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 3 seconds and annealing/extension at 60 °C for 30 seconds. Relative expression levels are determined according to the  $\Delta\Delta CT$  method where the expression level of the mRNA of interest is given by  $2^{-\Delta\Delta CT}$  where  $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ target mRNA} - \Delta CT \text{ reference mRNA (GAPDH)}$  in the same sample.

### **Preparation of membrane protein fractions**

Membrane proteins of adrenal glands, liver, cortex, enzymatically digested BMVs, CHO-LDLR-EGFP cell lines and BMEC monolayers from mice and rats were extracted with a cellular protein

fractionation kit (Calbiochem, La Jolla, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. For the assessment of polarization, BMEC monolayers ( $3.10^6$  cells) and digested BMVs (from 6 cortices) were resuspended in 1 mL of hypotonic lysis buffer (sodium bicarbonate 1 mM pH 7.0, supplemented with a cocktail of protease inhibitors, Sigma Aldrich) to obtain the whole cell lysate (WL). The suspension was then centrifuged at  $100\ 000 \times g$  for 1 hr at 4 °C to pellet the whole membranes (WM). The resulting pellet was suspended in 500  $\mu$ L of hypotonic lysis buffer and homogenized with a Dounce homogenizer with a pestle of 20  $\mu$ m clearance. The homogenate was diluted 2-fold in a sucrose buffer 2X containing sucrose 520 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.4 mM and HEPES/TRIS 10 mM, pH 7.4 and subsequently centrifuged at  $12\ 000 \times g$  for 10 min at 4 °C to pellet the nuclear fraction and debris from organelle membranes. The supernatant containing the cytosol and the plasma membranes was then centrifuged at  $100\ 000 \times g$  for 1 hr at 4 °C. The resulting pellet representing the total plasma membranes (PM) was resuspended in 200  $\mu$ L of a sucrose solution 1X. The plasma membrane suspension was further homogenized as above. The suspension was layered over a step gradient of 2.5 mL sucrose 30 % (1.13 g/mL), 2.5 mL sucrose 34 % (1.15 g/mL) and 4 mL sucrose 38 % (1.17 g/mL) as previously described [24], and was spun at  $200\ 000 \times g$  for 2 hr at 4 °C. The plasma membrane fractions at the 3 interfaces were collected, with the F1/apical fraction in the sucrose 30 % layer, the F2 fraction in the 30-34 % layer and the F3 basolateral fraction in the 34-38 % layer. Sucrose was eliminated by dilutions in PBS 1X and samples were then concentrated in a 10 kDa exclusion filter (Merck Millipore) in a final volume of 50  $\mu$ L. Protein concentrations were determined using the Lowry method (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

### **SDS PAGE and western blot analysis**

After boiling, aliquots containing equal amounts of protein were loaded in Laemmli buffer and separated by 8.5 % sodium dodecyl sulphate (SDS) polyacrylamide (Bio-Rad) gel electrophoresis (PAGE) using a MiniBlot system (Bio-Rad). Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) in transfer buffer (Tris 25 mM, glycine 192 mM, ethanol 20%). Membranes were incubated overnight in blocking buffer at 4 °C and then probed with primary antibodies diluted in blocking buffer (TBS with milk 5% and Tween20 0.1 %). The following antibodies were used: goat anti- $\beta$ -actin HRP 1/5000 (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA), goat anti-LDLR 1/500 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA), mouse anti-desmin 1/500 (Merck Millipore), rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) 1/1000 (Abcam, Cambridge Science Park, UK), mouse anti-P-glycoprotein (P-gp) 1/200 (Covance Inc., Princeton, NJ, USA), rabbit anti-glutamate transporter-1 (GLT-1) 1/1000 (Abcam) and mouse anti-enhanced green fluorescent protein (EGFP) 1/1000 (Roche Diagnostics). P-gp and GLT-1 were used respectively as apical and basolateral membrane polarization markers. After washing, membranes were incubated with appropriate secondary horseradish

peroxidase (HRP)-conjugated IgG antibodies 1/2000 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). Finally, proteins were detected using a chemiluminescence kit (Roche Diagnostics) revealed with the G:Box chemi xx6 system (Syngene, Cambridge, UK). Films were digitized using GeneSys software (Syngene) and optical densities of the bands were assessed using the NIH ImageJ software, an independent operating system that has a license-free status (version 1.49o for mac).

### **Flow cytometry**

BMEC primocultures at confluence were pre-incubated on ice with a solution of DPBS 1X (without calcium and magnesium) and EDTA 0.25 mM then mechanically detached with a cell scraper and centrifuged at 120 x g for 8 min. Mechanical detachment was preferred to enzymatic detachment to avoid receptor shedding at the cell surface. The pellet was resuspended in a solution containing PBS 1X, FBS 1 % and sodium azide 0.02 % (Sigma Aldrich). Cells were further incubated on ice for 30 min with a goat anti-LDLR antibody 1/40 (5 µg/mL) (R&D systems) followed by incubation with an anti-goat secondary antibody labeled with Alexa Fluor 647 1/800 or incubated with DiI-LDL 20 µg/mL (both from Life Technologies). The cell suspension was washed by centrifugation at 300 x g for 5 min then resuspended in a solution of PBS 1X and EDTA 5 mM. FACS analysis was immediately performed on a FACSCanto II (BD Biosciences) using BD FACSDiva software.

### **Peptide-vector synthesis and conjugation to TAMRA and to a human IgG1 Fc fragment**

#### *Synthesis of peptide-vectors and conjugation of TAMRA*

Sequences of the VH411, VH4127 cyclic peptides [25, 26, 27] and their respective scrambled versions VH411Sc and VH4Sc are respectively: DSGL[CMPLRG]cDPR, [cMThzRLRGPen]c, RDRM[CGRDLPC]cGPL and [cRMLGRPCG]c. The cyclic peptides were synthesized using Fmoc SPPS methodology with an automated microwave peptide synthesizer (CEM Corporation, Matthews, NC, USA) as we previously described [22]. Cyclization was performed by disulfide bridge formation using K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] as a mild oxidizing reagent on crude peptides between the first Cys or D-Cys residues and the last Cys or Pen residues. VH411-TAMRA (TAMRA-GGG-VH411-NH<sub>2</sub>) and its scrambled version VH411Sc-TAMRA (TAMRA-GGG-VH411Sc-NH<sub>2</sub>) were obtained from Eurogentec (Angers, France). Briefly, fluorophore conjugation was performed on the N-terminal amine of the peptides. For each peptide, a triglycine linker was introduced in between the fluorophore and the peptides as a flexible spacer. The conjugates were analyzed by RP-HPLC followed by mass spectrometry and purity was superior to 95%. The conjugates were checked for binding the human, mouse and rat LDLR expressed in CHO-LDLR-EGFP cell lines.

### *Chemical coupling of VH4127 and VH4Sc peptides to a human IgG1 Fc fragment*

Conjugation of the VH4127 and VH4Sc peptides to human IgG1 Fc fragment (Merck Millipore) was performed using the heterobifunctional spacer sulfo-SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA). In a first step, both VH4127 and VH4Sc were functionalized on their free C-terminal with cysteamine to generate thiol-modified peptides. In a second step, the Fc fragment was allowed to react with sulfo-SMCC to obtain a reactive protein against thiol moieties. Different molar excess of sulfo-SMCC were added to the Fc fragment in PBS 1X (pH 7.2) to generate conjugates with a controlled coupling valence of the peptides. The reaction was allowed to proceed at room temperature (RT) for 30 min. To remove excess sulfo-SMCC and its by-product resulting from the reaction, the reaction mixture was purified using Dextran Desalting Columns (Pierce). Concentration of the functionalized-Fc was assessed by measuring its absorbance at 280 nm. A colorimetric assay (DTNB, Ellman's reagent, Pierce) was used to quantify the number of functionalized lysine residues. A mean of  $10 \pm 2$  maleimido caproyl spacers were introduced per Fc dimer. In a third step, the resulting functionalized-Fc was mixed to a 5-molar excess of the thiol functionalized VH4127 or VH4Sc peptides. The reaction was allowed to proceed at RT for 1 hr and the mixture was then purified on a Zeba desalting spin column (Pierce). The conjugates (VH4127)<sub>10</sub>-Fc and (VH4Sc)<sub>10</sub>-Fc with n corresponding to the number of maleimido caproyl spacers introduced, as determined before peptide coupling, were named VH4127-Fc and VH4Sc-Fc respectively. Conjugate concentrations were determined using an in house anti-Fc ELISA assay with sensitivity between 50 and 0.50 femtomoles. The conjugates were also checked for binding the human, mouse and rat LDLR expressed in CHO-LDLR-EGFP cell lines.

### **Conjugation of vectorized-Fc to Alexa Fluor 647**

VH4127-Fc was conjugated to the Alexa Fluor 647 fluorophore (A647) using the SAIVI Antibody Labeling Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's recommendations. The degree of labeling (DOL) of A647 per vectorized-Fc was measured using a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, Delaware, USA) and calibrated to an average of 4 fluorophores per conjugate. The conjugate was named VH4127-Fc-A647.

### **Immunocytochemistry, intracellular trafficking and confocal microscopy analysis**

#### *Immunocytochemistry*

Before experiments, CHO-hLDLR-EGFP and WT and *ldlr*<sup>-/-</sup> BMEC monolayers differentiated on insert filters were rinsed with HBSS 1X containing BSA 0.1 % (PAA Laboratories), HEPES 5 mM and gentamycin 50 µg/mL called HBSS-T. The monolayers were transferred to new 12-well plates without astrocytes. After incubation of live cells at 4 °C or 37 °C with either a goat anti-LDLR antibody 5

$\mu\text{g}/\text{mL}$  (R&D systems), Dil-LDL 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  or 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for cell surface binding, Alexa Fluor 647-labeled transferrin 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tf-A647, Life Technologies), and/or the following peptide conjugates, VH411-TAMRA and VH411Sc-TAMRA 2 $\mu\text{M}$ , VH4127-Fc and VH4Sc-Fc 50 nM or 250 nM for cell surface binding, the monolayers were washed three times with HBSS-T and gently dissociated from the insert filters followed by a 20 min fixation in paraformaldehyde (PFA) 4% (w/v) (Sigma Aldrich) prior to immunocytochemistry. After three washes with PBS 1X (Life Technologies), the cells were pre-incubated for 30 min at room temperature (RT) with blocking buffer containing BSA 3% (PAA laboratories) in PBS 1X. The BMEC monolayers were stained for 1 hr in PBS 1X containing BSA 1% (PAA Laboratories), with or without saponine 0.1 % (Sigma Aldrich) for membrane permeabilization, with the following antibodies: a goat anti-LDLR 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (R&D systems), a mouse anti-human IgG Fc fragment 1/100 (Jackson ImmunoResearch), a rabbit anti-Early Endosome Antigen 1 (EEA-1) 1/1000 (Acris antibodies, San Diego, CA, USA) and/or a rabbit anti Lysosomal-Associated Membrane Protein 1 (LAMP-1) 1/1000 (Abcam). Cell nuclei were labeled with Hoechst 33342 1/1000 (Life Technologies) either alone or in co-incubation with the appropriate secondary antibody, donkey anti-goat, anti-mouse and/or anti-rabbit Alexa Fluor 488 or 647, 1/800 (all from Jackson ImmunoResearch). Cells were washed and mounted in Prolong Gold antifade mounting medium (Life Technologies).

#### *Intracellular trafficking*

For the assessment of intracellular trafficking of LDLR, LDL and vectorized-Fc, pulse-chase experiments were designed to follow their intracellular fate in a synchronized manner. In particular, their co-localization with two vesicular compartment markers was analyzed by incubating live BMECs with (i) Tf-A647 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and/or (ii) LysoTracker Blue DND-22 or Red DND-99 50 nM (Life Technologies), for 1 hr at 37 °C. Before and/or after incubation of these compartment markers, the monolayers were washed three times with cold HBSS-T and incubated for 30 min at 4 °C (pulse) with (i) a goat anti-LDLR antibody 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (R&D systems) together with a donkey anti-goat secondary antibody Alexa Fluor 488 (Jackson ImmunoResearch) at equimolarity, (ii) Dil-LDL 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , and/or (iii) VH4127-Fc-A647 250 nM. The end of this pulse step was defined as T<sub>0</sub>. The monolayers were washed with pre-warmed HBSS-T and incubated at 37 °C for 15 min, 30 min or 60 min (chase). After each time point, the monolayers were washed three times with cold HBSS-T and either instantly mounted in HBSS-T for live cell imaging or fixed with PFA 4% (w/v) (Sigma Aldrich) prior to immunocytochemical staining with a rabbit anti-LAMP-1 antibody (Abcam) as described above.

#### *Confocal microscopy*

The mounted slides were observed with a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany). High magnification images were acquired using a 63X HCX PL

APO oil immersion objective and analyzed using the NIH ImageJ software, an independent operating system that has a license-free status (version 1.49o for Mac). Kinetics and quantitative analysis of co-localization between LDLR ligands and the labeled compartments was performed at each chase time from 10 frames using the JACoP plugin of ImageJ software.

### **Quantification of Dil-LDL and vectorized-Fc uptake by and transport across BMEC monolayers**

For each uptake and transport experiment, the astrocytes from the abluminal compartment of the co-culture systems were cultured in serum free condition for 24 hr. The day of the experiment, the inserts containing the BMEC monolayers were gently washed with HBSS-T and transferred to new 6 or 12-well plates without astrocytes. The barrier integrity of the *in vitro* BBB model was controlled for each experiment with Lucifer Yellow (LY CH lithium salt, Sigma Aldrich) a small hydrophilic molecule (MW 457 g/mol) known to be retained by the BBB as previously described [21]. Briefly, quantification of the LY paracellular leakage from the luminal to the abluminal compartment was assessed by fluorimetric analysis (excitation at 430 nm and emission at 535 nm) and expressed in LY permeability,  $Pe_{(LY)}$ . Barrier integrity was validated for  $Pe_{(LY)}$  below  $0.6 \cdot 10^{-3}$  cm/min.

#### *Dil-LDL*

Dil-LDL was diluted in HBSS-T to 5, 10, 20 and 40  $\mu$ g/mL, corresponding respectively to 1, 2, 4 and 8  $\mu$ g/insert and added to the luminal compartment of the inserts (12-well plates, 200  $\mu$ L in the luminal compartment and 1.2 mL in the abluminal compartment) in contact with the BMEC monolayer. The cells were then incubated for 30 min at a 37 °C in a humidified cell culture incubator with 5 % CO<sub>2</sub>. The monolayers were rinsed once with HBSS-T and twice with DPBS 1X then either lysed with 200  $\mu$ L of PBS 1X containing Triton X100 0.1 % for fluorimetric analysis or fixed in PFA 4 % at RT for confocal microscopy analysis. Dil fluorescence was quantified in the cell lysate and in the abluminal compartment by fluorimetric analysis with a spectrofluorimeter with excitation at 554 nm and emission at 571 nm. Fluorescence units were transformed in ng using a linear working range then in ng/cm<sup>2</sup> based on the insert surface (1.1 cm<sup>2</sup> for 12-well plate inserts).

#### *VH411-TAMRA and VH411Sc-TAMRA*

The VH411 peptide and its scrambled control VH411Sc, both conjugated to TAMRA were incubated in the luminal chamber of the culture system at 2  $\mu$ M for 1 hr, 4 hr and 24 hr. Potential cellular toxicity of the peptide conjugates was assessed by evaluation of the barrier integrity *via* co-incubation with LY during the experiments and expressed in LY permeability,  $Pe_{(LY)}$ . The endothelial cell monolayers were lysed with PBS 1X containing Triton X100 0.1% and the media of the abluminal compartment were collected for fluorescence quantification with a spectrofluorimeter with

excitation at 550 nm and emission at 574 nm. The results were expressed in percentage of input for the cell lysate and in TAMRA permeability,  $P_{e(\text{TAMRA})}$  in  $10^{-3}$  cm/min for transport.

#### *VH4127-Fc and VH4Sc-Fc*

VH4127-Fc and VH4Sc-Fc were added to the WT or *ldlr*<sup>-/-</sup> BMEC monolayers (6-well plates, 400  $\mu$ L in the luminal compartment and 3 mL in the abluminal compartment) for 120 min at various concentrations between 5 nM and 135 nM in HBSS-T and at various temperatures, 37 °C or 4 °C. The cellular release of VH4127-Fc was quantified with an adapted pulse-chase experiment. After an incubation of VH4127 50 nM for 1 hr at 37 °C (pulse), BMEC monolayers were washed extensively with HBSS-T following acidic buffer at pH 4.6 (citric acid 25.5 mM, sodium citrate 24.5 mM and sucrose 280 mM buffered to pH 4.6 with NaOH) to eliminate binding at the cell surface. The inserts containing the BMEC monolayers were transferred to new 6-well plates for 2 hr of chase at 37 °C or 4 °C. At each time point, the BMEC monolayers were rinsed once with HBSS-T and twice with DPBS 1X. Cells were then trypsinized and centrifuged at 300 x g for 5 min. The cell pellets were lysed in 100  $\mu$ L of PBS 1X containing Triton X100 0.1%. For the transport experiments, the abluminal compartments (3 mL) were collected and concentrated with an Amicon Ultra-15 10 kDa exclusion column (Merck Millipore) by centrifugation at 3000 x g to a 100  $\mu$ L volume. The content of Fc fragment in the cell lysates and the concentrated abluminal compartments were quantified using the in house anti-Fc ELISA with sensitivity between 50 and 0.50 femtomoles and expressed in moles/cm<sup>2</sup> based on the insert surface (4.7 cm<sup>2</sup> for 6-well plate inserts).

#### **Statistical analysis / Data analysis**

Quantification from RT-qPCR and western blot experiments were obtained from at least 3 independent experiments. At least three inserts (triplicates) containing BMEC monolayers were used for each analysis and all experiments were repeated at least 3 times from independent *in vitro* BBB model preparations. All data are expressed as means  $\pm$  standard deviations. The values were compared using Student's t-test. Results were considered statistically significant at  $p \leq 0.05$  (\*),  $p \leq 0.01$  (\*\*) or  $p \leq 0.001$  (\*\*\*)

## RESULTS

### LDLR expression and localization in BMVs and BMEC monolayers

qPCR was used to assess the steady state levels of LDLR mRNAs relative to GAPDH in BMEC monolayers from BBB *in vitro* models produced from Wistar rats or C57Bl/6 mice, compared to purified brain microvessels (BMVs, the *in vivo* tissue closest to cultured BMECs), to whole cortex (Cx), and to organs known to be enriched in LDLR such as the adrenal glands (AG) and liver (L) [18]. Using a primer pair selected in exons 5 and 6 of the rat LDLR gene, we find that the steady state levels of rat LDLR mRNA are lower in the cerebral cortex as a whole compared to BMVs (11-fold higher) and BMEC monolayers (9-fold higher) suggesting that the brain vascular system contributes significantly to brain LDLR mRNA levels (**Fig. 1a**). In rat samples, the steady state LDLR mRNA levels in BMVs and BMECs are close to those measured in liver and adrenal glands. We observed a similar expression profile in mouse samples with a primer pair selected in exons 1 and 2, except in BMECs where LDLR mRNA levels were lower than in rat, and inversely, in the liver with higher levels than in rat. These differences between these two species were confirmed using another pair of primers (mouse exons 14 and 15), which lead to similar expression levels.

We next analyzed LDLR protein expression in the tissues mentioned above and in particular at the plasma membrane. We validated the anti-LDLR antibodies we used in our study using western blot and immunocytochemistry on CHO cell lines we generated with stable expression of the mouse, rat and human LDLR fused in C-terminal with EGFP (CHO-mLDLR-EGFP, CHO-rLDLR-EGFP and CHO-hLDLR-EGFP respectively). A goat anti-LDLR showed good affinity and specificity for both species, but with a 10-fold better detection of the mouse LDLR, as quantified using densitometry analysis after standardization with EGFP (**Fig. 1b**). The detection of two bands presumably results from differential glycosylation of the protein rather than EGFP cleavage as both bands are observed with the anti-EGFP antibody. Anti-LDLR antibody specificity was confirmed by similar patterns of labeling in more complex lysates from WT cerebral cortex and absence of labeling in *ldlr*<sup>-/-</sup> tissues (**Fig. 1b**).

In order to establish whether the LDLR is readily expressed at the plasma membrane of BMV endothelial cells rather than in the associated astrocytic end feet and pericytes [28], we compared non-digested BMVs (nd-BMV) to collagenase/dispase digested BMVs (BMV) that are enriched in endothelial cells (**Fig. 1c**). The efficiency of the purification by enzymatic digestion is shown by the loss of desmin and GFAP labeling, markers of pericytes and astrocytes respectively. The digested BMVs thus contain essentially endothelial cells, and despite the partial shedding of LDLR by collagenase/dispase as we observed consistently using different approaches (not shown), our data indicates that these cells readily express the LDLR at the plasma membrane. Digested BMVs were used throughout the rest of the study.



To compare LDLR protein expression levels between cortex (Cx), BMVs, BMEC monolayers, adrenal glands (Ag) and liver (L) from rats and mice, western blot analysis was performed on plasma membrane preparations from these tissues (**Fig. 1d**). To compensate for the increased affinity of the goat anti-LDLR antibody for the mouse LDLR compared to rat LDLR (**Fig. 1b**), 100 mg of rat protein samples were loaded on each lane and compared to 10 mg of mouse protein samples. In both species, plasma membrane LDLR levels were higher in BMEC monolayers compared to BMVs and whole cortex (Cx) fractions that showed similar levels. We observed differences for BMECs where LDLR levels were 2-fold lower in mouse than in rat, in agreement with qPCR analysis.

Finally, we assessed the apical/luminal vs. basolateral plasma membrane distribution of the LDLR in BMVs and in BMEC monolayers using sucrose density gradients (**Fig. 1e**). P-glycoprotein (P-gp or multidrug resistance-1 (MDR1) [29], and glutamate transporter-1 (GLT-1) [30], were used as markers of the apical (F1) and basolateral (F3) fractions, respectively. GLT-1 signal was lost in BMEC monolayers, presumably due to an absence of induction by glutamate *in vitro* [31]. In both BMV and BMEC plasma membrane preparations, the LDLR was found essentially in the F1 apical membrane fraction. Altogether, these data demonstrate that the LDLR expressed in the *in vitro* BBB models displays a similar apical distribution to that observed in freshly collected BMVs.

#### **LDLR and LDL intracellular trafficking in BMECs**

We next analyzed the potential of the LDLR expressed at the apical side of the BMEC monolayers to promote LDL transcytosis. Using FACS analysis on BMECs isolated from either WT or *ldlr*<sup>-/-</sup> rats, we confirmed that the LDLR is constitutively expressed on the endothelial cell surface and mediates specific binding of a fluorescent version of its natural ligand LDL (DiI-LDL) (**Fig. 2a**). Transferrin (Tf) has been described to bind the apical Tf-receptor (TfR), which is involved in RMT [32, 33]; we thus used Tf-A647, a fluorescent version of Tf, as a well-established control substrate. To assess the cell surface binding of LDL and early endocytosis events, we co-incubated DiI-LDL and Tf-A647 on live BMEC monolayers for 30 min at 4 °C (**Fig. 2b**). In these conditions, specific cell surface binding of ligands to their respective receptors occurred while limiting further vesicular trafficking. At the end of this procedure, apical, ligand-accessible LDLR was stained using anti-LDLR immunostaining. The extent of DiI-LDL binding correlates well with the differential cell surface expression of LDLR, suggesting that LDL binding to BMECs is indeed LDLR-mediated. Confocal microscopy analysis revealed many DiI-LDL/LDLR co-localized clusters at the cell surface, some of them also containing Tf-A647. Interestingly, LDLR/LDL and TfR/Tf complexes clustering events occurred in the same cell surface subdomains, suggesting a similar endocytic route for LDL and Tf in BMECs. Further observation showed that some of the DiI-LDL/Tf-A647 overlaps do not co-localize with LDLR. These events most likely correspond to already invaginated, perimembrane vesicles that

are no longer accessible to the anti-LDLR antibody. Finally, some cell surface LDLR clusters were observed with no co-localizing DiI-LDL. Such observations might result from recycling events of the receptor at the cell surface that may have occurred during the wash procedure in ligand-free medium prior to the fixation step. Taken together, these results indicate that LDL binding to the apical side of BMECs occurred via LDLR and suggests an entry route similar to that of Tf.

The potential involvement of the LDLR in RMT in our *in vitro* BBB models was assessed by analyzing the intracellular fate of DiI-LDL subsequent to its specific binding to cell-surface LDLR using a pulse-chase approach (**Fig. 3a**). Briefly, the pulse was performed by incubating LDLR ligands, including an anti-LDLR antibody or DiI-LDL, on BMEC monolayers for 30 min at 4 °C, as previously performed (**Fig. 2b**). After extensive washes, different chase periods were performed by shifting cells from 4 °C to 37 °C to allow ligand endocytosis and intracellular trafficking. Tf-A647 and LysoTracker Blue DND-22, a viable fluorophore readily entering acidic subcellular organelles, were continuously incubated at 37 °C before the pulse and/or during the chase to allow staining of the Tf-positive and lysosomal compartments, respectively. Qualitative and quantitative analysis of co-localization between LDLR ligands and these markers was then assessed to determine their main intracellular trafficking route.

This pulse-chase approach was first used to assess on live BMEC monolayers the intracellular fate of the apical LDLR once engaged in its endocytotic route. In these experiments, cell surface LDLR was tracked by co-incubating an anti-LDLR antibody together with its fluorescent secondary antibody. Our kinetic and quantitative analysis demonstrated that LDLR progressively engaged the Tf-positive route (**Fig. 3b**), as evidenced after 1 hr chase on a representative frame (**Fig. 3c**). We next assessed the intracellular trafficking of DiI-LDL in BMECs using the same pulse-chase approach (**Fig. 3d**). At the end of the pulse, surface and perimembrane DiI-LDL particles did not co-localize with any of the intracellular compartment markers. No significant overlap was observed between both the Tf-positive and lysosomal compartments at any chase time, confirming that they label distinct compartments in BMECs. As opposed to the typical delivery of LDL to lysosomes in epithelial cells (K. Varini *et al.*, manuscript submitted) [17, 18], DiI-LDL did not accumulate in BMEC lysosomes, even after 1 hr chase as shown on a representative frame (**Fig. 3e**). Rather, LDL progressively engaged the same Tf-positive compartment as the LDLR, with very similar kinetics. Taken together our results indicate that (i) the apical LDLR displays a temperature-dependent endocytosis activity in our *in vitro* BBB model, (ii) after binding to apical LDLR, LDL particles engage the same intracellular trafficking route as LDLR and Tf that bypasses the lysosomal compartment. These observations strongly support the involvement of apical LDLR expressed in our *in vitro* BBB model in a process that promotes LDL transcytosis rather than lysosomal delivery.

BMEC monolayers prepared from either WT or *ldlr*<sup>-/-</sup> rats were used to further confirm the functional role of endothelial LDLR in LDL transcytosis. Confocal microscopy analysis confirmed that the cellular uptake of an anti-LDLR antibody (**Fig. 4a**) and Dil-LDL (**Fig. 4b**) was indeed specifically mediated by LDLR since no uptake was observed in BMEC monolayers prepared from *ldlr*<sup>-/-</sup> rats. Next, we used fluorimetric analysis to quantify the LDLR-dependent uptake and transport of Dil-LDL, and increasing doses were incubated for 30 min at 37 °C in the luminal compartment of WT and *ldlr*<sup>-/-</sup> BMEC monolayers (**Figs. 4c, d**). Unexpectedly, in WT monolayers, Dil-LDL uptake was linear with increasing doses of input, with no saturation up to the highest dose tested of 8 µg Dil-LDL/insert (40 µg/mL) (**Fig. 4c**). In *ldlr*<sup>-/-</sup> BMEC monolayers, Dil-LDL uptake also increased in a dose-dependent manner, suggesting at least partial non-specific Dil-LDL binding to or uptake by BMEC monolayers; however, the extent of cellular uptake was significantly lower than in WT cells at any dose tested, indicating that Dil-LDL uptake was in part LDLR-dependent. To quantify Dil-LDL transport across BMEC monolayers and evaluate the direct contribution of LDLR in this process, Dil fluorescence was quantified in the abluminal compartment at the end of the incubation period (**Fig. 4d**). Consistent with its LDLR-dependent uptake, Dil-LDL transport was significantly higher in WT than in *ldlr*<sup>-/-</sup> BMEC monolayers. Interestingly, Dil-LDL transport did not correlate with the uptake curve as it reached saturation as of 2-4 µg Dil-LDL per insert, as would be expected from a specific RMT process.

Taken together, our results show that in *in vitro* BBB models, the LDLR is expressed at the apical plasma membrane, as in freshly collected brain microvessels. Apical LDLR specifically binds its natural ligand LDL, which is subsequently delivered to a Tf-positive compartment that bypasses lysosomes. Our transport studies from WT and *ldlr*<sup>-/-</sup> BMEC monolayers demonstrate significant LDLR-dependent transendothelial transfer of LDL. These *in vitro* models confirm the involvement of LDLR in a RMT process at the BBB and were used in further experiments to analyze the potential of our LDLR-targeted peptide ligands to engage the same trafficking route and to transport different cargos across BMEC monolayers.

### **Uptake by and transport across BMEC monolayers of the LDLR-targeted VH411-TAMRA**

A family of cyclic peptide-vectors that unambiguously bind the human, rat and mouse LDLR (hLDLR, rLDLR, mLDLR, respectively) was initially generated by biopanning using phage display strategies on cell lines expressing the hLDLR. This peptide family presented a MPR-consensus/conserved central motif surrounded by two cysteines. VH411 (peptide 1 in Malcor *et al.*, 2012) [22], the most potent of the hit peptides was shown to bind EGF repeats of the LDLR and consequently do not compete with the main endogenous ligand LDL [22]. VH411 and its scrambled version VH411Sc were conjugated at their N-terminal amine to tetramethylrhodamine (TAMRA), via a triglycine flexible spacer (**Fig. 5a**). Incubation of VH411-TAMRA on a CHO cell line expressing the

hLDLR-EGFP confirmed its LDLR-dependent uptake (**Fig. 5b**). On BMEC monolayers, we show that VH411-TAMRA and its scrambled control VH411Sc-TAMRA were non-toxic for endothelial cells, as we found no evidence of altered permeability of the BMEC monolayers during 24 hr analysis (**Fig. 5c**). Uptake of VH411-TAMRA was 3-fold higher than its scrambled version as early as 1 hr of incubation and the difference increased to 12-fold over time (**Fig. 5d**). No apparent transport across the BMEC monolayers was observed after 1 or 4 hr incubation, presumably due to slow transport process either through the cell monolayer or across the collagen matrix and polyethylene filter of the insert. However, after 24 hr incubation, a significant accumulation (6-fold) of VH411-TAMRA was observed in the abluminal compartment compared to its scrambled version (**Fig. 5e**). These results provided initial evidence that the VH411 peptide had the potential to be transported across the BBB *in vitro* and to be further developed as a peptide-vector for the transport of molecules across the BBB. Using medicinal chemistry, shorter versions of VH411, encompassing natural or non-natural amino acids were developed and selected for their higher binding affinity to LDLR and increased plasma stability [22]. Among the more recent peptides we developed is VH4127 [cMThzRLRGPen]c that also encompasses non-natural amino acids and has an affinity of 22.4 nM, as assessed by surface plasmon resonance (SPR), and a stability of 4.0 hrs in mouse blood [27].

#### **Uptake of vectorized-Fc in BMEC monolayers**

In order to evaluate the potential of our optimized peptides to promote LDLR-mediated uptake and transport of a protein cargo in the *in vitro* BBB models, they were conjugated to the Fc fragment of a human IgG1 antibody used as a prototypic protein. The lead peptide-vector, VH4127 was chemically coupled to Fc on lysine side chains to generate VH4127<sub>n</sub>-Fc, with n an average of 10 peptides per dimeric Fc (**Fig. 6**). In some experiments, VH4127-Fc-A647, comprising an average of 4 Alexa Fluor 647 per dimeric Fc, was used to allow direct tracking in both degradative and non-degradative intracellular compartments. We also used the all-natural 8 amino acid VH434 peptide (peptide 19 in Malcor *et al.*, 2012) [22], which was inserted in C-terminal of the Fc fragment to generate a recombinant (VH434)<sub>2</sub>-Fc fusion protein (two peptides per dimeric Fc). In the present study, similar results were obtained with the recombinant and chemically coupled vectorized-Fc, but only the latter are illustrated. These vectorized-Fc demonstrated specific LDLR-dependent uptake in LDLR-expressing epithelial cells with affinities in the sub-nanomolar range as assessed using SPR (not shown). Finally, a scrambled version of VH4127, namely VH4Sc [cRMLGRPCG]c, was used as a negative control.

We confirmed that chemical conjugation of the peptides on the Fc fragment does not alter its detection by secondary antibodies, either in immunocytochemistry or ELISA experiments (**Fig. 7**). The uptake of the vectorized-Fc was assessed on WT and *ldlr* *-/-* *in vitro* BBB models and their

intracellular fate was compared to that of DiI-LDL. Following 30 min incubation at 37 °C in the luminal compartment, confocal microscopy analysis shows that the VH4127-Fc was readily endocytosed and co-localized almost perfectly with DiI-LDL, while we found no uptake of either VH4Sc-Fc by the WT monolayers or VH4127-Fc and DiI-LDL by the *ldlr* <sup>-/-</sup> monolayers (**Fig. 7a**). In this steady-state condition, both VH4127-Fc and DiI-LDL co-localized with the early endosome marker EEA-1, which strongly suggests that both LDLR ligands accumulate inside the BMECs in non-degradative compartments (**Fig. 7b**). These experiments also show that the cellular heterogeneity in DiI-LDL uptake correlated well with that of VH4127-Fc, strengthening the idea of a direct contribution of LDLR and an identical entry route for both ligands.

We also used ELISA to quantify uptake of the vectorised-Fc by the BMEC monolayers. After 2 hr incubation of VH4127-Fc and the VH4Sc-Fc, we show a significant 2.5-fold higher uptake of VH4127-Fc compared to VH4Sc-Fc in WT BMEC monolayers and also a 2-fold higher uptake when compared to *ldlr* <sup>-/-</sup> monolayers (**Fig. 7c**). Taken together, our results show a significant contribution of LDLR in the uptake of VH4127-Fc by the BMEC monolayers and suggest that it accumulates inside BMECs in non-degradative endosomal compartments.

### **Intracellular trafficking of vectorized-Fc in BMECs**

In order to get further insight into the intracellular trafficking route of our vectorized-Fc, we used a pulse-chase approach as previously performed with DiI-LDL alone (**Fig. 3a**). We first assessed the cell surface binding and early endocytosis events by incubating VH4127-Fc on live BMEC monolayers for 30 min at 4 °C (**Fig. 8a**). After cell fixation and cell surface anti-LDLR and anti-Fc immunostaining, confocal microscopy analysis revealed that most VH4127-Fc co-localized with LDLR clusters at apical plasma membranes. As observed with DiI-LDL (**Fig. 2b**), the extent of VH4127-Fc binding correlates with the differential cell surface expression of LDLR. These observations confirm that apical LDLR is directly involved in the binding of our vectorized-Fc.

Using the pulse-chase approach to synchronize intracellular trafficking events (**Fig. 8b**), we confirm here using VH4127-Fc-A647 that allows direct tracking even in the degradative environment of lysosomes, that neither LDL nor the conjugate enter LAMP-1-positive lysosomes. Rather, both ligands accumulate in small vesicles in a separate compartment that was shown in previous experiments to be Tf-positive and EEA-1-positive (**Figs. 3, 7**). Of note, we show that both the acidic/lysosomal marker LysoTracker Red DND-99 and the anti-LAMP-1 immunostaining reveal the same enlarged lysosomal compartments (**Fig. 8c**).

### **Quantification of the transendothelial transfer of vectorized-Fc in BMECs**

To assess the potential of vectorized-Fc to cross the BMEC monolayers, we used anti-Fc ELISA

to quantify the cellular uptake, release and transport from the luminal to the abluminal compartment of VH4127-Fc (**Fig. 9**). Following 2 hr incubation on BMECs at concentrations ranging from 5 nM to 135 nM, VH4127-Fc shows a specific and dose-dependent uptake (**Fig. 9a**). This uptake reached an apparent saturation around 50 nM, further suggesting the involvement of a specific and saturable receptor-mediated process. Evaluation of the cellular release of the VH4127-Fc was performed using an adapted pulse-chase approach (**Fig. 9b**). VH4127-Fc was first allowed to accumulate inside BMECs during 1 hr at 37 °C (pulse). At the end of this pulse, the monolayers were rinsed with acidic buffer at pH 4.6 to eliminate non-specific surface binding. They were then transferred to new wells with ligand-free buffer and incubated for an additional 2 hr at 4 °C or 37 °C to prevent or allow, respectively, temperature-dependent release of VH4127-Fc (chase). At 4 °C, the VH4127-Fc level in the BMEC monolayer lysates was similar to that observed at the end of the pulse, suggesting very limited release. However, VH4127-Fc release was significant when performed at 37 °C (3.5-fold decrease from the end of the pulse), confirming the implication of specific and temperature-dependent mechanisms.

Finally, we assessed on a same set of inserts the binding (monolayer lysate after 4 °C incubation), endocytosis (monolayer lysate after 37 °C incubation) (**Fig. 9c**), and transport (luminal to abluminal compartment at 4 °C and 37 °C) of VH4127-Fc (**Fig. 9d**). Based on previous experiments showing that the specific transport of VH4127-Fc is saturable, with non-specific paracellular leakage as of 50 nM, the following experiments were performed at 10 nM of VH4127-Fc. Consistent with previous observations performed at higher concentrations (**Fig. 7c**), BMEC binding and endocytosis of VH4127-Fc significantly increased when compared to VH4Sc-Fc by 41-fold and 12-fold, respectively (**Fig. 9c**). Quantification of VH4127-Fc accumulated in the abluminal compartment shows that incubation at 4 °C, while allowing binding, prevents transport across the monolayer. On the contrary, incubation at 37 °C restores temperature-dependent transport processes and correlates with a significant 5-fold increase of VH4127-Fc accumulation in the abluminal compartment, suggesting active transendothelial transport (**Fig. 9d**).

Altogether, we demonstrated that our LDLR-targeted vectorized-Fc and LDL follow a similar LDLR-dependent trafficking route across BMEC monolayers, as shown by their (i) binding to apical LDLR, (ii) endocytosis and co-localization with a marker of the endosomal compartment, (iii) engagement of a similar Tf-positive route that bypasses the degradative lysosomes, and (iv) temperature-dependent accumulation in the abluminal compartment, indicative of a transcytotic process.

## DISCUSSION

The development of novel drugs to treat CNS diseases, in particular those based on biomolecules such as peptides [34], and proteins, including antibodies, will rely on efficient delivery of these drugs across the BBB. Among the strategies presently under investigation and clinical validation is the development of peptide or antibody vector molecules that improve CNS drug delivery across the BBB via specific receptors involved in RMT. In the present study we determined the plasma membrane localization of BMEC LDLR and we investigated in WT and *ldlr*<sup>-/-</sup> *in vitro* models of the BBB whether the LDLR mediates efficient transcytosis of LDL and whether the LDLR-targeting peptide-vectors we developed previously were able to transfer payloads across the BBB.

### **The LDLR is expressed at the apical plasma membrane of BMECs**

We showed that mouse and rat BMVs express LDLR mRNA steady state levels that are in the range of tissues known for high LDLR expression such as the liver or adrenal glands, and significantly higher than global cerebral cortex. This indicates that BMVs rather than brain parenchyma cells contribute significantly to LDLR mRNA expression in the brain of both species. Results on plasma membrane LDLR levels in the cortex compared to BMEC monolayers, liver and adrenal glands corroborate to some extent the mRNA expression results. A significant proportion of plasma membrane LDLR was expressed by endothelial cells besides astrocytes or pericytes, also known to express this receptor [28]. In contrast with our qPCR analysis, the plasma membrane expression levels of LDLR in BMVs from both mouse and rat is in the range of the cortex, thus lower than those measured in liver or adrenal glands. The discrepancy between LDLR mRNA levels and protein expression in BMVs may stem from either plasma membrane LDLR shedding during BMV enzymatic treatment, or high steady-state levels of LDLR mRNAs that are not translated in BMVs. The latter hypothesis could reflect a potential for regulation of LDLR expression and plasma membrane sorting depending on the extent of BMEC differentiation, known to modulate LDLR expression and LDL uptake [35], and on cellular needs and environment. Consistently, regulation of LDLR expression in BMECs differs from that in the periphery. For instance in the liver, LDLR expression is modulated by the plasmatic lipid flux, while in BMECs it appears that surrounding astrocytes and their lipid requirements regulate BMEC LDLR expression [36]. Indeed, we show that plasma membrane LDLR levels are higher in BMECs homogeneously differentiated with astrocytes, compared to freshly extracted BMVs originating from heterogeneous locations of the vascular bed (microcapillaries, arterioles or venules), known to display high functional and metabolic heterogeneity [37, 38]. To our knowledge, our results are the first to show that the LDLR is preferentially located in apical rather than basolateral membrane fractions of both BMVs and BMEC monolayers, further suggesting a role for the BBB LDLR in ligand uptake from the blood stream. This is in contrast with LRP1, another

receptor of the LDLR family, whose expression is higher in astrocytes, pericytes and neurons compared to the cerebral endothelium where it is preferentially localized in the basolateral membrane [39, 40].

### **The LDLR is involved in a RMT process at the BBB**

We studied Dil-LDL binding to LDLR, intracellular trafficking of the ligand/receptor complex and Dil-LDL transport into the abluminal compartment using *in vitro* BBB models prepared from WT and *ldlr* *-/-* BMECs. In particular we compared Dil-LDL and LDLR trafficking with that of Tf-A647, a fluorescent ligand of the TfR that has been described as a recycling receptor involved in transcytosis at the BBB [32, 33, 41, 42]. In our experiments, cell surface co-localization of both Dil-LDL and LDLR with Tf-A647 indicates that binding of these ligands occurs, at least in part, at similar membrane subdomains. Although we did not characterize the nature of these membrane subdomains, our results suggest that both TfR and LDLR engage a similar entry route in BMECs. Initial reports suggested that the Tf/TfR complex enters BMECs via a clathrin-dependent route [42]. However, other studies, including on the LDLR, rather highlight the caveolin-dependent pathway as a general mechanism underlying transcytosis [43, 44]. This contrasts with the clathrin-dependent endocytosis route of LDLR in epithelial cells [18]. Taken together, the observations on LDLR are indicative of differential uptake mechanisms and intracellular trafficking routes depending on tissues. It is thus likely that in endothelial cells LDL enters the endosomal compartment via an LDLR-dependent pathway and, like Tf, is either recycled back to the cell surface or engages a transcytotic route. This hypothesis is further supported by our results indicating that Dil-LDL appears to undergo minimal trafficking to the lysosomes in BMECs. The mechanism of LDLR-mediated LDL endocytosis and trafficking to the lysosomal compartment has been extensively described in the periphery, in particular in epithelial cells, where LDL is released in sorting endosomes and subsequently degraded in lysosomes to sustain cholesterol-dependent physiological processes [17, 18]. In contrast, very little is known concerning LDL uptake and trafficking in BMECs. The involvement of LDLR in a RMT process has been described in a bovine *in vitro* model of the BBB, and in agreement with our results, the LDL was shown to undergo transcytosis [36, 43, 45].

Biochemical assessment of Dil-LDL uptake by BMEC monolayers showed a significant 2-fold difference at increasing doses in the WT compared to *ldlr* *-/-* BMECs. However, *ldlr* *-/-* BMEC bound Dil-LDL to some extent and ligand uptake was proportional to input in both WT and *ldlr* *-/-* BMEC monolayers, with no saturation as would be expected for a receptor-mediated process. This could be due to non-specific binding of Dil-LDL to BMECs and/or to binding to other lipoprotein receptors [18, 46, 47]. In contrast with Dil-LDL uptake, its transport across the monolayers reached saturation, suggesting that Dil-LDL transcytosis across the BMEC monolayers is indeed receptor-mediated. When



using confocal microscopy approaches, which involve more drastic washing procedures than those implemented in the biochemical approaches, Dil-LDL showed no binding and endocytosis in *ldlr* *-/-* BMECs indicating first that biochemical analysis involved some non-specific binding of Dil-LDL on WT or *ldlr* *-/-* BMECs, and second that LDL uptake and consequently transport in BMECs is nearly exclusively LDLR-dependent.

Brain cholesterol primarily results from *de novo* synthesis and lipoprotein cholesterol transport across the BBB in physiological conditions was reported to be a slow process in the adult [19]. The potential for modulation of LDLR expression in BMECs, its preferential localization in the apical membrane of BMVs and BMECs, and its involvement in transcytosis across BMEC monolayers question the role of this receptor at the BBB and whether it is a legitimate target for CNS drug delivery via RMT. One hypothesis is that *in vivo*, the BBB LDLR is preferentially involved in the transport of other ligands than ApoB-bound cholesterol [18]. Another hypothesis is that the BBB LDLR may be mobilized in situations of compromised brain cholesterol metabolism and notably in neurological disorders such as Huntington's disease and Tangier disease, also known as familial alpha-lipoprotein deficiency [48-50]. Altogether, there is strong evidence that the LDLR is located at apical membranes of BMECs where it specifically binds LDL and engages a transcytosis route while bypassing the degradative lysosomal compartment. LDLR transport mechanisms at the BBB could thus be used for CNS drug delivery.

### **Development of LDLR-targeting peptide-vectors that transport payloads across the BBB**

We rationally characterized and optimized a family of peptides that encompass a consensus motif, that bind the LDLR EGF repeats and consequently do not compete with the main endogenous ligand LDL, and that were validated *in vitro* and *in vivo* [22]. They unambiguously target the human but also rodent LDLR with similar affinities thus allowing preclinical studies. This is an important asset considering that some drug delivery systems based on anti-TfR or anti-IR antibodies that are efficient in animal models need to be humanized prior to clinical evaluation [51, 52]. In the present work, we showed that the peptide-vectors we developed such as the VH411 peptide were readily transported across *in vitro* BBB models when conjugated to a TAMRA fluorophore with a 6-fold increase compared to the scrambled version within 24 hr. In similar *in vitro* BBB models, the most potent peptides developed to bind the LRP1 receptor for drug delivery across the BBB reached 15.8%  $\pm$  5.1 at 1 hr incubation [11], suggesting differential rates of transcytosis depending on the target receptors and/or the peptide-vectors developed.

The peptide-vectors we developed can be reduced to 8 amino acids long, hence among the shortest RMT peptide-vectors described to date. They can be composed of all natural amino-acids for expression in fusion proteins and have also been chemically optimized with the insertion of one or

several non-natural amino-acids which confer good stability compared to linear, all natural peptide-vectors described to date such as the MTfp [10], Ang-2 [11, 12], ApoB-BD [13, 14], and different ApoE-BD [15, 16]. For instance, the VH445 [cMPRLRGC]c peptide-vector we developed encompasses a non-natural Cys and showed efficient transfer of conjugated rhodamine Red-X into the CNS as observed by two-photon microscopy (peptide 22 in Malcor *et al.*, 2012) [22]. VH445 was also used to functionalize paclitaxel-loaded nanoparticles used in a dual-targeting strategy for BBB and brain cancer as LDLR appears over-expressed in glioblastoma cells [53], and showed improvement of nanoparticle brain penetration as well as efficacy by increasing the survival time of the treated mice [54]. In the present work, we also show that upon chemical conjugation or in frame fusion in C-ter to an Fc-fragment, the peptide-vectors promoted LDLR-dependent uptake by BMECs. Indeed, in contrast with Dil-LDL evoked above, VH4127-Fc uptake reached saturation after 2 hr incubation on BMEC monolayers, which was reduced on *ldlr* *-/-* monolayers, indicative of a receptor-uptake process, and binding specificity for the cell surface LDLR. The 12-fold increase of VH4127-Fc versus VH4Sc-Fc uptake by the rat BMEC monolayers vs 2.5-fold in the mouse BMEC monolayers, may be related to the reduced LDLR mRNA and protein expression we observed in mouse BMECs compared to rat. Both the VH4127 and ApoB peptides target the LDLR, as well as the ApoE peptides to some extent. They can thus be compared in their transport efficiency in *in vitro* BBB models, although comparisons between different functionalized or fusion proteins with specific properties should be handled with caution. Fusing the ApoE-BD to iduronidase induced 3.6-fold accumulation of the conjugate versus free (non-vectorized) enzyme over a period of 3 hr [15]. When fused to neprilysin, the ApoB-BD increased the transport rate of the fusion protein by 45% compared to free neprilysin in an *in vitro* BBB model [14]. Interestingly, the ApoB, ApoE-I, ApoE-II and Ang-2 targeting peptides were recently compared for their potential to transport the lysosomal enzyme arylsulfatase A (ASA) across an *in vitro* model of the BBB and into the brain when expressed in fusion in the C-ter of the recombinant enzyme [16]. The 5-fold increase in active transport we observed with vectorized-Fc within 2 hr is higher than the best transport rate described within 24 hr with the ASA-ApoB fusion compared to ASA (2.2-fold).

### **Endothelial trafficking of LDLR-targeted Fc conjugates: bypass of lysosomal compartment**

We show that vectorized-Fc and LDL follow similar intracellular routes in BMECs, presumably the Tf-positive-recycling/transcytotic route. At steady-state, both ligands perfectly co-localized in an EEA-1-positive vesicular compartment. When chased after 30 min incubation at 4 °C in order to synchronize their intracellular trafficking, the ligands accumulated in rather small vesicular compartments that bypass the larger LysoTracker and LAMP-1-positive lysosomal compartment. Taken together, these complementary approaches provide mechanistic insights on their

transendothelial transfer into the abluminal compartment. The absence of trafficking of our conjugates in BMEC lysosomal compartment, in agreement with the Dil-LDL results, is of utmost importance. We have evidence that this is not due to loss of tracer or degradation of the conjugates in this compartment that would preclude their detection. Indeed, pulse-chase experiments were performed using a vectorized-Fc covalently coupled to a non-degradable fluorophore. Our observations may result either from the intrinsic trafficking properties of the LDLR in BMECs, or from specific properties of our peptide-vectors, their coupling valency and binding affinity. While low affinity may be deleterious for specific and efficient receptor targeting, high affinity and/or vectors with multivalent binding to target receptors may impede their release in the brain parenchyma. The peptide-vectors we developed have significant affinity for the LDLR, in the nanomolar range, and in our study, the affinity of the (VH4127)<sub>10</sub>-Fc was close to that of good antibodies, in the sub-nanomolar range, which unfortunately cannot be compared with the affinities of the ApoB or ApoE peptides that to our knowledge are not described. By comparison, the Ang-2-trastuzumab conjugate (4 Ang-2 peptides per antibody) proved efficacy in a brain tumor model although the conjugate affinity for the LRP1 target receptor was in the micromolar range [12]. While the TfR is described as a prototypic recycling receptor with low lysosomal trafficking as evoked above, bivalent antibodies developed to target the TfR initially showed modest level of transcytosis across the BBB [55]. This was recently shown to be due, at least in part, to the induction of TfR dimerization and re-routing towards lysosomes [56]. Such problems were circumvented by decreasing the apparent affinity, or avidity, of TfR-targeted antibodies either by using chimeric monovalent forms [56, 57], or by genetically engineering binding domains with lower affinity at endosomal pH [58]. By comparison with anti-TfR antibody based strategies, we demonstrate here that the coupling of up to 10 peptide-vectors to an Fc fragment of an IgG1, although allowing efficient LDLR-mediated endocytosis in BMECs, does not redirect the LDLR and the conjugate to lysosomes. As already mentioned this may result from specific binding properties of our peptide-vectors towards the LDLR that may not interfere with its transcytotic and recycling functions at the BBB. Alternatively, the LDLR may be endowed with intracellular trafficking properties that differ from those of the TfR. This hypothesis would highlight the BBB LDLR as an attractive alternative target for the development of targeted brain delivery strategies.

In the present study we provide evidence that the LDLR expressed at the apical side of BBB endothelial cells is a *bona fide* receptor for CNS drug delivery via RMT. We also show that the LDLR-binding peptides we have discovered and optimized are efficient vector molecules endowed with potential for transendothelial transfer of different classes of molecules, ranging from small organic molecules to proteins (a fluorophore and Fc fragment in the present study), to siRNAs, peptides and nanoparticles [54]. As a proof of concept, the strategy we developed is scalable to other attractive

receptors and to alternative types of vectors.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The UMR7259 laboratory acknowledges financial support from the CNRS and from Aix-Marseille Université. Financial support to VECT-HORUS is acknowledged from the Fonds Unique Interministériel (FUI/ MEDUL project) and to the UMR7259 laboratory and VECT-HORUS from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) for the TIMPAD, ADHOC, PREVENTAD, VECtoBrain, and VEC2brain collaborative projects.

## **DISCLOSURES**

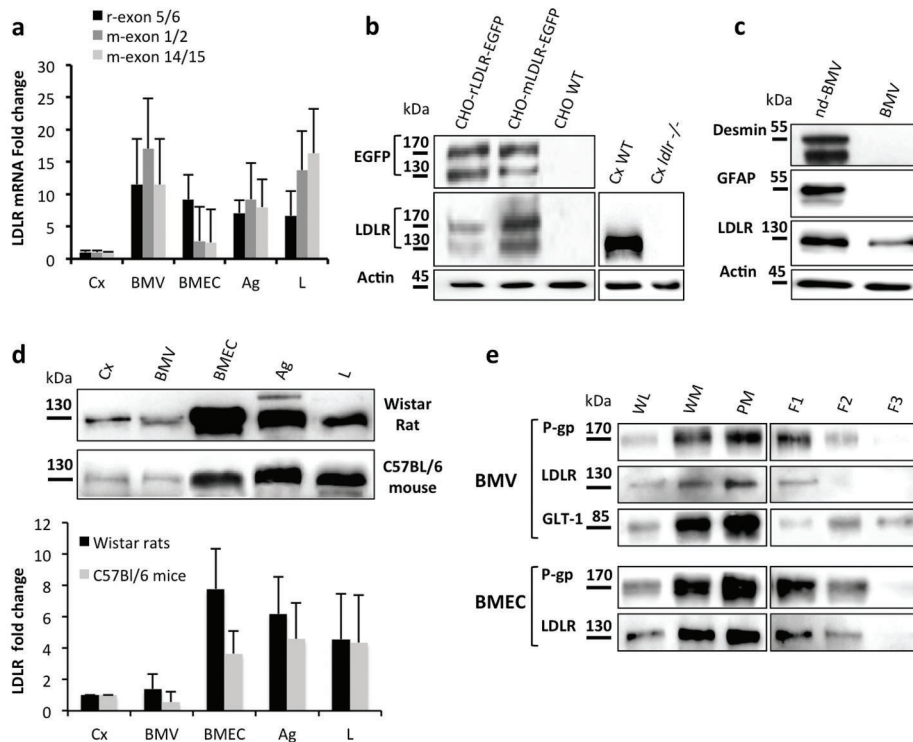
Michel Khrestchatisky is director of the UMR7259 laboratory, co-founder, share-holder and scientific counsel of the VECT-HORUS biotechnology company.

## REFERENCES

1. Vlieghe P, Khrestchatskiy M (2013) Medicinal chemistry based approaches and nanotechnology-based systems to improve CNS drug targeting and delivery. *Med Res Rev* 33: 457-516.
2. Tamsamani J, Vidal P (2004) The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discov Today* 9: 1012-1019.
3. Georgieva JV, Hoekstra D, Zuhorn IS (2014) Smuggling Drugs into the Brain: An Overview of Ligands Targeting Transcytosis for Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics* 6: 557-583.
4. Pardridge WM, Boado RJ (2012) Reengineering biopharmaceuticals for targeted delivery across the blood-brain barrier. *Methods Enzymol* 503: 269-92.
5. Shamenkov DA, Petrov VE, Alyautdin RN (2006) Effects of apolipoproteins on dalargin transport across the blood-brain barrier. *Bull Exp Biol Med* 142: 703-706.
6. Zensi A, Begley D, Pontikis C, Legros C, Mihoreanu L, Wagner S, Büchel C, von Briesen H, Kreuter J (2009) Albumin nanoparticles targeted with ApoE enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *J Control Release* 137: 78-86.
7. Pan W, Kastin AJ, Zankel TC, van Kerkhof P, Terasaki T, Bu G (2004) Efficient transfer of receptor-associated protein (RAP) across the blood-brain barrier. *J Cell Sci* 117: 5071-5078.
8. Karkan D, Pfeifer C, Vitalis TZ, Arthur G, Ujiie M, Chen Q, Tsai S, Koliatis G, Gabathuler R, Jefferies WA (2008). A unique carrier for delivery of therapeutic compounds beyond the blood-brain barrier. *PLoS One* 3: e2469.
9. Vlieghe P, Khrestchatskiy M (2010) Peptide-based vectors for blood-brain barrier targeting and delivery of drugs to the central nervous system. *Ther Deliv* 1: 489-494.
10. Jeffries W, Tian MM, Vitalis T (2015) P97 Fragments with transfer activity. Patent Application US 2015/0056218.
11. Demeule M, Régina A, Ché C, Poirier J, Nguyen T, Gabathuler R, Castaigne JP, Béliveau R (2008) Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther* 324: 1064-1072.
12. Regina A, Demeule M, Tripathy S, Lord-Dufour S, Currie JC, Iddir M, Annabi B, Castaigne JP, Lachowicz JE (2015) ANG4043, a Novel Brain-Penetrant Peptide-mAb Conjugate, Is Efficacious against HER2-Positive Intracranial Tumors in Mice. *Mol Cancer Ther* 14: 129-140.
13. Sorrentino NC, D'Orsi L, Sambri I, Nusco E, Monaco C, Spampanato C, Polishchuk E, Saccone P, De Leonibus E, Ballabio A, Fraldi A (2013) A highly secreted sulphamidase engineered to cross the blood-brain barrier corrects brain lesions of mice with mucopolysaccharidoses type IIIA. *EMBO Mol Med* 5: 675-690.
14. Spencer BJ, Verma IM, Desplats P, Morvinski D, Rockenstein E, Adame A, Masliah E (2014) A neuroprotective brain-penetrating endopeptidase fusion protein ameliorates Alzheimer disease pathology and restores neurogenesis. *J Biol Chem* 289: 17917-17931.
15. Wang D, El-Amouri SS, Dai M, Kuan CY, Hui DY, Brady RO, Pan D (2013) Engineering a lysosomal enzyme with a derivative of receptor-binding domain of apoE enables delivery across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 2999-3004.
16. Böckenhoff A, Cramer S, Wölte P, Knieling S, Wohlenberg C, Gieselmann V, Galla HJ, Matzner U (2014) Comparison of five peptide-vectors for improved brain delivery of the lysosomal enzyme arylsulfatase A. *J Neurosci* 34: 3122-3129.
17. Dunn KW, McGraw TE, Maxfield FR (1989) Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J Cell Biol* 109: 3303-3314.
18. Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A (1999) The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr* 19: 141-172.
19. Dietschy JM, Turley SD (2004) Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res* 45: 1375-1397.
20. Méresse S, Delbart C, Fruchart JC, Cecchelli R (1989) Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem* 53: 340-345.

21. Molino Y, Jabès F, Lacassagne E, Gaudin N, Khrestchatsky M (2014) Setting-up an *in vitro* model of rat blood-brain barrier (BBB): a focus on BBB impermeability and receptor-mediated transport. *J Vis Exp* 88: e51278.
22. Malcor JD, Payrot N, David M, Faucon A, Abouzid K, Jacquot G, Floquet N, Debarbieux F, Rougon G, Martinez J, Khrestchatsky M, Vlieghe P, Lisowski V (2012) Chemical optimization of new ligands of the low-density lipoprotein receptor as potential vectors for central nervous system targeting. *J Med Chem* 55: 2227-2241.
23. Dehouck MP, Méresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R (1990) An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neurochem* 54: 1798-1801.
24. Kannan R, Mittur A, Bao Y, Tsuruo T, Kaplowitz N (1999) GSH transport in immortalized mouse brain endothelial cells: evidence for apical localization of a sodium-dependent GSH transporter. *J Neurochem* 73: 390-399.
25. Khrestchatsky M, David M, Molino Y, Vlieghe P (2010) Peptide derivatives and use thereof as carriers for molecules in the form of conjugates. Patent Application WO 2010/046588 (Issued in the US, Europe and South Africa. Pending in other countries).
26. Vlieghe P, David M, Molino Y, Khrestchatsky M (2011) Peptide derivatives, their preparation and their uses. Patent Application WO 2011/131896 (Issued in France, USA and Eurasia. Pending in other countries).
27. Jacquot G, Lécorce P, Malcor JD, Payrot N, David M, Molino Y, Khrestchatsky M (2014) Compositions and methods for drug delivery. Patent Application WO 2014/060601.
28. Wilhelmus MM, Otte-Höller I, van Triel JJ, Veerhuis R, Maat-Schieman ML, Bu G, de Waal RM, Verbeek MM (2007) Lipoprotein receptor-related protein-1 mediates amyloid-beta-mediated cell death of cerebrovascular cells. *Am J Pathol* 171: 1989-1999.
29. Zhang Y, Schuetz JD, Elmquist WF, Miller DW (2004) Plasma membrane localization of multidrug resistance-associated protein homologs in brain capillary endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 311: 449-455.
30. O'Kane RL, Martínez-López I, DeJoseph MR, Viña JR, Hawkins RA (1999) Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem* 274: 31891-31895.
31. Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA (1999) Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* 19: 10193-10200.
32. Descamps L, Dehouck MP, Torpier G, Cecchelli R (1996) Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am J Physiol* 270: H1149-1158.
33. Jones AR, Shusta EV (2007) Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res* 24: 1759-1771.
34. Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M (2010) Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* 15: 40-56.
35. Kenagy R, Bierman EL, Schwartz S, Albers JJ (1984) Metabolism of low density lipoprotein by bovine endothelial cells as a function of cell density. *Arteriosclerosis* 4: 365-371.
36. Dehouck B, Dehouck MP, Fruchart JC, Cecchelli R (1994) Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol* 126: 465-473.
37. Macdonald JA, Murugesan N, Pachter JS (2010) Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature. *J Neurosci Res* 88: 1457-1474.
38. Cucullo L, Hossain M, Tierney W, Janigro D (2013) A new dynamic *in vitro* modular capillaries-venules modular system: cerebrovascular physiology in a box. *BMC Neurosci* 14: 18.
39. Lane-Donovan C, Philips GT, Herz J (2014) More than Cholesterol Transporters: Lipoprotein Receptors in CNS Function and Neurodegeneration. *Neuron* 83: 771-787.
40. Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau MC, Lamartiniere Y, Gosselet F, Fenart L (2015) *In vitro* discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res* 1594: 15-26.

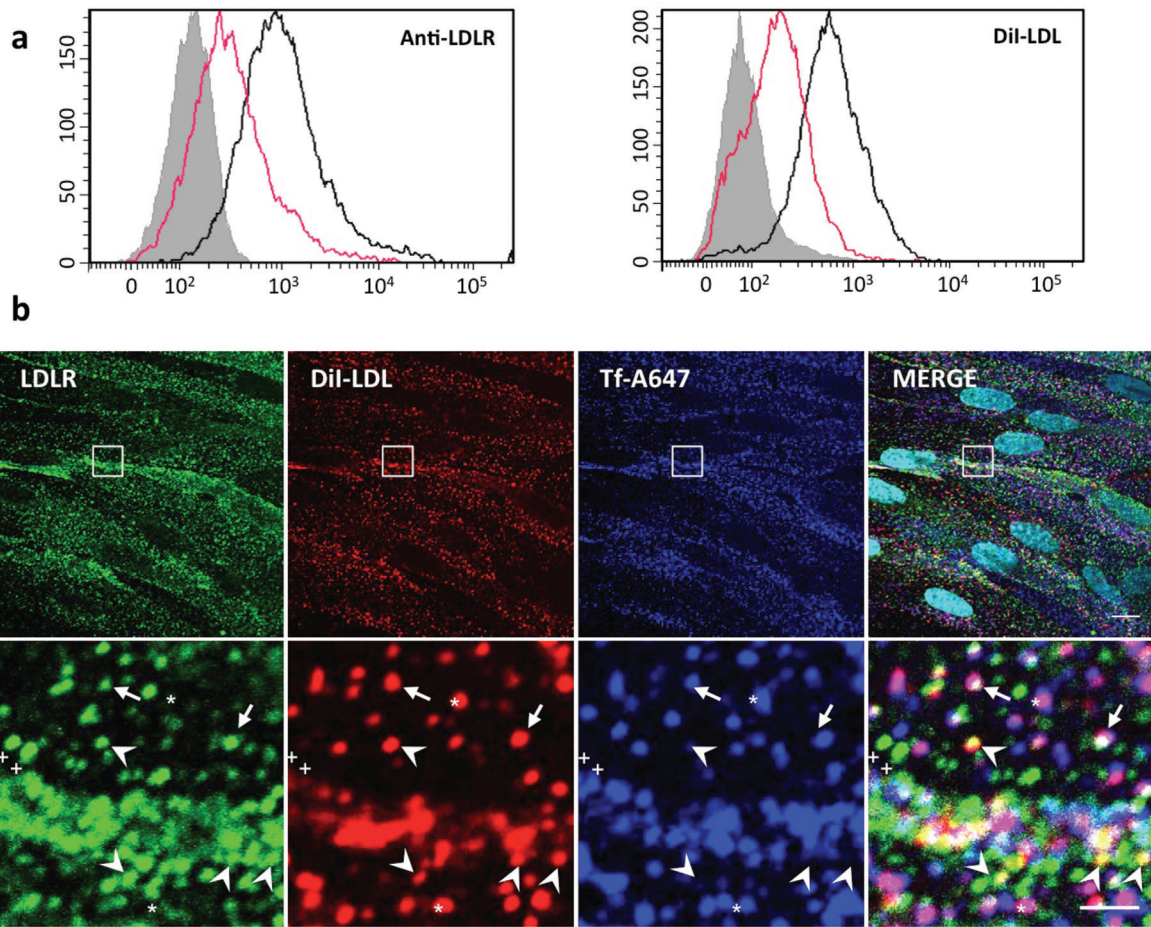
41. Raub TJ, Newton CR (1991) Recycling kinetics and transcytosis of transferrin in primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol* 149: 141-151.
42. Roberts RL, Fine RE, Sandra A (1993) Receptor-mediated endocytosis of transferrin at the blood-brain barrier. *J Cell Sci* 104: 521-532.
43. Candela P, Gosselet F, Miller F, Buee-Scherrer V, Torpier G, Cecchelli R, Fenart L (2008) Physiological pathway for low-density lipoproteins across the blood-brain barrier: transcytosis through brain capillary endothelial cells *in vitro*. *Endothelium* 15: 254-264.
44. Simionescu M, Popov D, Sima A (2009) Endothelial transcytosis in health and disease. *Cell Tissue Res* 335: 27-40.
45. Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G, Cecchelli R (1997) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol* 138: 877-889.
46. Calvo D, Gómez-Coronado D, Lasunción MA, Vega MA (1997) CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 2341-2349.
47. Goti D, Hrzenjak A, Levak-Frank S, Frank S, van der Westhuyzen DR, Malle E, Sattler W (2001) Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E. *J Neurochem* 76: 498-508.
48. Valenza M, Leoni V, Karasinska JM, Petricca L, Fan J, Carroll J, Pouladi MA, Fossale E, Nguyen HP, Riess O, MacDonald M, Wellington C, DiDonato S, Hayden M, Cattaneo E (2010) Cholesterol defect is marked across multiple rodent models of Huntington's disease and is manifest in astrocytes. *J Neurosci* 30: 10844-10850.
49. Camargo N, Brouwers JF, Loos M, Gutmann DH, Smit AB, Verheijen, MH (2012) High-fat diet ameliorates neurological deficits caused by defective astrocyte lipid metabolism. *FASEB J* 26: 4302-4315.
50. Vance JE (2012) Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech* 5: 746-755.
51. Friden PM, Olson TS, Obar R, Walus LR, Putney, SD (1996) Characterization, receptor mapping and blood-brain barrier transcytosis of antibodies to the human transferrin receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 278: 1491-1498.
52. Boado RJ, Zhang Y, Zhang Y and Pardridge WM (2007) Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. *Biotechnol Bioeng* 96: 381-391.
53. Maletínská L, Blakely EA, Bjornstad KA, Deen DF, Knoff LJ, Forte TM (2000) Human glioblastoma cell lines: levels of low-density lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein. *Cancer Res* 60: 2300-2303.
54. Zhang B, Sun X, Mei H, Wang Y, Liao Z, Chen J, Zhang Q, Hu Y, Pang Z, Jiang X (2013) LDLR-mediated peptide-22-conjugated nanoparticles for dual-targeting therapy of brain glioma. *Biomaterials* 34: 9171-9182.
55. Watts RJ, Dennis MS (2013) Bispecific antibodies for delivery into the brain. *Curr Opin Chem Biol* 17: 393-399.
56. Niewoehner J, Bohrmann B, Collin L, Urich E, Sade H, Maier P, Rueger P, Stracke JO, Lau W, Tissot AC, Loetscher H, Ghosh A, Freskgård PO (2014) Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* 81: 49-60.
57. Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, Hoyte K, Luk W, Lu Y, Atwal J, Elliott JM, Prabhu S, Watts RJ, Dennis MS (2011) Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Sci Transl Med* 3: 84ra44.
58. Sade H, Baumgartner C, Hugenmatter A, Moessner E, Freskgård PO, Niewoehner J (2014) A human blood-brain barrier transcytosis assay reveals antibody transcytosis influenced by pH-dependent receptor binding. *PLoS One* 9: e96340.



**Fig. 1 Expression of LDLR mRNA and protein in BMVs and BMECs**

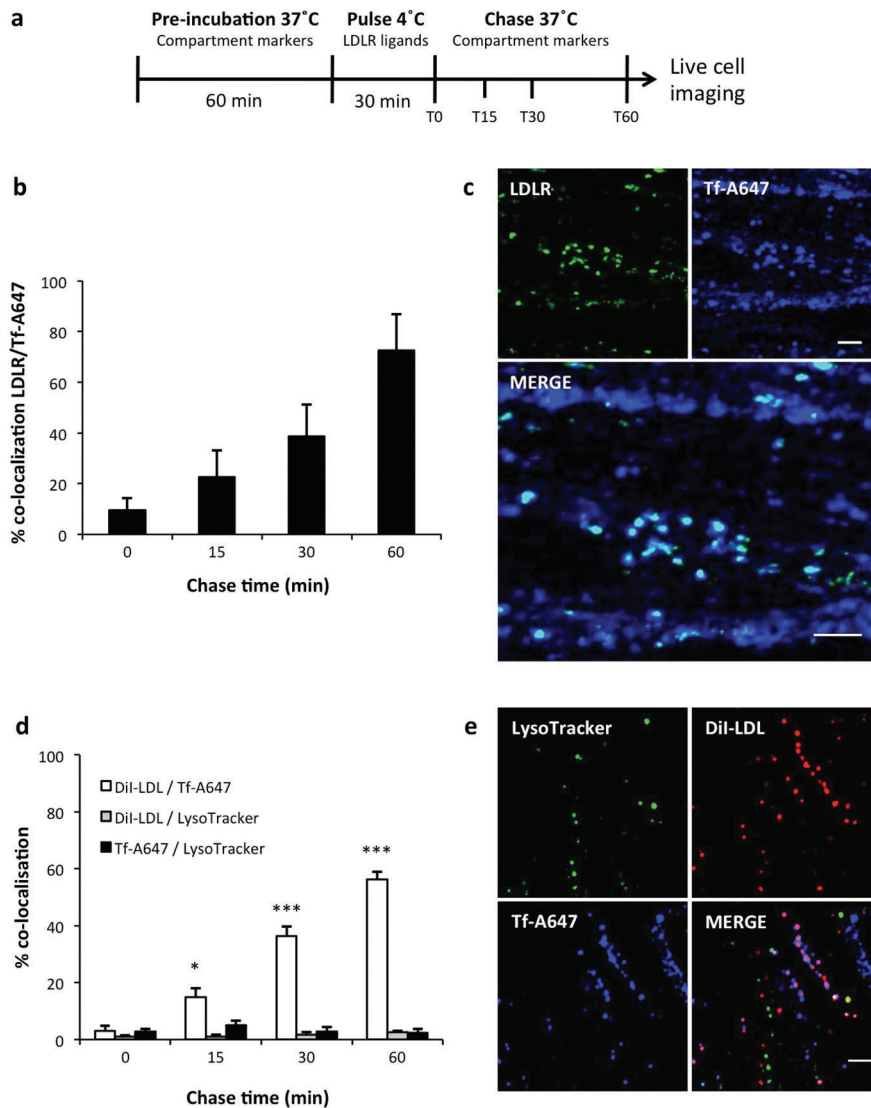
(a) The steady-state levels of mRNAs encoding the rat and mouse LDLR relative to GAPDH were assessed by qRT-PCR and compared within cerebral cortex (Cx), collagenase/dispase digested brain microvessels (BMV), BMEC monolayers (BMEC), adrenal glands (Ag) and liver (L). One set of primers was used for quantification in rat samples, selected in exons 5-6 while 2 sets of primers selected in exons 1-2 and 14-15 were used for the mouse samples. (b) Anti-LDLR antibody validation with western blot analysis of plasma membrane preparations from CHO cell lines engineered to express the rat and mouse LDLR-EGFP (CHO-rLDLR-EGFP and CHO-mLDLR-EGFP, respectively) compared to CHO WT, and cerebral cortex from either WT or *ldlr*<sup>-/-</sup> mice (Cx WT and Cx *ldlr*<sup>-/-</sup> respectively). Actin was used to check loading of equal amounts of protein. (c) Rat BMVs were either non-enzymatically digested (nd-BMV), or were digested with collagenase/dispase (BMV) to eliminate pericytes and astrocytes. Plasma membrane preparations were probed with different antibodies to assess the efficiency of the enzymatic digestion of BMVs, as shown by desmin and GFAP labeling used as markers of pericytes and astrocytes, respectively. Actin was used to check loading of equal amounts of protein. (d) Western blot analysis and quantification of LDLR levels in plasma membrane preparations from cortex (Cx), enzymatically digested BMVs, BMEC monolayers, adrenal glands (Ag) and liver (L) from mice (10 µg per lane) and rats (100 µg per lane). Quantification of the optical densities of each band was assessed using the NIH ImageJ software and is shown in fold change relative to Cx. (e) Western blot analysis of LDLR distribution in whole tissue lysates (WL), whole membranes (WM), plasma membranes (PM) (10 µg per lane), and LDLR polarization in apical and basolateral plasma membrane preparations (2 µg per lane) of rat enzymatically digested BMVs and BMEC monolayers. The quality of apical (F1) and basolateral (F3) plasma membrane preparations was assessed by preferential localization of P-gp and GLT-1 in the F1 and F3 fractions, respectively. All data are representative of at least 3 experiments with similar results.





**Fig. 2 Apical LDLR-dependent binding of LDL to BMEC monolayers**

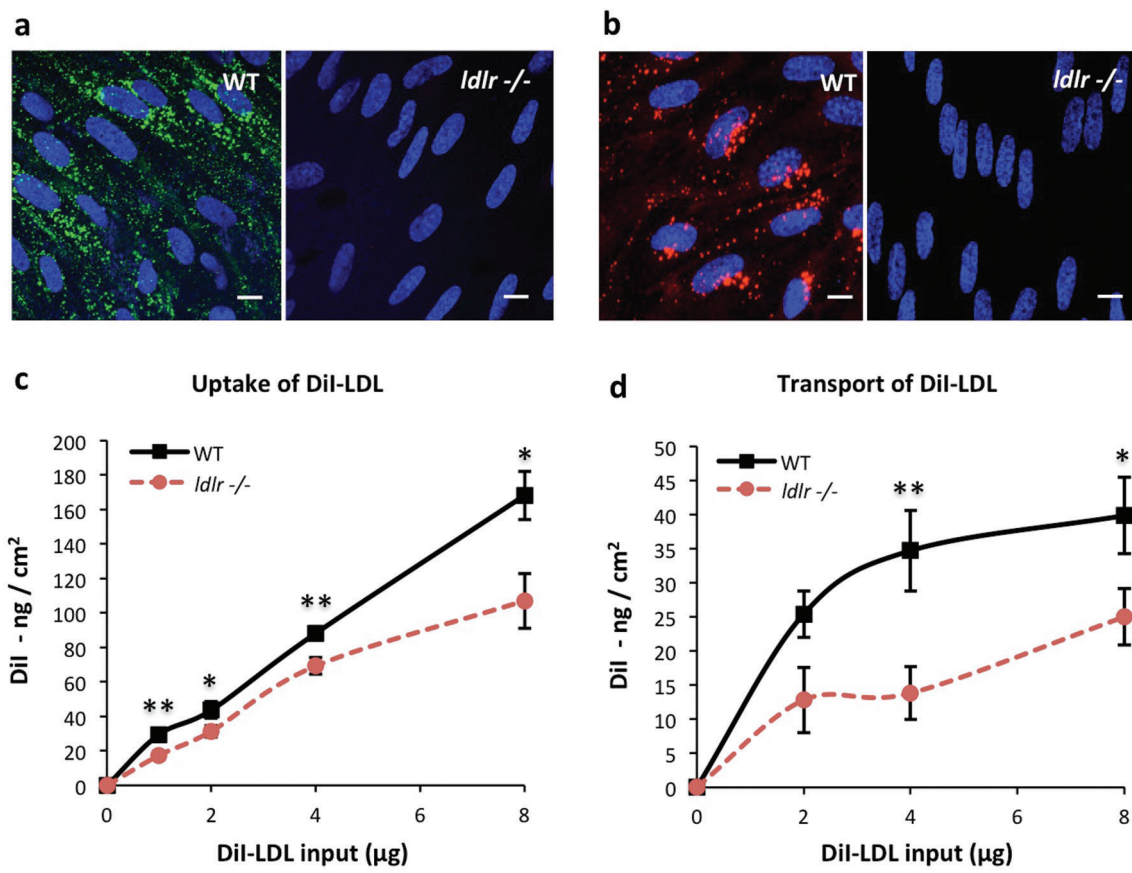
(a) Flow cytometry analysis of the cell surface binding on live WT (black line) and *ldlr*<sup>-/-</sup> (red line) rat BMECs of an anti-LDLR antibody and DiI-LDL (LDLR fluorescent ligand). The grey peaks (controls) correspond to the fluorescent secondary antibody alone (left panel) and cell auto-fluorescence (right panel). (b) Photomicrographs of rat BMEC monolayers probed for cell surface binding on live cells of DiI-LDL co-incubated with Tf-A647 for 30 min at 4 °C. The monolayers were fixed with PFA 4 % and stained with no membrane permeabilization step with an anti-LDLR antibody to assess the cell surface expression of LDLR (Scale bars, 10 μm and 2 μm). Arrows: cell surface clusters of LDLR, DiI-LDL and Tf-A647 co-localization. Arrowheads: cell surface clusters of LDLR and DiI-LDL co-localization. Stars: cell surface clusters of DiI-LDL and Tf-A647 co-localization. + symbol: cell surface clusters of LDLR alone.



**Fig. 3 Analysis of the intracellular trafficking route of LDLR and LDL in BMECs using a pulse-chase approach**

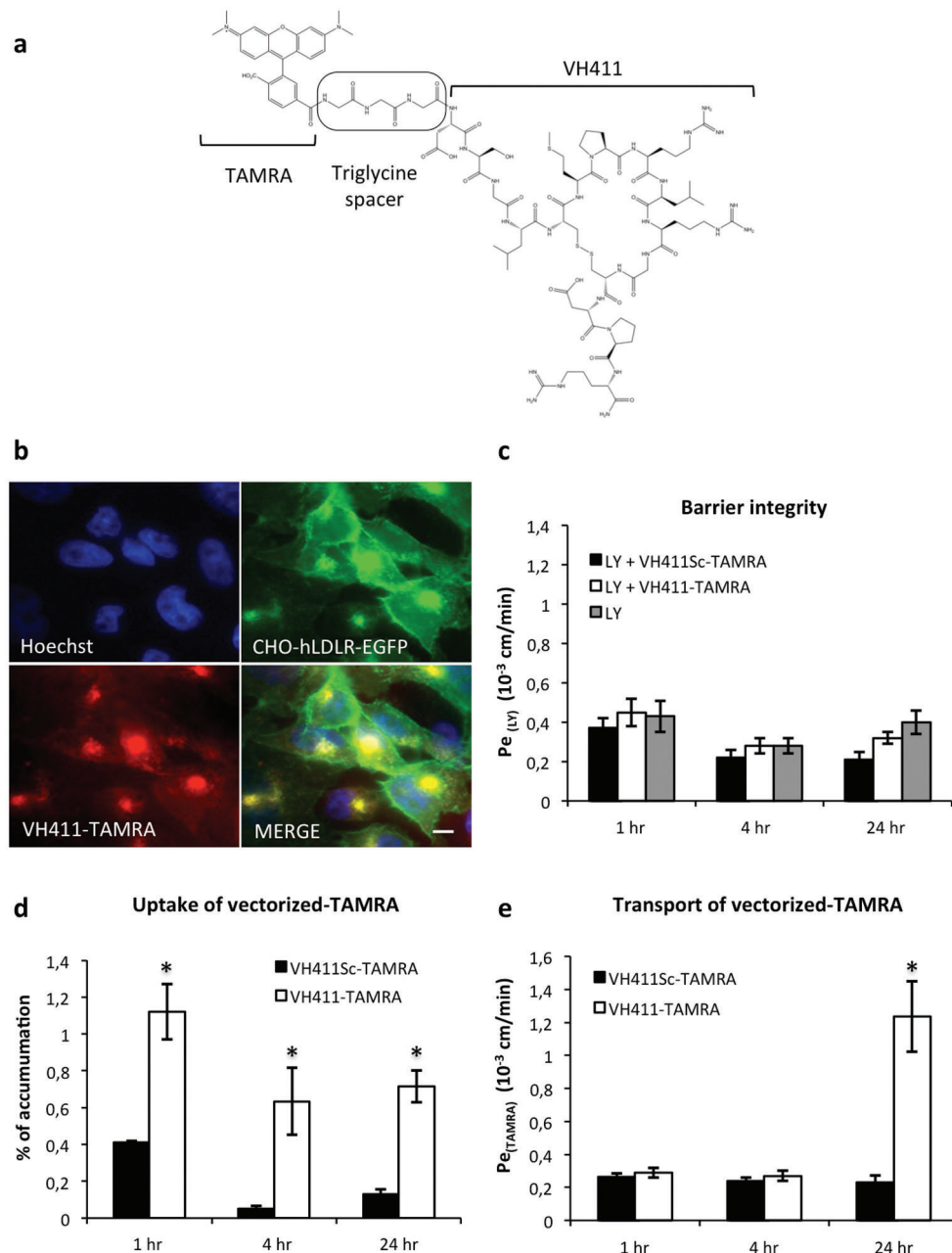
(a) Schematic representation of a typical pulse-chase experiment. LDLR ligands were incubated on live BMEC monolayers for 30 min at 4 °C to allow cell surface binding while limiting endocytosis (pulse). Cells were then washed extensively and either fixed (T0) or further incubated for 15, 30 or 60 min at 37 °C (chase) before live cell imaging. Tf-A647 and/or LysoTracker Blue DND-22 were incubated for 60 min at 37 °C before the pulse and/or during the chase to stain the Tf-positive and lysosomal compartments, respectively. Quantitative analysis of co-localization between LDLR ligands and the labeled compartments is presented as mean  $\pm$  standard deviation (\*  $p \leq 0.05$  - \*\*  $p \leq 0.01$  - \*\*\*  $p \leq 0.001$ ).

(b) Kinetics and quantitative analysis of LDLR delivery to the Tf-positive compartment. A goat anti-LDLR antibody was co-incubated with a donkey anti-goat secondary antibody coupled to an Alexa Fluor 488 on live BMEC monolayers during the pulse. Representative photomicrographs of live cells after 60 min chase are shown, (Scale bars, 5  $\mu\text{m}$ ) (c). (d) Kinetics and quantitative analysis of LDL delivery to the Tf-positive and lysosomal compartments. DiI-LDL was incubated on live BMEC monolayers during the pulse. Representative photomicrographs of live cells after 60 min chase are shown, (Scale bar, 5  $\mu\text{m}$ ); LysoTracker Blue DND-22 is shown as false green color (e).



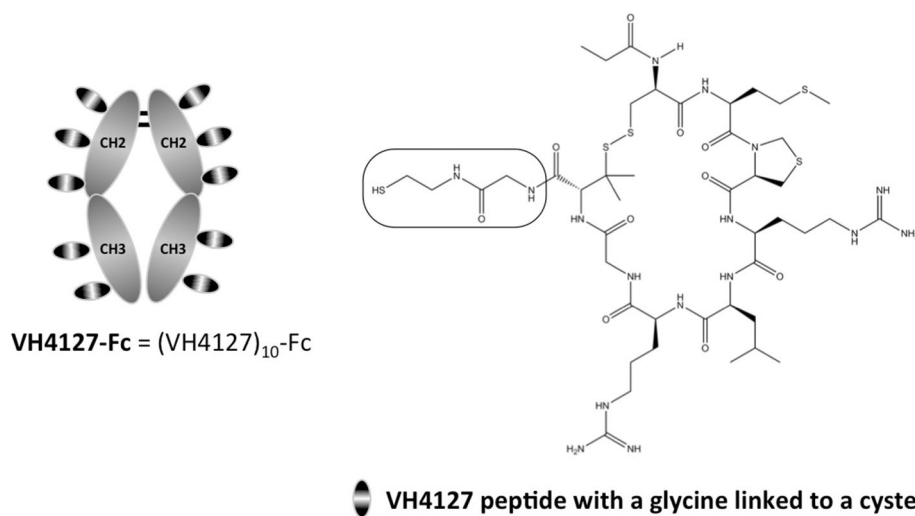
**Fig. 4 Quantification of LDLR-dependant LDL uptake by and transport across BMEC monolayers**

(a, b) Photomicrographs of WT and *ldlr*<sup>-/-</sup> rat BMEC monolayers probed for uptake of (a) an anti-LDLR antibody and (b) Dil-LDL incubated on live cells for 30 min at 37 °C (Scale bars, 10 μm). (c, d) Fluorimetric quantification of Dil-LDL (c) in the cell lysate (uptake) and (d) in the abluminal compartment (transport) from WT and *ldlr*<sup>-/-</sup> rat BMEC monolayers was performed in parallel on the same inserts after 30 min incubation at 37 °C. Data are presented as mean ± standard deviation (\* p ≤ 0.05 - \*\* p ≤ 0.01).



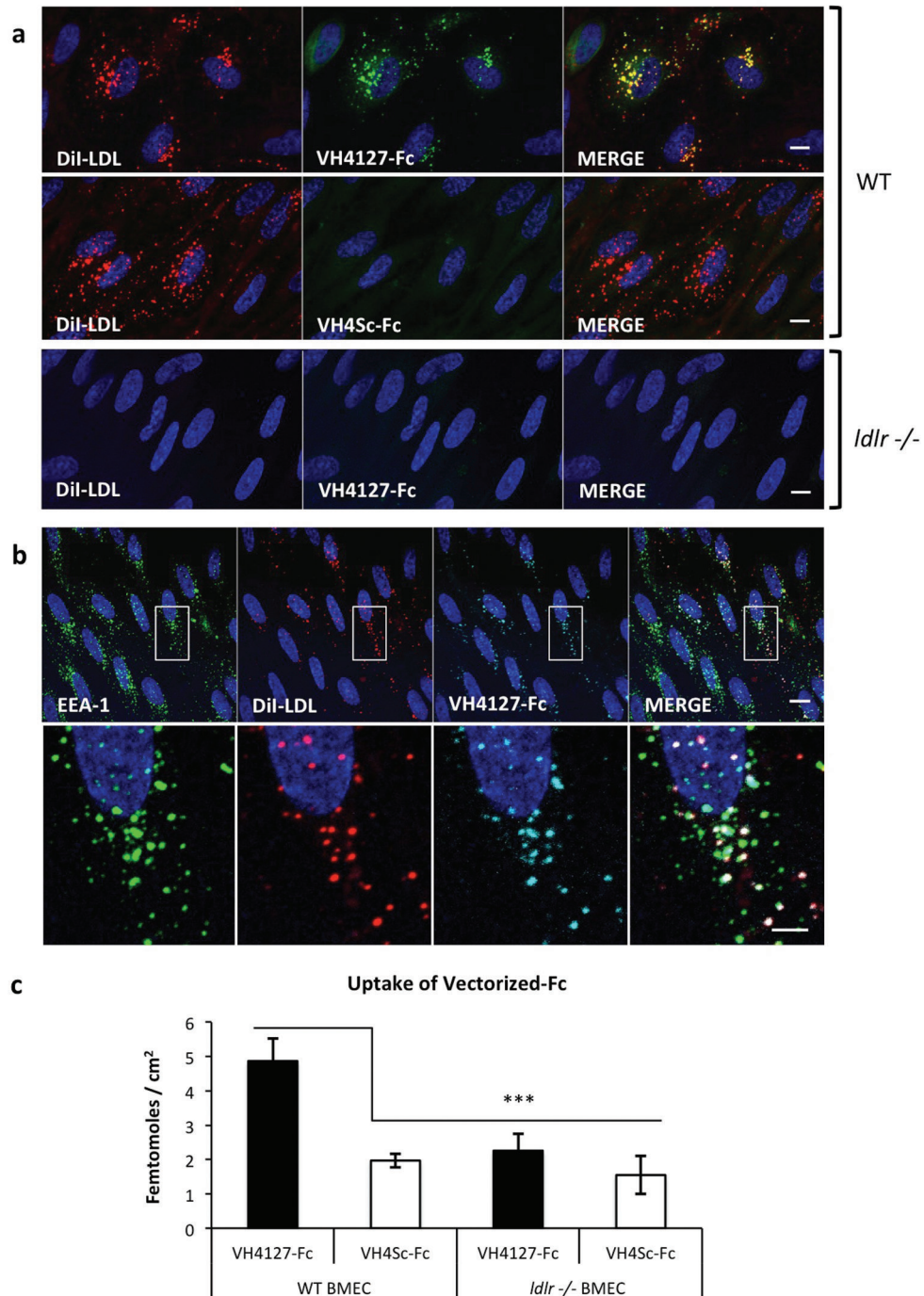
**Fig. 5 Uptake by and transport across BMEC monolayers of the LDLR-targeted VH411-TAMRA**

(a) The VH411 cyclic peptide was conjugated at its N-terminal amine to tetramethylrhodamine (TAMRA), via a triglycine flexible spacer. (b) Photomicrographs of a CHO cell line stably expressing the human LDLR-EGFP (CHO-hLDLR-EGFP) probed for uptake of VH411-TAMRA incubated for 1 hr at 37 °C. Cell nuclei are labeled with Hoechst (Scale bar, 10  $\mu$ m). (c-e) VH411-TAMRA and the negative control VH411Sc-TAMRA were incubated on bovine BMEC monolayers for 1 hr, 4 hr or 24 hr at 37 °C to assess on the same inserts their (c) cellular toxicity by co-incubation with Lucifer Yellow (LY) and its paracellular leakage in the abluminal compartment expressed as LY permeability,  $Pe_{(LY)}$ , (d) uptake by the BMEC monolayers assessed by TAMRA fluorimetric quantification in the cell lysates expressed as 100 % of input, and (e) transport across the BMEC monolayers from the luminal to the abluminal compartment assessed by TAMRA fluorimetric quantification and expressed in TAMRA permeability,  $Pe_{(TAMRA)}$ . Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (\*  $p \leq 0.05$ ).



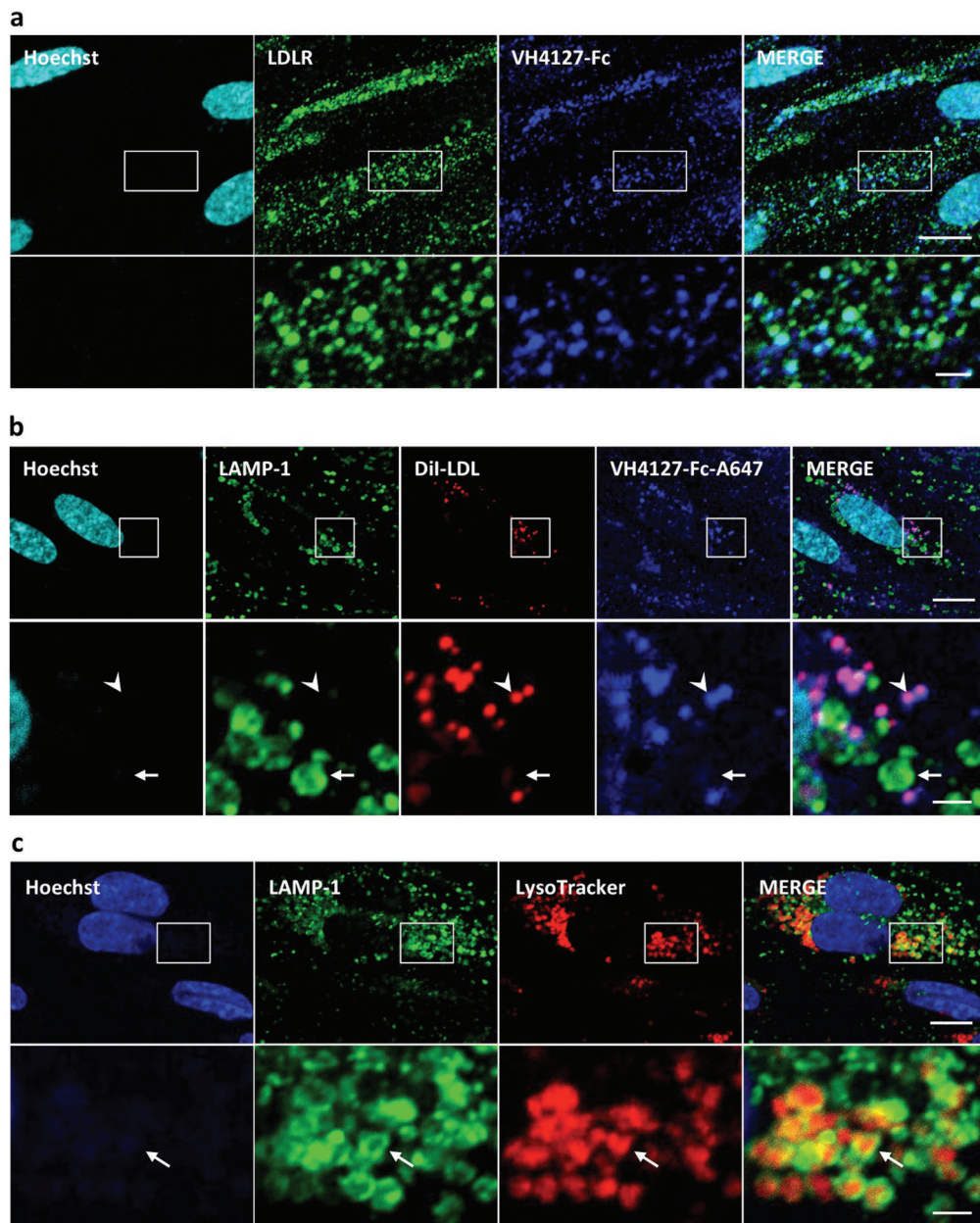
**Fig. 6 Schematic structure of vectorized-Fc**

The (VH4127)<sub>n</sub>-Fc was produced by chemical conjugation of the functionalized VH4127 peptide with a glycine (G) added at the C-terminal linked to a cysteamine (G-NH-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-SH), also called sulfhydryl peptide, for reaction on the functionalized lysine side chains of the IgG1 Fc fragment. The conjugation was calibrated to obtain an average of 10 peptides per dimeric Fc, (VH4127)<sub>10</sub>-Fc named VH4127-Fc. The VH4Sc scrambled peptide was conjugated to Fc similarly.



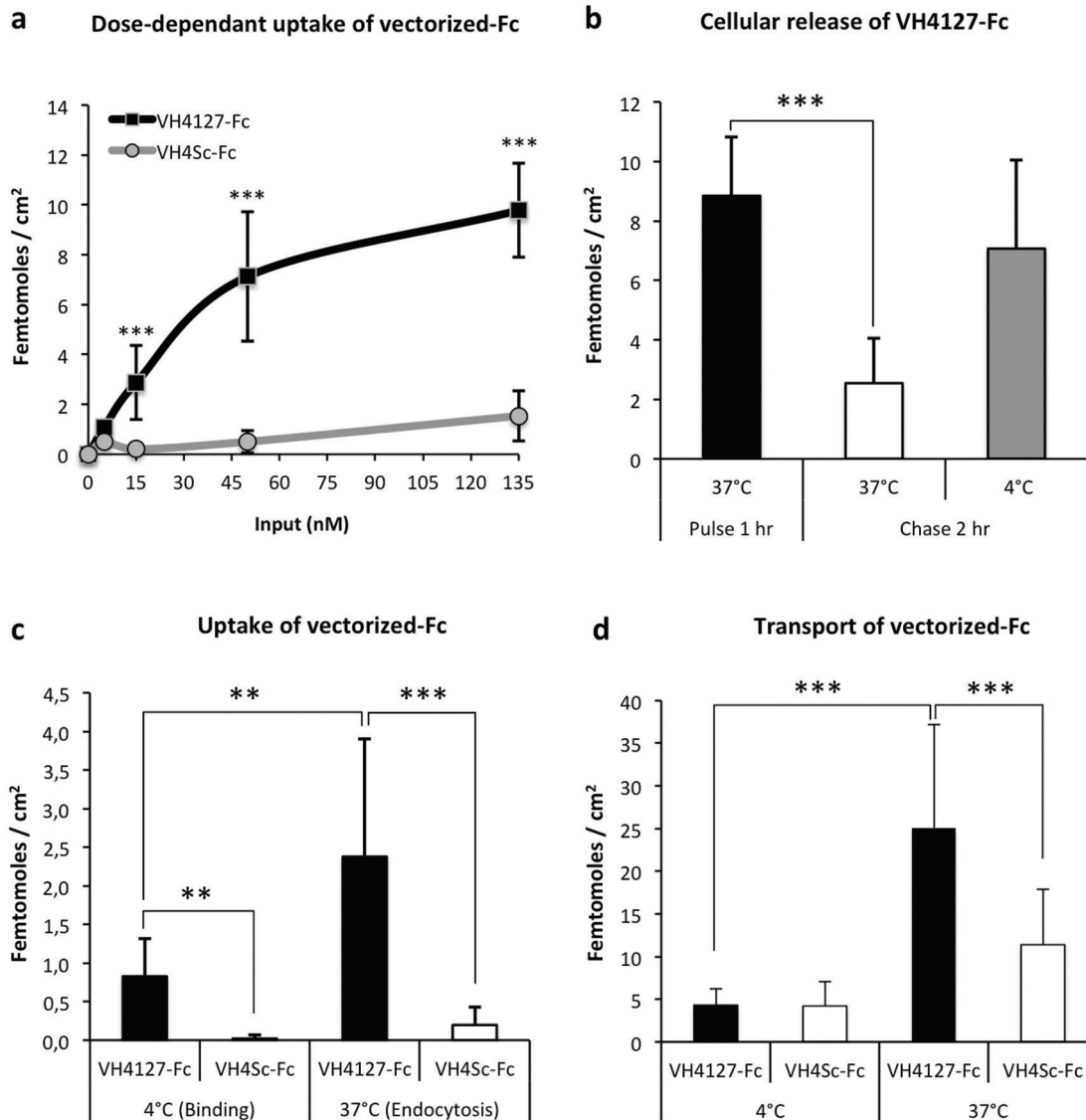
**Fig. 7 LDLR-dependent uptake of vectorized-Fc in BMEC monolayers**

(a) Photomicrographs of WT and *ldlr*<sup>-/-</sup> rat BMEC monolayers probed for uptake of DiI-LDL co-incubated with VH4127-Fc or VH4Sc-Fc for 30 min at 37 °C on live cells (Scale bars, 10 μm). (b) Photomicrographs of WT rat BMEC monolayers probed for uptake of DiI-LDL co-incubated with VH4127-Fc for 30 min at 37 °C on live cells, then fixed, permeabilized and stained with an antibody directed against the Early Endosome Antigen-1 (EEA-1) (Scale bars, 10 μm and 5 μm). Nuclei are stained with Hoechst. (c) Anti-Fc ELISA quantification of VH4127-Fc and VH4Sc-Fc uptake by WT and *ldlr*<sup>-/-</sup> mouse BMEC monolayers after 2 hr incubation at 37 °C on live cells. Fluorescence units were transformed in femtomoles per cm<sup>2</sup>, which refers to the surface area of the filter and cell monolayer. Data are presented as mean ± standard deviation (\*\*\*) p ≤ 0.001).



**Fig. 8 Analysis of the intracellular trafficking route of VH4127-Fc in BMECs using a pulse-chase approach**

(a) Photomicrographs of rat BMEC monolayers probed for cell surface binding of VH4127-Fc and DiI-LDL for 30 min at 4 °C on live cells. The monolayers were fixed with PFA 4 % and subjected to anti-LDLR and anti-Fc immunostaining with no membrane permeabilization step to assess co-localization at apical plasma membranes. (b) Photomicrographs of rat BMECs subjected to incubation of VH4127-Fc-A647 and DiI-LDL for 30 min at 4 °C on live cells (pulse), then chased for 60 min at 37 °C to allow synchronous internalization and intracellular trafficking. Cells were fixed, permeabilized and stained with an anti-LAMP-1 antibody (arrow). Arrowheads: DiI-LDL and VH4127-Fc-A647 co-localization. (c) Characterization of the acidic/lysosomal compartment in rat BMECs: live cells were incubated for 60 min at 37 °C with LysoTracker Red DND-99, fixed, permeabilized and stained with an antibody directed against the lysosomal associated membrane protein-1 (LAMP-1). Arrow: LAMP-1 and LysoTracker co-localization. Nuclei are stained with Hoechst (All scale bars, 10  $\mu$ m and 2  $\mu$ m).



**Fig. 9 Quantification of VH4127-Fc uptake by and transport across BMEC monolayers**

(a) Anti-Fc ELISA quantification of VH4127-Fc and VH4Sc-Fc uptake by rat BMEC monolayers for 2 hr at 37 °C on live cells. (b) Anti-Fc ELISA quantification of the cellular release of VH4127-Fc using an adapted pulse-chase approach. VH4127-Fc was incubated for 1 hr at 37 °C to quantify uptake by live rat BMEC monolayers (pulse). To quantify the cellular release of VH4127-Fc, the monolayers were washed with an acidic buffer (pH 4.6) and then transferred to ligand-free wells for an additional 2 hr incubation at either 37 °C or 4 °C (chase). (c, d) Anti-Fc ELISA quantification of VH4127-Fc and VH4Sc-Fc (c) in the cell lysate (uptake) and (d) in the abluminal compartment across the rat BMEC monolayers (transport) were performed in parallel on the same inserts. VH4127-Fc and VH4Sc-Fc were incubated for 2 hr either at 4 °C to allow binding and temperature-independent processes, or at 37 °C to allow binding and restore temperature-dependent endocytotic process. Fluorescence units were transformed in femtomoles per cm<sup>2</sup>, which refers to the surface area of the filter and cell monolayer. Data are presented as mean ± standard deviation (\*\* p ≤ 0.01 - \*\*\* p ≤ 0.001).



### III. Conclusion

Dans cette étude, grâce à la combinaison des résultats issus des monocouches de CEMCs *ldlr* -/- et de l'approche de pulse-chase permettant l'observation du trafic intracellulaire, nous avons confirmé que le LDLR, exprimé et présenté à la membrane apicale des CEMCs, est une cible d'intérêt permettant d'endocytoser et d'orienter tout ou partie de la charge endosomale du LDL vers une voie de transcytose non-dégradative. De par leurs propriétés intrinsèques, les peptides vecteurs d'environ 1 kDa, ligands du LDLR, conjugués à un cargo protéique de type fragment Fc d'anticorps (protéine recombinante ou couplage chimique) permettent d'augmenter le transfert du conjugué vers le compartiment abluminal et ceci à travers le compartiment vésiculaire des CEMCs. Ces données au niveau cellulaire ont permis de mieux comprendre les propriétés des peptides vecteurs développés par VECT-HORUS quant à leur capacité à améliorer le transfert transcellulaire de principes actifs à travers les monocouches de CEMCs.

**Article 4 (en préparation, rapport intermédiaire et perspectives) :  
Analyse comparative du transcriptome de cellules endothéliales  
microvasculaires des barrières hémato-encéphalique (BHE) et sang-  
moelle épinière (BSME) en situation inflammatoire**

Yves Molino\*, Françoise Jabès\*, Anne Bernard°, Amandine Bonnet°, Philippe Benech°, Michel Khrestchatisky°

\*VECT-HORUS SAS, Faculté de Médecine - Secteur Nord, CS80011, 51 Bd Pierre Dramard, 13344 Marseille Cedex 15, France.

°CNRS, UMR 7259, Neurobiologie des Interactions Cellulaires et Neurophysiopathologie (NICN), Aix Marseille Université, Faculté de Médecine - Secteur Nord, CS80011, 51 Bd Pierre Dramard, 13344 Marseille Cedex 15, France.

## I. Contexte et Introduction

Les systèmes vasculaires du cerveau et la moelle épinière appelés BHE et BSME présentent des caractéristiques communes car ils sont composés de cellules endothéliales entourées par des pieds d'astrocytes, des péricytes et des neurones formant une UNGV. Les deux systèmes partagent des propriétés de barrière physique et physiologique par l'expression de jonctions serrées hautement différenciées, un faible niveau de transport vésiculaire, un large spectre de pompes d'efflux et l'expression polarisée de transporteurs et récepteurs permettant d'approvisionner le cerveau ou la moelle épinière en nutriments essentiels à leur métabolisme (Delbart *et al.*, 1989; Pardridge *et al.*, 1991; Pardridge, 1999; Gosselet *et al.*, 2009; Pardridge et Boado, 2012).

Cependant, malgré les similarités sur le plan morphologique entre la BHE et la BSME, plusieurs marqueurs associés au maintien de "l'intégrité de la barrière" sont exprimés différemment au niveau des cellules endothéliales qui les composent (Ge et Pachter, 2006). La BSME se différencie de la BHE entre autres par le dépôt de glycogène au niveau des vaisseaux superficiels de la moelle épinière. Des études *in vivo* montrent une hétérogénéité moléculaire des astrocytes en fonction des zones du SNC, suggérant une hétérogénéité entre les deux systèmes vasculaires (Bachoo *et al.*, 2004). Par exemple, seulement une faible proportion des astrocytes cérébraux expriment la forme phosphorylée de la GFAP alors que la majorité des astrocytes de la moelle épinière l'expriment (Takemura *et al.*, 2002). Les péricytes ont une distribution uniforme dans différentes régions cérébrales en contraste avec leur distribution non uniforme le long de l'axe rostrocaudal de la moelle épinière. Bien que la région thoracique de la moelle épinière soit la plus riche en péricytes, elle ne contient dans son ensemble que 30% de péricytes par rapport au cerveau (Winkler *et al.*, 2012 ; Radu *et al.*, 2013). *In vitro*, il a été montré que la capacité de migration des péricytes lors de la néovascularisation est dépendante de leur tissu d'origine, cerveau ou moelle épinière (Wu *et al.*, 2015). Ces observations sont corrélées avec une moindre restrictivité de la BSME au passage de différents traceurs tel que des dextrans fluorescents ou des cytokines (Prockop *et al.*, 1995), et une moindre expression de certains marqueurs spécifiques de ces endothéliums, VE-cadherin,  $\beta$ -catenin, des protéines de jonctions adhérentes et de jonctions serrées telles que ZO-1, l'occludine et la claudine-5 (Ge et Pachter, 2006).

La neuroinflammation, associée à des atteintes aiguës du SNC telles que le trauma, l'ischémie, les radiations, les infections ou à des pathologies chroniques telles que la maladie d'Alzheimer ou la sclérose en plaques, est généralement associée à une inflammation des barrières du SNC (Zhang et Gensel, 2014). Globalement, cette inflammation entraîne une infiltration

leucocytaire, une perte d'intégrité des barrières (amplification du passage paracellulaire) et une augmentation du transport transcellulaire, bien que cette vision soit controversée (Bien-Ly *et al.*, 2015). Cette perte d'intégrité est un évènement précoce et critique dans le développement et l'évolution des pathologies à composante neuroinflammatoire. Le TNF- $\alpha$ , la cytokine TWEAK qui appartient à la famille du TNF- $\alpha$ , et d'autres cytokines et chimiokines ont été impliquées dans l'altération de l'intégrité de la BHE *in vitro* (Petty et Lo, 2002; Stamatovic *et al.*, 2008; Stephan *et al.*, 2013), notamment en modulant l'expression ou les propriétés des protéines de jonctions serrées (Forster *et al.*, 2008). Les CEMCs et les cellules gliales périvasculaires, produisent des chimiokines telles que IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES ou CCL-2, qui est impliqué dans la régulation de la perméabilité de la BHE (Zach *et al.*, 1997; Andjelkovic *et al.*, 2000; Mahad et Ransohoff, 2003; Stamatovic *et al.*, 2005; Dimitrijevic *et al.*, 2006). Le TNF- $\alpha$  induirait une augmentation du transport transcellulaire du LDL (Descamps *et al.*, 1997), de la transferrine (Miller *et al.*, 2005) et de la lactoferrine (Fillebeen *et al.*, 1999) ainsi qu'une augmentation de l'expression de la P-gp (Yu *et al.*, 2007).

Parmi les processus associés à l'ouverture de la barrière il a été décrit une réorganisation du cytosquelette d'actine, qui est en interaction directe avec les complexes jonctionnels protéiques. Cette réorganisation entraîne une perte d'intégrité réversible des barrières comme cela a été montré suite à l'induction de l'inflammation par le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  (Stamatovic *et al.*, 2005; Dimitrijevic *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 2011). L'ouverture des barrières est également associée à la sécrétion de nombreuses protéases telles que les MMPs et une altération ou dégradation de la MEC (Green et Friedland, 2007). D'autres protéases telles les "A disintegrin and metalloproteinases" (ADAMs ou Adamalysines) et des familles d'inhibiteurs tels les "serine protease inhibitors" (Serpines) ont été impliqués dans des processus similaires. Les Adamalysines sont une famille de peptidases classifiées en tant que « shedases » car elles clivent la partie extracellulaire de protéines transmembranaires telles que des récepteurs ou des protéines de jonction cellulaire (Wolfsberg *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2006; Edwards *et al.*, 2008; Brocker *et al.*, 2009). Les Serpines sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que le contrôle de la cascade protéolytique et l'inflammation (Carrell et Travis, 1985; Whisstock *et al.*, 2010; Silverman *et al.*, 2010).

Si l'inflammation de la BHE a été étudiée *in vivo* et *in vitro*, il existe peu de données concernant l'inflammation de la BSME. Après un traumatisme de la moelle épinière, il a été montré une sur-expression des récepteurs p55 et p75 qui lient le TNF- $\alpha$  (Pan *et al.*, 2003). Une autre étude analysant l'effet de l'acide salvianolic sur des rats suite à un traumatisme de la moelle épinière a mis

en évidence une amélioration de l'intégrité de la BSME, en corrélation avec (i) une diminution des réponses TNF- $\alpha$  et NF- $\kappa$ B, (ii) une sur-expression des marqueurs de jonctions serrées ZO-1 et occludine et (iii) une meilleure motricité des animaux (Fan *et al.*, 2013). Le stress chronique chez le rat induit des modifications dans la réponse inflammatoire et une perte d'intégrité de la BSME (Golovatscka *et al.*, 2012). L'hétérogénéité régionale et cellulaire entre la BHE et la BSME suggère que certains états pathologiques pourraient affecter différemment le cerveau et la moelle épinière (Bartanusz *et al.*, 2011). Par exemple, la BSME apparaît plus sensible aux pathologies démyélinisantes que la BHE (Silwedel et Förster, 2006), probablement dû à une moins bonne intégrité constitutive et/ou une réponse accrue à des stimuli contrôlant cette intégrité (Prockop *et al.*, 1995).

Dans ce contexte, et dans le cadre d'un projet collaboratif impliquant un autre partenaire industriel spécialisé dans les lésions et les approches de réparation de la moelle épinière nous avons comparé le transcriptome des endothéliums de la BHE et la BSME, dans leur état constitutif et dans leur réponse à des stimuli inflammatoires. Dans ce but, des modèles *in vitro* de BHE et BSME de rat ont été mis en place avec les approches décrites dans le premier article de ce manuscrit (Molino *et al.*, 2014). Les monocouches de CEMCs et CEMSs ont été incubées avec deux agents pro-inflammatoires, le TNF- $\alpha$  et le TWEAK selon une cinétique d'incubation de 12 hr, 24 hr et 48 hr. L'analyse comparative et croisée des transcriptomes par la méthode du « fold change » a été réalisée avec pour objectif la caractérisation de marqueurs et/ou de voies de signalisation spécifiques de l'un ou l'autre de ces tissus. Parmi les marqueurs d'intérêt pour les approches de vectorisation, nous souhaitons également déterminer si des récepteurs ou transporteurs spécifiques permettraient un ciblage d'agents thérapeutiques vers la BHE ou la BSME, en particulier dans une zone de lésion ou une zone pathologique du tissu nerveux. Une fois identifiés, l'un ou l'autre de ces marqueurs pourrait permettre le développement de vecteurs et leur conjugaison à des principes actifs, pour un adressage vers l'une ou l'autre des barrières, notamment en situation inflammatoire.

## II. Résumé

L'analyse comparative des transcriptomes des CEMCs par rapport aux CEMSs dans leur état constitutif a permis de mettre en évidence des différences d'expression de nombreux marqueurs, dont plus de 50 gènes avec un taux d'expression (« fold change ») augmenté d'au moins un facteur 1.45. En particulier, nous révélons l'importance de la voie de signalisation impliquant le TGF- $\beta$  au niveau des CEMSs et une régulation différentielle marquée de l'expression constitutive des homeobox, en particulier HOXA9 et HOXB7 (fold change 0.04) ainsi que MMP-13 (fold change 0.1) et MMP-14 (fold change 5). Ces différences d'expression des ARNm codant les protéines mentionnées ci-dessus entre CEMCs et CEMSs ont été confirmées *in vivo*, suite à une analyse par RT-qPCR des microvaisseaux fraîchement extraits du cortex et de la moelle épinière. Des analyses comparatives par western blots des protéines nucléaires de ces microvaisseaux, avec des anticorps dirigés contre HOXA9 et HOXB7 confirment également une expression différentielle de ces deux protéines régulatrices. Il a été montré qu'HOXA9 assure le maintien de l'état basal des cellules endothéliales et que la répression de son expression est cruciale durant l'activation de ces cellules en réponse au signal inflammatoire. Nos résultats prédisent un état de différenciation moindre des CEMSs comparées aux CEMCs et donc une plus faible restrictivité paracellulaire des CEMSs et une réponse atténuée à l'inflammation. Nous avons donc poursuivi notre étude pour déterminer si les différences constitutives au niveau expression génique et protéique entre CEMCs et CEMSs se traduisaient par des différences de réponses à des stimuli pro-inflammatoires.

D'un point de vue global, la comparaison des transcriptomes entre les CEMCs et les CEMSs révèle des modulations différentielles de nombreux marqueurs en fonction de l'agent pro-inflammatoire et du temps de traitement, notamment des chimiokines, cytokines, protéases et inhibiteurs de protéases, validés dans leur ensemble par RT-qPCR. Dans notre étude, nous avons utilisé deux agents pro-inflammatoires : le TNF- $\alpha$ , un agent bien connu pour ses effets sur de nombreux types cellulaires et le « tumour necrosis factor (TNF)-like weak inducer of apoptosis », TWEAK. Il s'agit d'un membre de la superfamille du TNF, beaucoup moins connu que le TNF- $\alpha$  et étudié dans l'UMR7259 depuis de nombreuses années pour ses effets proinflammatoires dans le SNC, dans la sclérose en plaques et plus récemment sur la BHE (Stephan *et al.*, 2013). Pour le TNF- $\alpha$ , nous avons identifié plus de 284 gènes avec un fold change d'au moins 1.45 au niveau des CEMCs. Nous observons des délais de réponse entre les deux types cellulaires et les deux agents pro-inflammatoires concernant (i) l'expression des ARNm codant pour différents marqueurs de l'inflammation, CCL-2, IL-6 et IL-8, (ii) leur traduction en protéine et (iii) leur sécrétion dans les surnageants de culture dosés par ELISA (CCL-2 et IL-6). Pour le TNF- $\alpha$ , la réponse inflammatoire

semble plus forte et plus rapide au niveau des CEMCs par rapport aux CEMSs. A contrario, la réponse inflammatoire des CEMSs apparaît plus importante avec TWEAK qu'avec le TNF- $\alpha$ , bien que la réponse reste faible pour les marqueurs suivis. Lorsque l'on compare les CEMSs aux CEMCs dans leur état constitutif, les CEMSs présentent un niveau basal d'expression des chimiokines CCL-2 et IL-8 supérieur aux CEMCs. Cette expression constitutivement élevée de ces chimiokines dans les CEMSs pourrait expliquer le décalage dans le temps de la réponse à l'inflammation par le TNF- $\alpha$ .

Il est connu que les cytokines modulent l'expression de systèmes protéolytiques dans de nombreux types cellulaires, parmi lesquels les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Nos résultats montrent que c'est bien le cas dans les cellules endothéliales de la BHE et de la BSME, tant pour le TNF- $\alpha$  que pour TWEAK. En particulier, l'inflammation des CEMCs par le TNF- $\alpha$  entraîne une rapide et forte induction des gènes codant pour MMP-3, MMP-9, MMP-10, MMP-12 et MMP-13, sans modulation de l'expression des ARNm codant leurs inhibiteurs endogènes, les TIMPs, ainsi qu'une spécificité d'induction par TWEAK de MMP-3 et MMP-12 au niveau des CEMSs. L'inflammation des CEMCs et des CEMSs par TWEAK induit tardivement (48 hr) l'expression des MMPs, sans doute en lien avec le décalage d'induction des marqueurs de l'inflammation CCL-2, IL-6 et IL-8 dans ces cellules. Nous projetons de valider au niveau protéique l'activité de MMP-9 par des approches de gel zymographie et zymographie *in situ* et valider l'expression d'autres protéases par western blot et immunocytochimie.

L'expression des MMPs est sans doute à mettre en relation avec une ouverture paracellulaire de la monocouche de CEMCs observée par mesure du  $Pe_{(LY)}$ , après traitement avec le TNF- $\alpha$  5 ng/mL pendant 24 hr. Cette perte d'intégrité de la barrière pourrait être due : (i) à la désorganisation de l'occludine en périphérie cellulaire observée par immunocytochimie, sans dégradation apparente et (ii) au clivage ou la dégradation de la claudine-5 et de la ZO-1 observés par western blot. Concernant l'absence de clivage ou de dégradation apparente de l'occludine, une autre hypothèse pourrait être un « turn-over » important de la protéine avec une néosynthèse qui compenserait sa dégradation. Nous envisageons de réaliser une cinétique permettant de suivre, après l'arrêt du traitement inflammatoire, la réexpression et l'adressage en périphérie cellulaire des protéines de JS et mettre en évidence un effet d'ouverture transitoire et polarisé des barrières. Nous avons confirmé que MMP-9 recombinant, comme le TNF- $\alpha$ , entraîne une perte d'intégrité de la barrière. Cependant, différents inhibiteurs de protéases (large spectre ou spécifique de certaines MMPs) co-incubés avec le TNF- $\alpha$  ne permettent pas de prévenir l'ouverture paracellulaire et ne

semblent pas réduire la réponse inflammatoire quantifiée par la libération de CCL-2 dans les surnageants de culture.

Finalement, une question importante dans notre stratégie de ciblage de récepteurs pour passer la BHE et la BSME, notamment en situation pathologique, était celle d'une modulation de l'expression de certains récepteurs cibles dans des barrières enflammées. Au moins au niveau des ARNm, nous n'avons pas observé de modulation notable de l'expression des récepteurs suivants : EPCR, IGFR1, IR, LDLR, LRP1, LRP8, RAGE et TfR. L'expression de ces récepteurs ne serait donc pas modulée par l'inflammation dans nos conditions expérimentales. Ainsi, l'activation des transports transcellulaires par le TNF- $\alpha$ , décrits par différents groupes pour le LDL (Descamps *et al.*, 1997), la transferrine (Miller *et al.*, 2005) et la lactoferrine (Fillebeen *et al.*, 1999) pourrait résulter d'une activation du mécanisme de transport plutôt que d'une augmentation de l'expression des récepteurs.

### III. Protocole expérimental

Nous avons mis en place un protocole permettant de comparer le transcriptome des monocouches de CEMCs et CEMs en condition saines et enflammées par des cytokines pro-inflammatoires, TNF- $\alpha$  5 ng/mL (Peprotech, Neuilly-Sur-Seine, France) et TWEAK 100 ng/mL (Peprotech) selon une cinétique d'incubation de 12 hr, 24 hr et 48 hr (Figure 1). Pendant le temps d'analyse, le sérum du milieu de culture a été réduit de 20 % à 5 % afin d'éviter au maximum l'apport exogène de protéines plasmatiques, notamment les MMPs ou des cytokines lors des phases d'inflammation et lors des dosages protéiques dans les surnageants de cultures. Les ARN totaux et les lysats cellulaires ont été récoltés afin de valider l'inflammation des monocouches, selon les approches suivantes :

- PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) des marqueurs CCL-2, IL-6 et IL-8.
- Dosage ELISA de la sécrétion de CCL-2 et IL-6 dans les surnageant de culture.
- Observation de l'intégrité de la barrière:
  - Mesure de la perméabilité au LY:  $Pe_{(LY)}$ .
  - Analyse par western blot de l'intégrité des protéines de jonctions serrées: ZO-1, claudine-5 et occludine.
  - Analyse par immunocytochimie de l'organisation des protéines de jonctions serrées: ZO-1, claudine-5 et occludine.



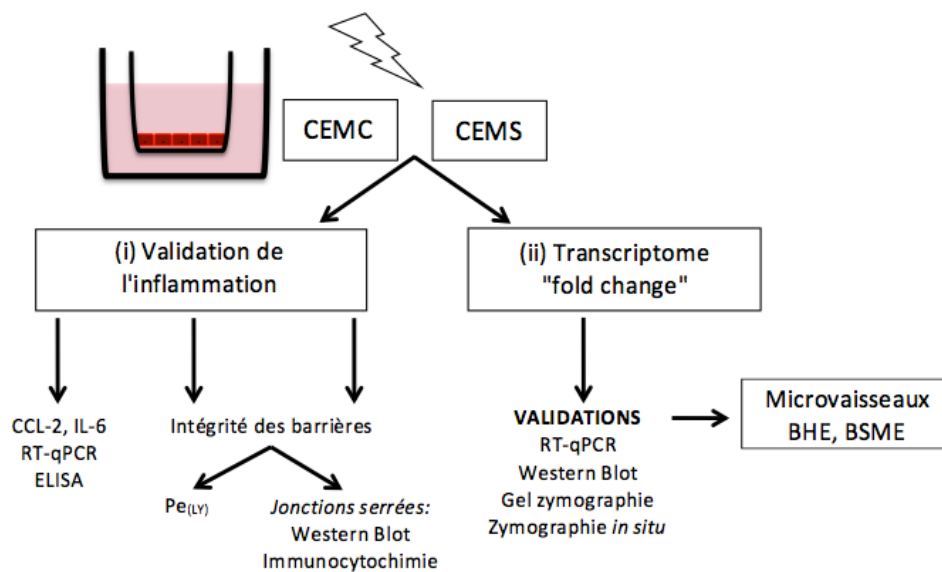
Ces analyses et dosages ont validé une réponse inflammatoire des monocouches et une analyse transcriptomique a été réalisée sur les ARN totaux par hybridation sur puce à ADN (Whole Rat Genome Oligo Microarrays; 40 000 genes, Agilent Technologies) avec normalisation des données brutes. L'analyse comparative des transcriptomes a été réalisée selon la méthode du « fold change ». Les observations issues de cette analyse ont ensuite été validées par:

- RT-qPCR à partir des mêmes échantillons d'ARN totaux.
- Western Blot à partir des lysats cellulaires, extraits avec le tampon RIPA (Sigma Aldrich).

Des analyses complémentaires sont en cours avec les approches suivantes :

- Gel zymographie à partir des lysats cellulaires.
- Zymographie *in situ* sur les monocouches de CEMs.

Concernant la comparaison entre les CEMCs et les CEMSs dans leur état constitutif, certains marqueurs d'intérêts ont été validés par RT-qPCR et Western Blot à partir de microvaisseaux fraîchement extraits du cerveau et de la moelle épinière.

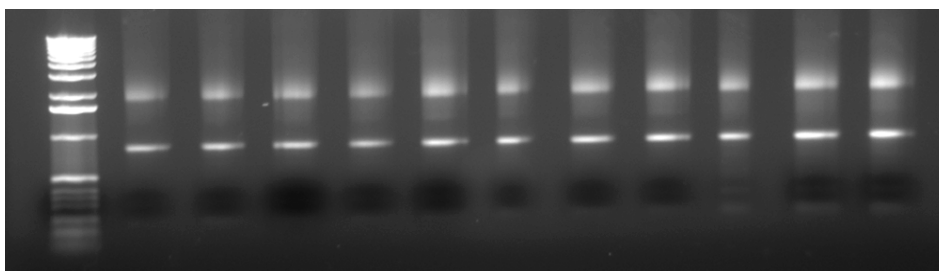


**Figure 1:** Diagramme expérimental détaillant les différentes étapes (i) de validation de l'inflammation et (ii) de validation des marqueurs d'intérêt issus de l'analyse comparative des transcriptomes (méthode du fold change) des monocouches de CEMCs et CEMSs en condition contrôle et enflammées.

## A. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux des monocouches de CEMCs et CEMSs en condition contrôle et enflammées ont été extraits avec le RNeasy plus Universal Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fournisseur. Les solutions d'ARN totaux ont été quantifiées par dosage

spectrométrie (260/280nm et 260/230nm) et la qualité des échantillons (1µg/piste) a été estimée par électrophorèse sur gel d'agarose 6% (v/v), formaldéhyde 1% (w/v) en condition dénaturantes (Figure 2; Tableau 1).



**Figure 2:** Exemple de gel d'électrophorèse montrant la qualité des ARN totaux extraits à partir des monocouches de CEMCs et CEMSs, sans trace apparente de contamination par l'ADN génomique. On observe deux bandes de 4.5 kb et 1.9 kb correspondant respectivement aux ARN ribosomiques 28S et 18S.

		Concentration (ng/µL)	DO 260/280	DO 260/230
12 hr	Ctrl	114,6	1,63	1,85
	TNF-α	114,6	1,69	1,47
24 hr	Ctrl	118,6	1,66	1,15
	TNF-α	155,9	1,74	1,43
48 hr	Ctrl	128,2	1,79	0,88
	TNF-α	148,6	1,73	0,92

**Tableau 1:** Exemple de dosages spectrométriques (260/280nm et 260/230nm) permettant d'estimer la qualité des échantillons d'ARN préparés.

## B. Analyse comparative des transcriptomes

### 1. Méthode du "fold change"

Le seuil de significativité a été fixé par la méthode du "fold change" qui utilise la formule suivante:  $2^{(\text{Condition a} - \text{condition b})}$  permettant de comparer l'état constitutif ou enflammé des cellules. Pour rappel, cette méthode du fold change est comparable à la méthode  $\Delta\Delta\text{Ct}$  utilisée en RT-qPCR pour laquelle le niveau d'expression de l'ARNm d'intérêt est donnée par la formule  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  dans laquelle  $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT ARNm cible} - \Delta\text{CT ARNm référence (GAPDH)}$ . Deux analyses du transcriptome ont été réalisées à partir de préparations de deux lots de CEMCs et CEMSs différentes. Nous n'avons

conservé que les fold change, induction ou répression, reproductibles entre les deux analyses. Pour notre analyse, et selon une approche classique, nous avons défini les folds change supérieurs à 1.45 pour le seuil d'induction et < 0.6 pour le seuil de répression. Une partie des analyses ont été réalisées avec le logiciel PredictSearch développé par le Dr. Philippe Benech associé à notre projet.

Pour chaque gène, nous avons comparé les conditions suivantes:

- (i) les CEMCs par rapport aux CEMSs afin de déterminer des différences d'expression constitutive,
- (ii) les CEMCs enflammées par TNF- $\alpha$  ou TWEAK par rapport au contrôle non traité,
- (iii) les CEMSs enflammées par TNF- $\alpha$  ou TWEAK par rapport au contrôle non traité.

## 2. *Protocole de RT-qPCR: sonde TaqMan*

Afin de valider certains marqueurs de l'inflammation et confirmer les données issues de l'analyse du transcriptome, des monobrans d'ADNc ont été synthétisés à partir de 1  $\mu$ g d'ARN totaux en utilisant le High Capacity RNA to cDNA Kit (Applied Biosystems, USA) selon les recommandations du fournisseur. Pour chaque sonde, la RT-qPCR a été réalisée avec le 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), en utilisant le TaqMan Fast Universal PCR Master Mix et deux réactifs du TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression (Applied Biosystems), selon les recommandations du fournisseur.

Les qPCR ont été réalisées à partir de 25 ng d'ADNc obtenus après transcription réverse. Les échantillons ont été quantifiés en duplicat sur une même microplaque de 96 puits et analysés avec le logiciel 7500 Software v2.0 (Applied Biosystems). Les différentes étapes de la PCR sont les suivantes : une dénaturation à 95 °C pendant 20 secondes suivie de 40 cycles de dénaturation à 95 °C pendant 3 secondes puis une élongation pendant 30 secondes à 60 °C. Les niveaux d'expression relatifs dans les échantillons sont déterminés selon la méthode de  $\Delta\Delta C_t$  pour laquelle le niveau d'expression de l'ARNm d'intérêt est donné par la formule  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  avec  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ ARNm cible} - \Delta C_t \text{ ARNm référence}$  (*GAPDH*, dont les niveaux sont stables dans le temps de l'analyse).

### **Sondes RT-qPCR: « gene ID »**

MCP1/CCL2 (Rn00580555 \_m1), Il6 (Rn01410330 \_m1), CXCL1/GRO1 (Rn00578225 \_m1) et CXCL3/GRO3 (Rn01414231 \_m1) en tant qu'analogues de l'IL8 humain chez le rat, MMP-3 (Rn00591740\_m1), MMP-9 (Rn00579162\_m1), MMP-10 (Rn00591678\_m1), MMP-12 (Rn00588640\_m1), MMP-13 (Rn01448199\_m1), TIMP-1 (Rn00587558 \_m1), ADAM-8 (Rn01479637\_m1), ADAM-10 (Rn01530753\_m1) et GAPDH en contrôle (Rn01775763 \_m1).

### 3. *ELISAs*

Certains surnageants de culture ont été collectés afin de doser par ELISA la sécrétion par les monocouches de CEMs de CCL-2 (Peprotech) et IL-6 (BD Biosciences, San Jose, CA) selon les recommandations des fournisseurs.

### 4. *Western Blot*

Les lysats cellulaires ont été réalisés dans du tampon RIPA puis soniqués et clarifiés par centrifugation pendant 20 min à 13 000 xg à 4 °C. Les analyses Western Blot ont été réalisées selon le protocole indiqué dans la partie Matériels et Méthodes de l'article 3 en utilisant les anticorps suivants : anticorps polyclonal de lapin anti-Occludine dilué au 1/400 dans du TBS-Tween 0,2% (Invitrogen, Zymed, référence 71-1500), anticorps monoclonal de souris anti-Claudine-5 dilué au 1/400 dans du TBS-Tween 0,2% (Invitrogen, Zymed, référence 35-2500), anticorps polyclonal de lapin anti-ZO-1 dilué au 1/400 dans du TBS-Tween 0,2% (Invitrogen, Zymed, référence 61-7300), anticorps polyclonal de lapin anti-HOXA9 dilué au 1/400 dans du TBS-Tween 0,2% (Novus biological référence NBP2-24633), anticorps polyclonal de lapin anti-HOXB7 dilué au 1/300 dans du TBS-Tween 0,2% (Proteintech référence 12613-AP).

## IV. Résultats

### A. Analyse comparative des transcriptomes des CEMCs et CEMSs: état constitutif

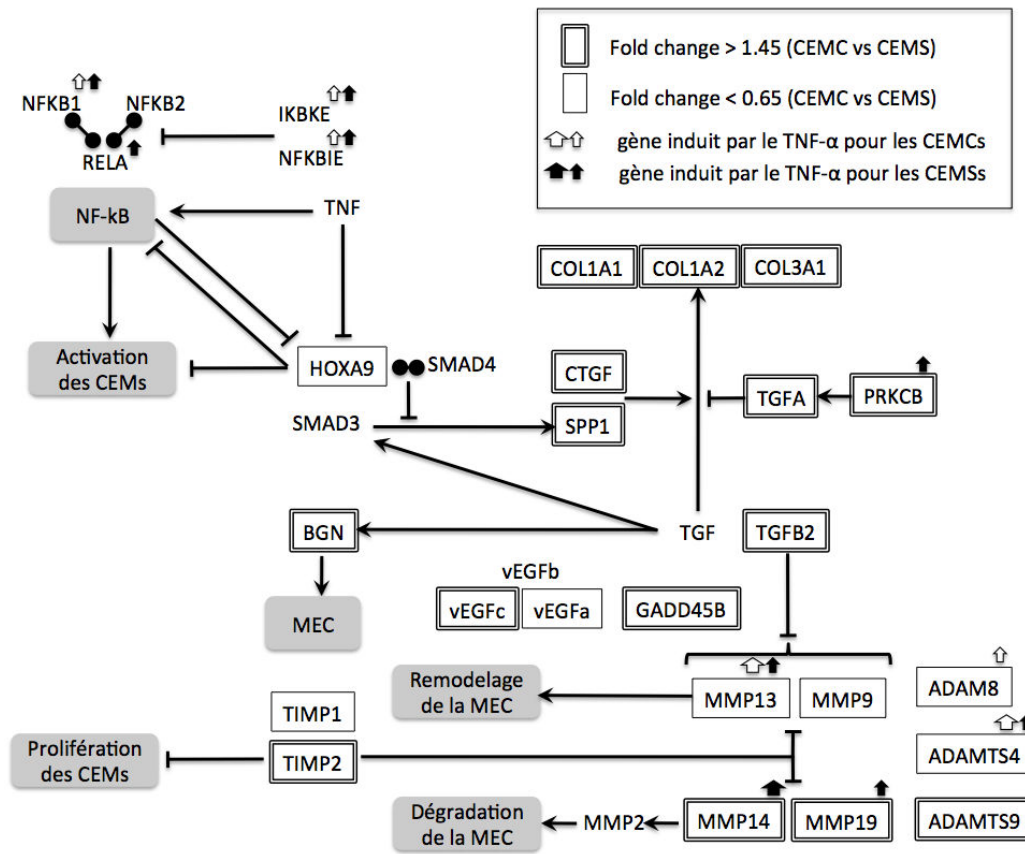
Le logiciel PredictSearch développé par le Dr. Philippe Benech est basé sur le regroupement de gènes en réseaux fonctionnels ou « noeuds Gordiens ». Les CEMCs et CEMSs ont d'abord été comparées dans leur état constitutif puis en fonction de l'agent pro-inflammatoire et du temps de traitement. Dans un premier temps, nous avons filtré les données pour ne conserver que les gènes dont les taux d'expression étaient similaires dans les CEMCs et CEMSs et identifier les gènes connus pour être des marqueurs (i) constitutifs, (ii) spécifiques ou inductibles des cellules endothéliales. Nous montrons dans les deux types de cellules endothéliales une expression constitutive et à des taux similaires des marqueurs constitutifs tels que PECAM1, HIF1A, ICAM2, ITGAV, MCAM et THBD ainsi que les marqueurs des « human vein endothelial cells » (HUVEC) tels que DSP et CD34. Le potentiel de réponse aux cytokines des deux modèles cellulaires utilisés dans notre étude, était confirmé par l'induction, tout au moins par le TNF- $\alpha$ , des gènes ICAM1 et VCAM1.

Nous avons ensuite identifié 445 gènes différenciellement exprimés entre CEMCs et CEMSs pour l'ensemble des répliques (304 pour un fold change  $\geq 1.45$  et à l'inverse, 141  $\leq 0.65$ ). Les 50

premiers gènes les plus modulés (fold change 3 à 20), correspondent dans une forte proportion à de gènes plus exprimés dans les CEMCs, ils codent pour des protéines de l'adhésion cellulaire (TIMP-2, ADAM-TS9) et plus particulièrement pour des protéines de la MEC, sans doute de la lame basale, avec des membres de la famille des collagènes, tels que COL1A1 (fold change 17), COL1A2 (fold change 14), COL3A1 (fold change 21) et pour le biglycan (BGN, fold change 23), un protéoglycan de la MEC impliqué dans l'assemblage des fibrilles de collagène.

L'analyse réalisée à l'aide de PredictSearch sur cet ensemble de gènes ainsi que sur les gènes modulés qui leur sont fonctionnellement associés conduit à proposer que cette forte expression constitutive des collagènes résulte de l'action combinée de l'ostéopontine (SPP1, fold change 5) et du connective tissue growth factor (CTGF, fold change 5) (Meng *et al.*, 2014). Ces deux facteurs sont impliqués dans des activités fibrosantes et CTGF est un composant important de la MEC. En effet, CTGF peut coopérer avec le TGF- $\beta$  pour induire une fibrose soutenue et exacerber la production de MEC (Mori *et al.*, 1999).

Tout comme l'expression de BGN, celle de SPP1 et de CTGF serait elle-même sous le contrôle transcriptionnel du TGF- $\alpha$  (fold change 3) qui, avec TGF- $\beta$ 2 (fold change 205), représente un inducteur possible de plusieurs gènes plus exprimés dans les CEMCs que dans les CEMSs. Cependant, le TGF- $\alpha$  inhibe la synthèse de collagène induite par le TGF- $\beta$  et induit leur dégradation. Le TGF- $\alpha$ , ligand du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR), stimule la prolifération des cellules endothéliales en culture et est un puissant activateur de l'angiogenèse. Synthétisée sous la forme d'un précurseur, la forme active du TGF- $\alpha$  résulte de 2 clivages protéolytiques et plusieurs études démontrent le rôle de l'isoforme beta de la protéine kinase C codée par le gène PRKCB (fold change 2,2) dans cette maturation. L'augmentation de l'expression de SPP1 qui requière l'activité de PRKCB (Maruvada et Levine, 1999) pourrait, au moins en partie, expliquer l'induction de SPP1 par TGF- $\alpha$  (Figure 3).

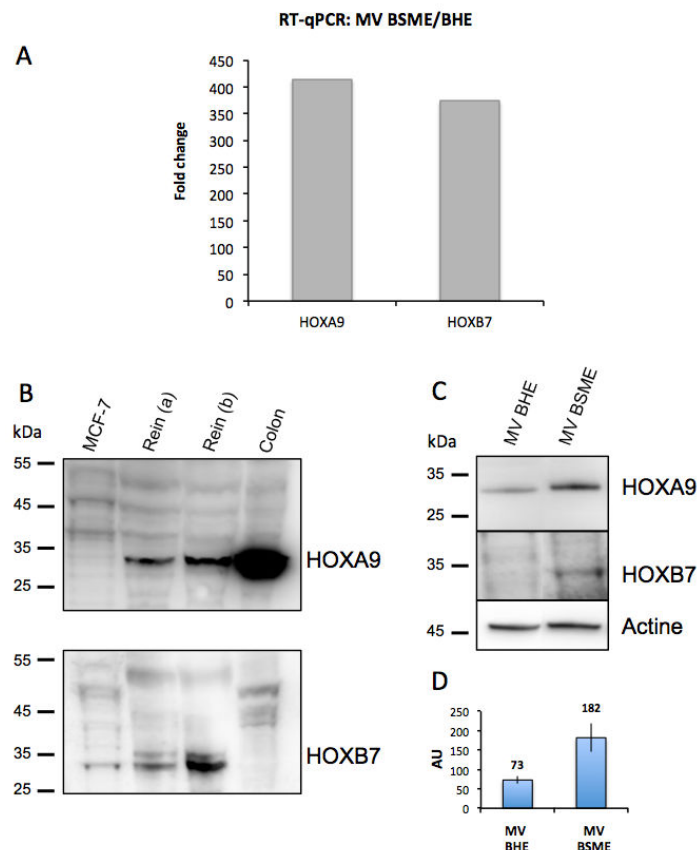


**Figure 3 :** Schéma issu du logiciel PredictSearch montrant les regroupements de gènes en réseaux fonctionnels selon l'analyse comparative des transcriptomes des monocouches de CEMCs par rapport aux CEMSs en conditions constitutives et enflammées TNF-α.

Inversement, plusieurs membres de la famille des homeobox présentent une expression plus faible dans les CEMCs que dans les CEMSs. HOXA9 (fold change 0,04) qui est le gène le plus différenciellement exprimé, réprime l'induction par le TGF-β de SPP1 (Shi *et al.*, 2001b). Il a été montré que cette répression résulte d'une compétition entre SMAD3 et le complexe formé par l'interaction de SMAD4 avec HOXA9 pour la liaison au promoteur du gène SPP1 (Figure 3).

Sur un autre plan, si les gènes codant pour d'autres régulateurs de la MEC tels MMP-14 (fold change 4) et MMP-19 (fold change 1,6) sont plus exprimés dans les CEMCs, l'expression de MMP-13 (fold change 0,4) et MMP-9 (fold change 0,4) est significativement plus faible que dans les CEMSs. Si la faible expression de MMP-13 et MMP-9 est une conséquence de l'inhibition transcriptionnelle exercée par TGF-β2 sur ces gènes (Tchetina *et al.*, 2006), l'expression de MMP-14 et MMP-19 pourrait être sous un contrôle spécifique. L'existence d'un tel contrôle est illustrée par la co-expression de MMP-14 et MMP-19 ainsi que de PRKCB, COL1A1, COL1A2 et COL3A1 observée dans le cas d'un aneurisme thoracique aortique (Jackson *et al.*, 2012, Jones *et al.*, 2010).

Cette première analyse comparative du transcriptome des CEMCs et des CEMs en situation basale, grâce au logiciel PredictSearch révèle une centaine de gènes cibles du TGF. Ainsi, l'une des caractéristiques différenciant les CEMCs des CEMs résiderait dans la signalisation impliquant le TGF et dans la régulation de l'expression constitutive des homeobox, en particulier HOXA9 et HOXB7. Ces résultats au niveau des ARNm de cellules en culture ont été confirmés par une analyse en RT-qPCR, puis pas analyse par western blot des microvaisseaux fraîchement extraits du cortex et de la moelle épinière (Figure 4).



**Figure 4** : Analyse de l'expression de l'ARNm codant pour et de l'expression protéique de : HOXA9 et HOXB7 dans les microvaisseaux (MV) digérés issus de la BHE (MV BHE) et de la BSME (MV BSME) de rat.

**A.** Analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes codant pour HOXA9 et HOXB7 (méthode de  $\Delta\Delta C_t$  par rapport à l'ARNm référence GAPDH puis rapporté à 1 pour les MV BHE).

**B.** Analyse par Western blot de l'expression de HOXA9 et HOXB7 à partir de lysats cellulaires de cellules MCF-7 (lignée de cellules tumorales mammaires humaine, 70  $\mu$ g), de lysat de rein de rat (a : 200  $\mu$ g et b : 400  $\mu$ g) et de lysat de colon (200  $\mu$ g) en tant que contrôles positifs d'expression.

**C.** Analyse par Western Blot de l'expression de HOXA9 et HOXB7 à partir de lysats cellulaires de MVs digérés issus de la BHE (MV BHE) ou de la BSME (MV BSME) de rat (30 et 200  $\mu$ g respectivement). L'actine, permet de contrôler l'homogénéité des dosages protéiques et de dépôts dans le gel.

**D.** L'intensité des bandes pour la protéine HOXA9 a été quantifiée avec le logiciel ImageJ.

Il a été montré que HOXA9 assure la maintenance de l'état basal des cellules endothéliales et que la répression de son expression est cruciale durant l'activation de ces cellules en réponse au signal inflammatoire (Trivedi *et al.*, 2007). Les cellules endothéliales cérébrales et de la moelle épinière pourraient différer par des proportions distinctes de sous populations à différents stades de différenciation ou de maturation/activation. Alternativement, il est possible que ces cellules diffèrent par leur potentiel intrinsèque d'activation.

## B. Analyse comparative des transcriptomes des CEMCs et CEMSs enflammées

### 1. Les chémokines CCL-2 et IL-8 et la cytokine IL-6

#### a) Analyse des données du transcriptome

Nous avons commencé par vérifier l'induction de marqueurs de l'inflammation tels que CCL-2, IL-6 et IL-8 (Tableau 2).

	CEMC		CEMS		CEMS/CEMC Constitutif
	TNF- $\alpha$	TWEAK	TNF- $\alpha$	TWEAK	
CCL-2	<b>12H: 5,65</b> <b>24H: 3,89</b> <b>48H: 3,4</b>	12H: 1,40 24H: 2,27 48H: 3,87	<b>12H: 1,83</b> <b>24H: 2,96</b> <b>48H: 2,90</b>	12H: 0,81 24H: 1,29 <b>48H: 2,56</b>	12H: 1,52 24H: 1,35 48H: 1,35
IL-6	12H: 1,18 24H: 1,14 48H: 1,16	12H: 1,04 24H: 1,16 48H: 1,01	12H: 1,06 24H: 1,02 48H: 1,37	12H: 1,04 24H: 1,05 48H: 1,06	12H: 0,92 24H: 1,04 48H: 0,94
IL-8 analogue Cxcl1=GRO1	12H: 2,21 24H: 1,81 48H: 1,61	12H: 0,88 24H: 1,08 48H: 1,81	12H: 1,01 24H: 1,64 48H: 1,55	<i>12H: 0,58</i> 24H: 0,88 48H: 1,55	12H: 1,2 24H: 1,2 48H: 1,2
IL-8 analogue Cxcl2=MIP2 $\alpha$ =GRO2	<b>12H: 3,81</b> <b>24H: 2,73</b> 48H: 1,98	12H: 1,13 24H: 1,38 48H: 1,75	12H: 1,27 <b>24H: 2,45</b> <b>48H: 2,30</b>	<i>12H: 0,58</i> 24H: 1,62 48H: 1,41	12H: 1,2 24H: 1,2 48H: 1,2
IL-8 analogue Cxcl3=MIP2 $\beta$ =GRO3	<b>12H: 8</b> <b>24H: 6,33</b> <b>48H: 5,31</b>	12H: 1,2 24H: 2,24 <b>48H: 6,03</b>	12H: 1,29 <b>24H: 5,06</b> <b>48H: 4,05</b>	<i>12H: 0,58</i> 24H: 2,32 <b>48H: 3,54</b>	12H: 1,65 24H: 1,7 48H: 1,65

**Tableau 2:** Analyse comparative de l'expression des gènes codant pour CCL-2, IL-6 et les analogues rats de l'IL-8 humain selon les conditions du protocole (méthode du fold change par rapport aux contrôles non traités à chaque temps). En gras et en bleu les fold change les plus marqués, notamment dans la durée.

Globalement, l'effet du TNF- $\alpha$  est plus précoce, avec un pic d'induction, dès 12 hr, des marqueurs CCL-2 et IL-6, comparé à celui de TWEAK qui n'apparaît en général qu'au temps 48 hr. La comparaison entre les CEMCs et CEMSs après traitement avec le TNF- $\alpha$  révèle que les tissus répondent différemment. D'une manière générale, pour les CEMCs, la réponse inflammatoire est présente dès 12 hr avec certains pics à 24 hr alors qu'elle est décalée et moins forte pour les CEMSs.

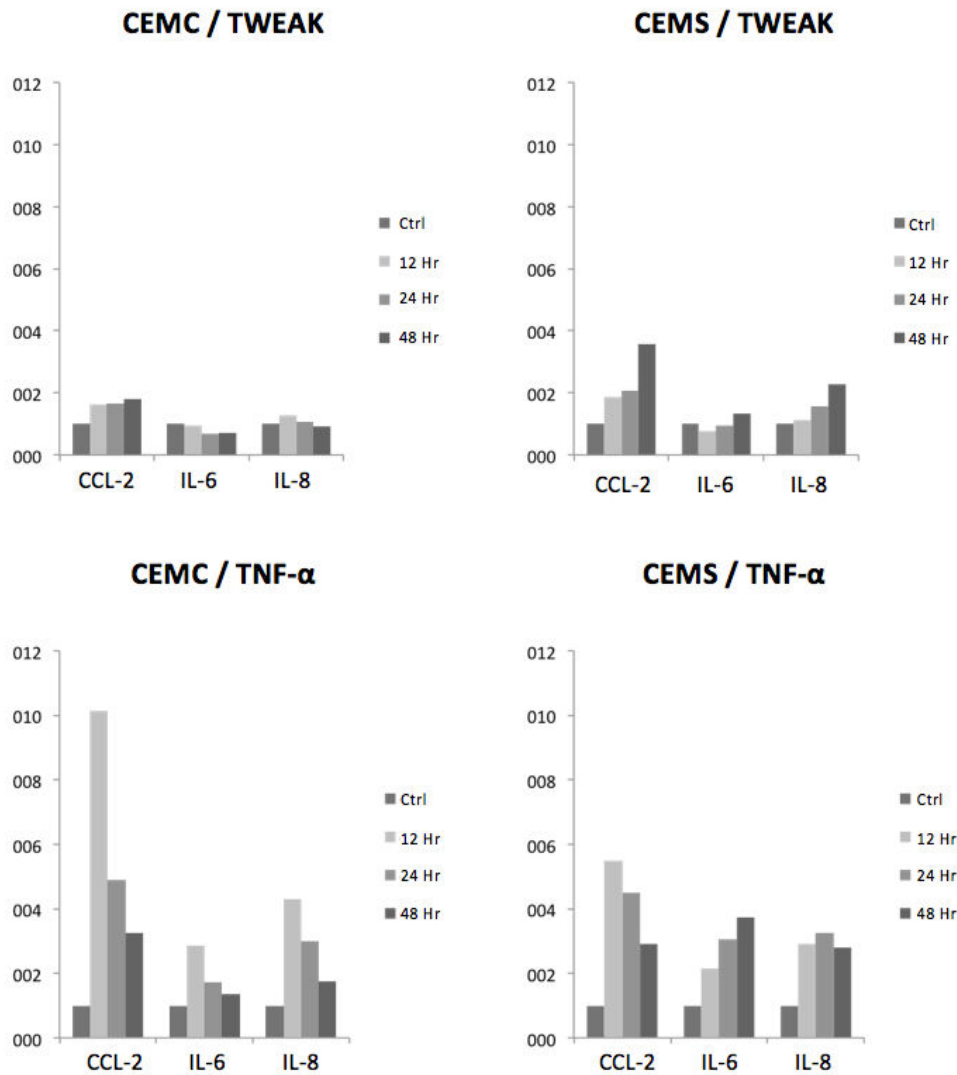
Lorsque l'on compare les CEMSs aux CEMCs dans leur état constitutif, quel que soit le temps de remplacement du milieu de culture (12, 24 ou 48 hr), les CEMSs semblent avoir un état



d'expression basal des chimiokines CCL-2 et IL-8 supérieur aux CEMCs. Cette observation pourrait expliquer un effet moindre du TNF- $\alpha$  sur les et CEMSs et le décalage dans le temps de leur réponse à l'inflammation par le TNF- $\alpha$ .

b) *Validation par RT-qPCR*

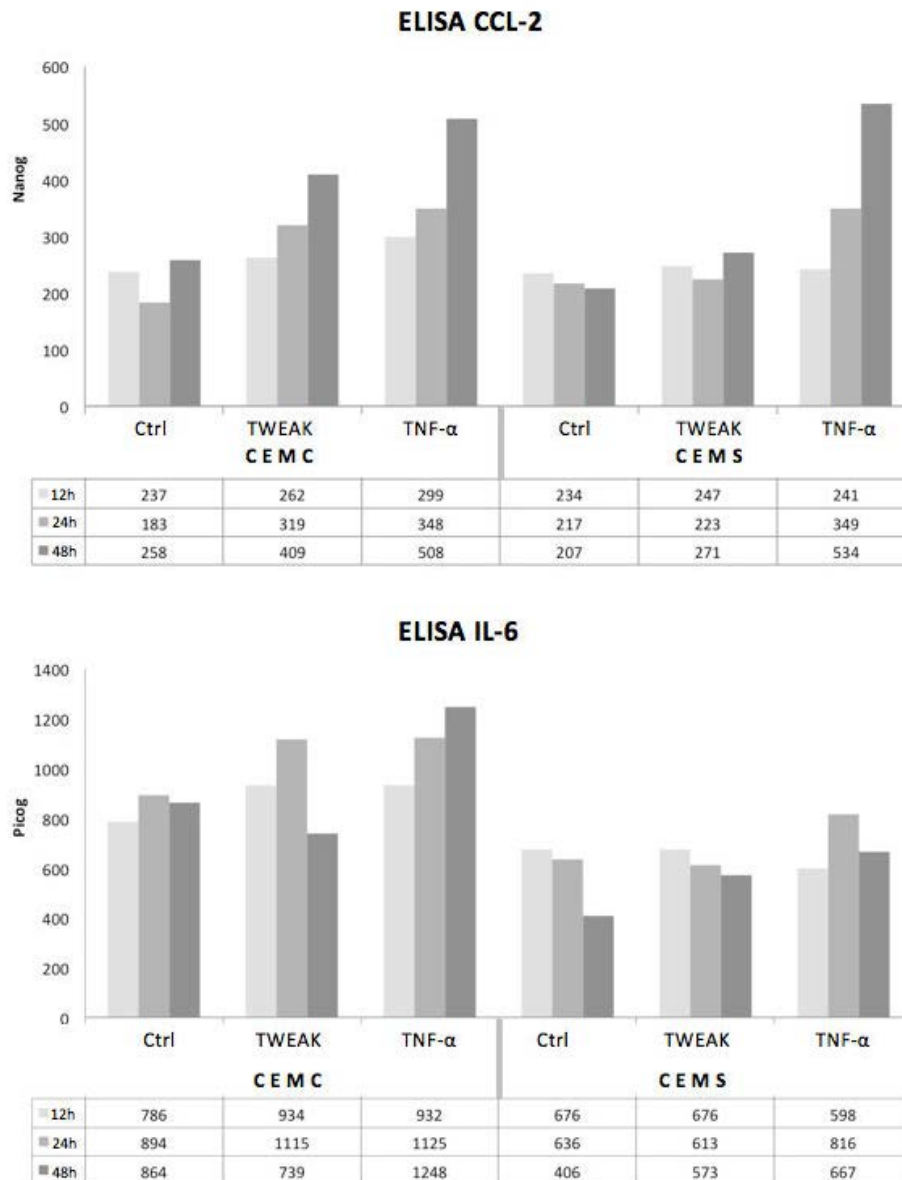
Nous avons observé une réponse inflammatoire différente avec TWEAK et TNF- $\alpha$  pour un même type cellulaire, et une réponse différentielle des monocouches CEMCs et CEMSs pour une même cytokine (Figure 5). Les CEMCs répondent faiblement à TWEAK, pour l'ensemble des marqueurs par rapport aux CEMSs dont les marqueurs CCL-2 (fold change 4) et IL-8 (fold change 2) augmentent progressivement pendant les 48 hr de traitement. A contrario, les CEMCs répondent fortement à l'inflammation par le TNF- $\alpha$  avec un pic d'expression dès 12 hr, atteignant 10 fois le niveau contrôle pour CCL-2 puis une baisse de l'ensemble des marqueurs à 48 hr. Les CEMSs répondent également à l'inflammation par le TNF- $\alpha$  avec un profil d'expression proche des CEMCs pour CCL-2 avec un pic à 12 hr. Cependant, les CEMSs présentent un profil d'expression différent des CEMCs pour IL-6 qui augmente progressivement entre 12 hr et 24 hr et IL-8 qui semble atteindre un plateau dès 12 hr. **Globalement, pour le TNF- $\alpha$ , la réponse inflammatoire apparaît plus forte au niveau des CEMCs par rapport aux CEMSs. A contrario, les CEMSs répondent plus à TWEAK, bien que la réponse soit faible, par rapport au CEMCs qui ne répondent pas à cette cytokine pour les marqueurs suivis.**



**Figure 5:** Analyse par RT-qPCR des marqueurs de l'inflammation CCL-2, IL-6 et IL-8 exprimés par les monocouches de CEMCs et CEMSs après traitement avec TNF-α 5 ng/mL et TWEAK 100 ng/mL selon une cinétique d'incubation de 12 hr, 24 hr et 48 hr (méthode de  $\Delta\Delta C_t$  par rapport à l'ARNm référence GAPDH).

c) **Dosage ELISA: CCL-2 et IL-6**

Les surnageants de culture ont été collectés afin de doser par ELISA la sécrétion de CCL-2 et IL-6 par les monocouches de CEMs (Figure 6).



**Figure 6:** Dosage ELISA de CCL-2 et IL-6 dans les surnageants de culture après traitement avec le TNF- $\alpha$  5 ng/mL et TWEAK 100 ng/mL selon une cinétique d'incubation de 12 hr, 24 hr et 48 hr.

Les CEMCs sécrètent progressivement CCL-2 en fonction du temps de traitement avec TWEAK et TNF- $\alpha$  de façon similaire, atteignant un pic à 48 hr, entre 400 et 500 ng dans 2 mL de surnageant correspondant à une surface cellulaire de 4,7 cm<sup>2</sup> (insert de plaque 6 puits). Cette observation reflète en partie les résultats de RT-qPCR qui montraient pour le traitement au TNF- $\alpha$

une augmentation avec un pic à 12 hr du marqueur CCL-2 qui se traduisait progressivement en protéine alors que TWEAK ne révélait qu'une très faible induction de CCL-2.

Les CEMSs sécrètent progressivement CCL-2 en fonction du temps de traitement avec TNF- $\alpha$ , atteignant un pic à 48 hr. Cette augmentation est similaire au CEMCs et cohérente avec résultats de RT-qPCR qui montraient un pic d'expression dès 12 hr de l'ARNm codant CCL-2. A contrario, les CEMSs ne sécrètent pas CCL-2 en réponse au traitement par TWEAK. Il existe une corrélation avec les résultats de RT-qPCR qui montraient une induction de l'expression des transcrits CCL-2 seulement après 48 hr de traitement, probablement au-delà du temps de traduction en protéine et du dosage.

Les CEMCs sécrètent de faibles quantités d'IL-6 en réponse au traitement par TWEAK et TNF- $\alpha$ , de façon cohérente avec les résultats de RT-qPCR. En particulier, les RT-qPCR des CEMCs traitées par TNF- $\alpha$  montraient un profil d'expression progressif avec un pic à 48 hr, probablement au-delà du temps de traduction en protéine et du dosage. Par contre, dans les CEMSs il n'y a pas de lien entre les transcrits évalués par qPCR en réponse au traitement TNF- $\alpha$  et l'absence de sécrétion d'IL-6.

**Ces études révèlent des délais de réponse entre les deux agents pro-inflammatoires et les deux endothéliums concernant (i) l'expression des ARNm codant les marqueurs inflammatoires suivis (CCL-2, IL-6 et IL-8), (ii) leur traduction en protéine et (iii) leur sécrétion dans le surnageant de culture, suggérant des différences de réponse à l'inflammation.**

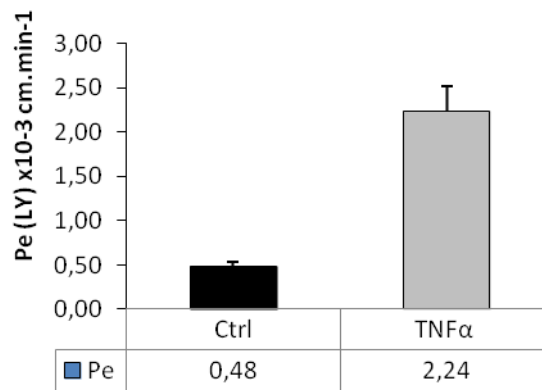
## 2. *Analyse de l'intégrité des monocouches de CEMCs enflammées TNF- $\alpha$*

Dans cette partie de l'étude, nous avons réalisé des tests uniquement à partir des monocouches de CEMCs et inflammation TNF- $\alpha$  avec pour objectif de comparer nos résultats aux données de la littérature obtenues avec des modèles de BHE *in vitro*.

### a) **Quantification de la perméabilité au LY, $Pe_{(LY)}$**

L'inflammation des monocouches de CEMCs a été induite par incubation dans le compartiment luminal du TNF- $\alpha$  5 ng/mL pendant 24 hr. A la fin de ce traitement, l'intégrité de la barrière a été quantifiée par la mesure de la perméabilité de surface endothéliale du lucifer yellow (LY) ou  $Pe_{(LY)}$  (Figure 7) tel que décrit dans le premier article de ce manuscrit (Molino *et al.*, 2014). Brièvement, le LY est une petite molécule fluorescente hydrophile de 457,3 g/mol qui ne franchit pas la BHE. La mesure par fluorimétrie de sa fuite en paracellulaire du compartiment luminal vers le

compartiment abluminal permet de quantifier l'intégrité des monocouches de CEMCs par rapport au contrôle non enflammé.



**Figure 7:** Quantification par fluorimétrie de la perméabilité de surface endothéliale du lucifer yellow (LY) ou  $Pe_{(LY)}$  exprimé en  $10^{-3}$  cm/min avec ou sans inflammation des monocouches de CEMCs avec le TNF- $\alpha$  5ng/mL pendant 24 hr.

Le graphe de la Figure 7 révèle une forte augmentation du  $Pe_{(LY)}$  en condition enflammé par le TNF- $\alpha$  ( $>2.10^{-3}$  cm/min) par rapport au seuil d'intégrité que nous avons fixé à  $0,6.10^{-3}$  cm/min (Molino *et al.*, 2014) en conformité avec la littérature ; cette augmentation du  $Pe_{(LY)}$  indique une perte d'intégrité de la barrière ou ouverture de l'espace paracellulaire au LY.

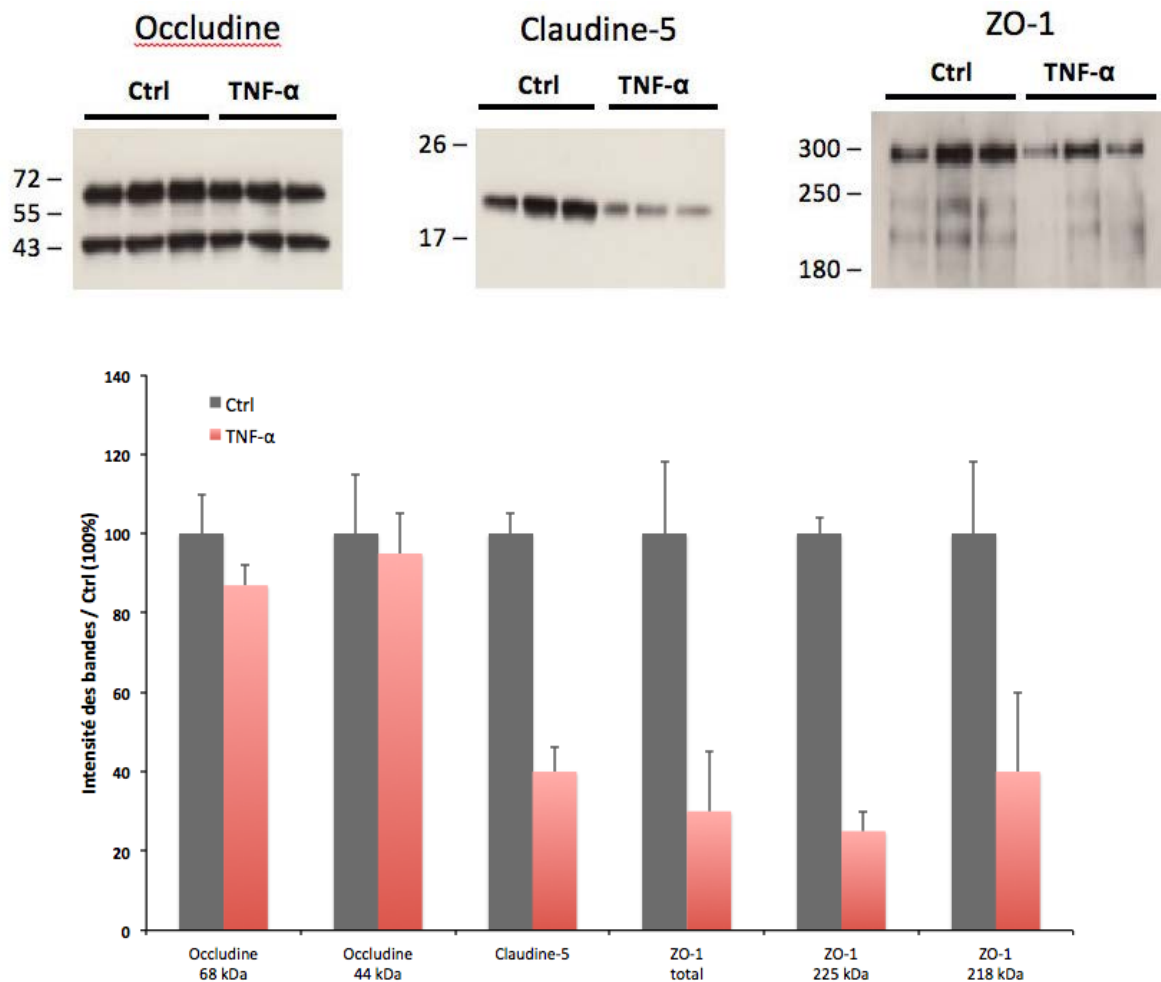
#### b) **Analyse par Western Blot des taux d'occludine, de claudine-5 et de ZO-1**

La perte d'intégrité de la barrière est généralement associée à une désorganisation des jonctions serrées qui peut avoir plusieurs causes, (i) leur dégradation directe ou indirecte par adressage vésiculaire vers le lysosome, (ii) une diminution de leur expression ou (iii) la désorganisation de la structure cellulaire par réorganisation du cytosquelette ou une rupture de la MEC.

Nous avons réalisé des western blot à partir de lysats cellulaires de CEMCs avec ou sans inflammation pendant 24 hr avec le TNF- $\alpha$  5 ng/mL afin de comparer les taux d'expression de l'occludine, la claudine-5 et ZO-1 (Figure 8).

Nous n'avons observé aucune différence dans les taux d'expression de l'occludine après traitement au TNF- $\alpha$ . A contrario, nous avons observé une perte de plus de 60 % des taux de claudine-5 et de plus de 70 % de ZO-1. Les taux stables de l'occludine, par rapport aux autres

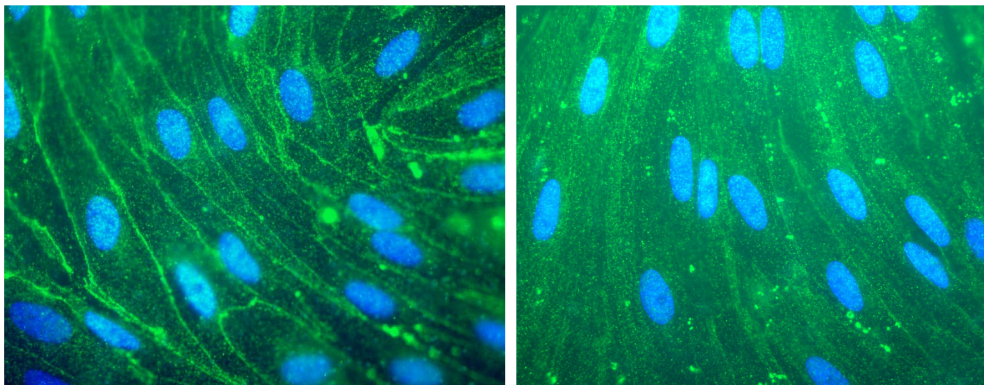
protéines de jonctions sont surprenants car cette protéine est décrite pour être la plus apicale et par conséquent la plus exposée à d'éventuelles protéases libérées par les cellules endothéliales enflammées par le TNF- $\alpha$ .



**Figure 8:** Analyse par Western Blot de l'occludine (poids moléculaire théorique 65 kDa, bandes détectées à 68 et 44 kDa), la claudine-5 (23 kDa théorique) et ZO-1 (220 kDa théorique, bandes à 218 et 225 kDa) à partir de lysats cellulaires de CEMCs enflammées avec le TNF- $\alpha$  5 ng/mL pendant 24 hr. Dans cette étude représentative, chaque bande est issue d'une monocouche de CEMCs. L'actine, non-montrée, permet de contrôler l'homogénéité des dosages protéiques et des dépôts dans les gels. L'intensité de chaque bande autour du poids moléculaire attendu a été quantifiée avec le logiciel ImageJ et normalisée à 100% pour les contrôles non traités.

c) **Observation par immunocytochimie de l'organisation des jonctions serrées**

Afin d'analyser l'effet du TNF- $\alpha$  sur les monocouches de CEMCs, plus particulièrement sur l'organisation des jonctions serrées, nous avons suivi la distribution cellulaire de l'occludine par immunocytochimie (Figure 9). Les photos montrent une désorganisation de l'adressage de l'occludine en périphérie cellulaire et une augmentation du marquage ponctiforme en surface cellulaire ou cytoplasmique. Ces observations pourraient être corrélées avec les résultats des Western Blot montrant un taux stable de l'occludine, suggérant pour cette protéine, une désorganisation de sa distribution cellulaire plutôt qu'une dégradation. Une autre hypothèse pourrait être un « turn-over » rapide de cette protéine pendant les 24 hr de traitement avec le TNF- $\alpha$  avec une compensation de sa dégradation par une augmentation de son expression comme pourrait le suggérer l'aspect ponctiforme du marquage (cytosolique ou membranaire) et un maintien partiel en périphérie cellulaire, caractéristique du marquage des jonctions serrées. Afin de confirmer et étoffer ces observations, la claudine-5 et la ZO-1 seront analysées selon la même approche. Une cinétique d'incubation du TNF- $\alpha$  permettrait d'observer la dégradation des jonctions serrées en fonction de leur polarisation et du temps de traitement avec l'agent pro-inflammatoire. Il sera également intéressant de suivre, après l'arrêt du traitement inflammatoire, la réexpression et l'adressage des protéines de jonctions en périphérie cellulaire pour mettre en évidence une ouverture transitoire et polarisée des barrières. Une alternative, consisterait également à bloquer la traduction protéique avec les inhibiteurs adéquats afin d'évaluer l'hypothèse d'une néosynthèse active qui compenserait une dégradation de l'occludine.



**Figure 9:** Monocouches de CEMCs fixées PFA 4%, perméabilisées au Triton 0.1% et marquées par immunocytochimie avec un anticorps anti-occludine en condition saine (gauche) ou enflammée par le TNF- $\alpha$  5 ng/mL pendant 24 hr (droite). L'anticorps primaire est ensuite révélé avec un anticorps secondaire couplé avec un Alexa fluor 488. Les noyaux sont révélés au Hoechst.

En regroupant l'ensemble des résultats sur l'intégrité des monocouches de CEMCs après traitement avec le TNF- $\alpha$  5 ng/mL pendant 24 hr, nous avons montré une ouverture en paracellulaire de la monocouche par mesure du  $P_{e(LY)}$  qui est probablement corrélée à une dégradation/désorganisation des jonctions serrées. En associant ces données à celles de RT-qPCR et d'ELISA montrant une expression et sécrétion de CCL-2 et IL-6, nous validons l'effet pro-inflammatoire du TNF- $\alpha$  et de TWEAK sur les cultures de CEMCs et CEMSs, permettant de poursuivre l'analyse comparative du transcriptome de ces monocouches.

### 3. *Analyse des protéases et leur inhibiteurs*

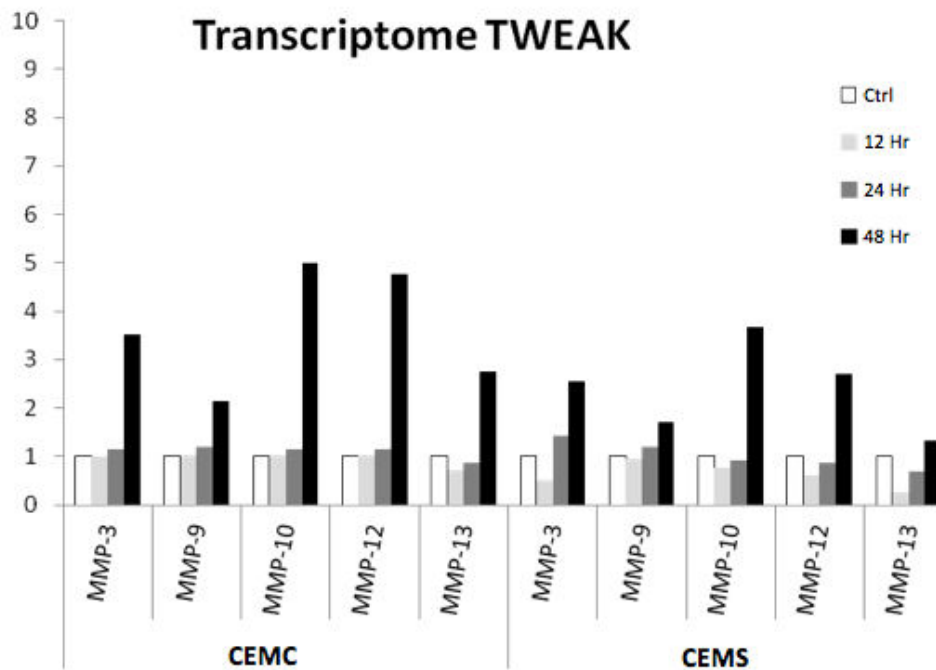
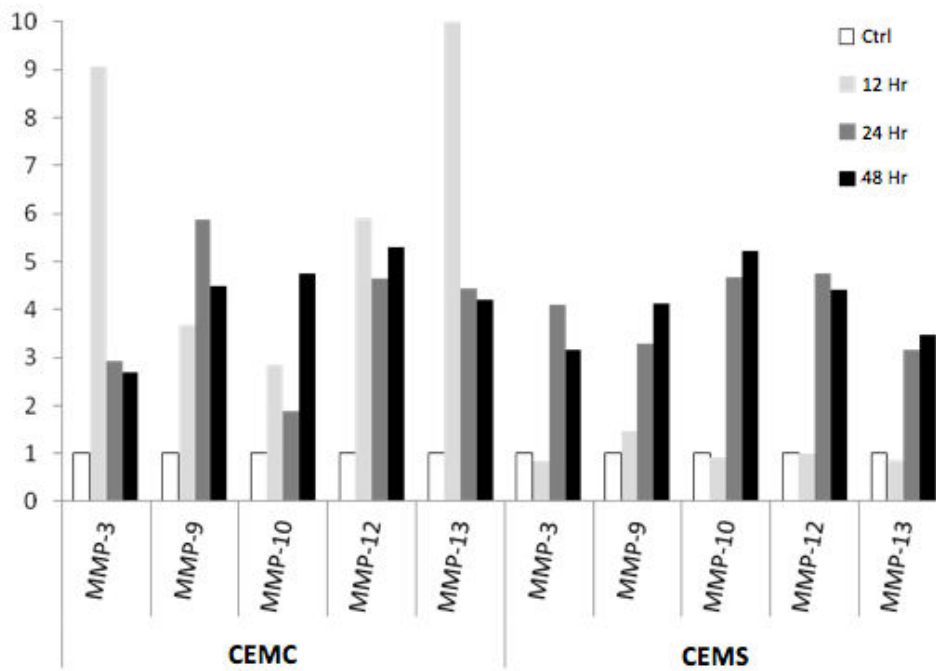
#### a) *Les MMPs*

##### (1) *Analyse des données du transcriptome*

Concernant l'induction de l'inflammation par le TNF- $\alpha$ , nous avons identifié 284 gènes induits pour les CEMCs avec un fold change > 1.45. Parmi l'ensemble de ces gènes, nous avons observé de fortes inductions, parmi les plus fortes (fold change 10 à 20), pour de nombreuses protéases dont certaines ont été décrites lors de processus inflammatoires *in vivo* associés à une ouverture transitoire ou pathologique de la BHE. Nous avons analysé en particulier l'expression des métalloprotéinases (famille MMP et Adamalysines), connues pour jouer un rôle essentiel dans l'organisation, la modulation ou la dégradation de la MEC, dans la modulation des réponses inflammatoires, et pour leur rôle modulateur des propriétés et de la perte d'intégrité de la BHE.



## Transcriptome TNF $\alpha$



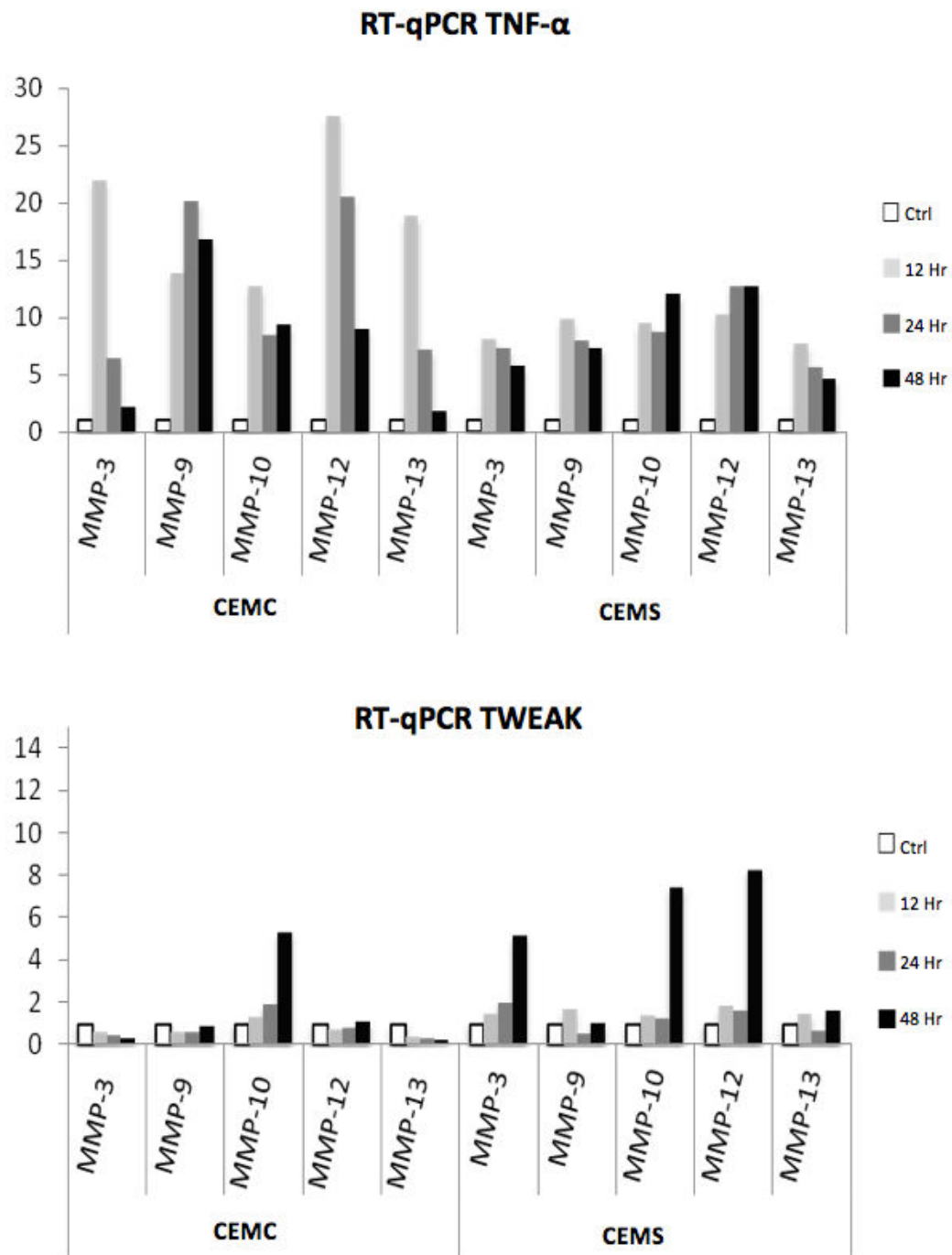
**Figure 10:** Analyse comparative de la modulation d'expression des gènes codant pour différentes MMPs entre les CEMCs et CEMs en conditions inflammées par TNF- $\alpha$  ou TWEAK pendant 12 hr, 24 hr et 48 hr (méthode du fold change par rapport aux contrôles non traités à chaque temps).

Concernant l'inflammation des CEMCs par le TNF- $\alpha$ , l'ensemble des marqueurs MMPs sélectionnés répondent plus fortement et plus rapidement, avec des pics d'induction dès 12 hr pour MMP-3 et MMP-13 (fold change entre 9 et 10), par rapport aux CEMSs dont la réponse reste proche du contrôle à 12 hr puis augmente à 24 et 48 hr à des taux comparables aux CEMCs (Figure 10). Notons cependant que les deux pics d'induction d'expression de MMP-3 et MMP-13 qui caractérisent les effets du TNF- $\alpha$  sur les CEMCs ne sont pas observés sur les CEMSs.

Concernant l'inflammation des CEMCs et des CEMSs par TWEAK, l'ensemble des marqueurs MMPs sélectionnés ne répondent pas avant le temps 48 hr, comme nous l'avons déjà observé avec le décalage d'induction des marqueurs de l'inflammation CCL-2, IL-6 et IL-8 (Tableau 2). **Ces résultats confirment pour les deux agents pro-inflammatoires un lien entre induction des marqueurs d'inflammation et induction des gènes codant pour les MMPs.**

Après 48 hr de traitement avec TWEAK, la réponse des CEMCs par rapport aux CEMSs est légèrement supérieure (fold change entre 2 et 3), à des niveaux globalement similaires à ceux de l'induction par le TNF- $\alpha$  (fold change  $\approx$  5). Les profils d'induction des CEMCs et des CEMSs se ressemblent, par exemple l'induction du marqueur MMP-9 par TWEAK reste très faible entre les deux tissus (fold change entre 1.5 et 2). A contrario, le marqueur MMP-13 présente des différences entre les tissus. TWEAK entraîne une induction de MMP-13 après 48 hr de traitement des CEMCs (fold change proche de 3) alors que MMP-13 n'est pas modulé par TWEAK pour les CEMSs au temps 12 hr.

(2) Validation par RT-qPCR



**Figure 11:** Analyse comparative par RT-qPCR de la modulation d'expression des gènes codant pour différentes MMPs entre les CEMCs set CEMSs en condition inflammées par TNF- $\alpha$  ou TWEAK pendant 12 hr, 24 hr et 48 hr (méthode de  $\Delta\Delta C_t$  par rapport à l'ARNm référence GAPDH).

Concernant l'inflammation des CEMCs par le TNF- $\alpha$ , les profils d'expression des marqueurs MMPs sont très similaires aux résultats du transcriptome avec des pics induction encore plus élevés, notamment pour MMP-3, MMP-12 et MMP-13 (10 à 25 fois) (Figure 11). La qPCR met en évidence une réponse plus précoce, dès 12 hr, des CEMCs comparée à l'analyse transcriptomique qui suggérait qu'il n'y avait pas de réponse à ce temps ; les taux d'induction sont ensuite stables (fold change entre 5 et 10) entre 24 hr et 48 hr.

Concernant l'inflammation des CEMCs par TWEAK, les RT-qPCR confirment les données du transcriptome pour MMP-9 qui n'était pas induit, et l'induction de MMP-10 au temps 48 hr (fold change  $\approx$  5). Pour les CEMCs, les RT-qPCR confirment les données du transcriptome avec l'induction par TWEAK au temps 48 hr de MMP-3, MMP-10 et MMP-12 (fold change entre 5 et 8) et l'absence d'induction de MMP-9 et MMP-13.

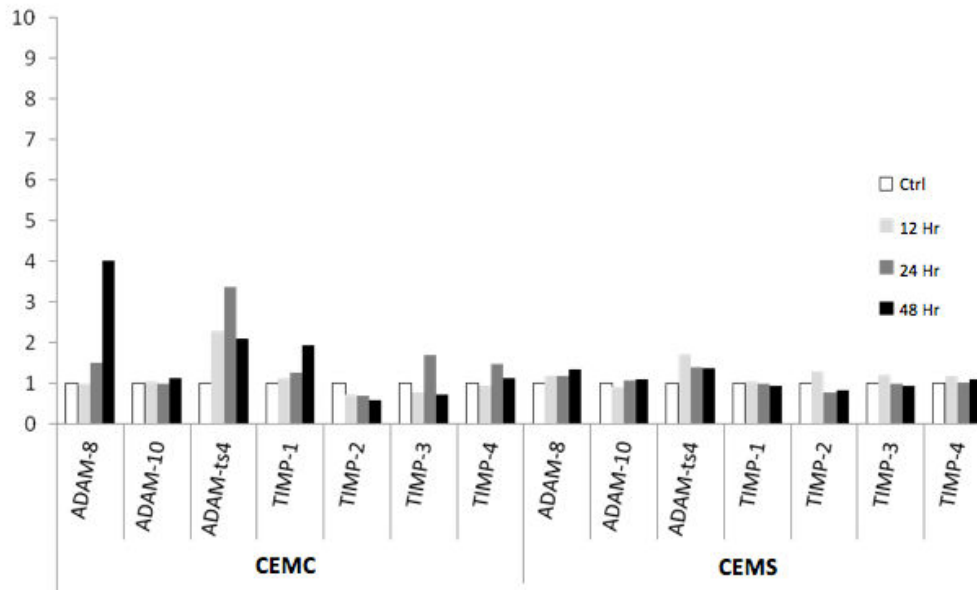
**Dans l'ensemble, les résultats du transcriptome sont confirmés, voire accentués par l'analyse par RT-qPCR, avec une rapide et forte induction des taux d'expression des gènes codant pour MMP3, MMP-9, MMP-10, MMP-12 et MMP-13 ainsi qu'une spécificité d'induction par TWEAK de MMP-3 et MMP-12 au niveau des CEMCs.**

## b) *Les Adamalysines et les TIMPs*

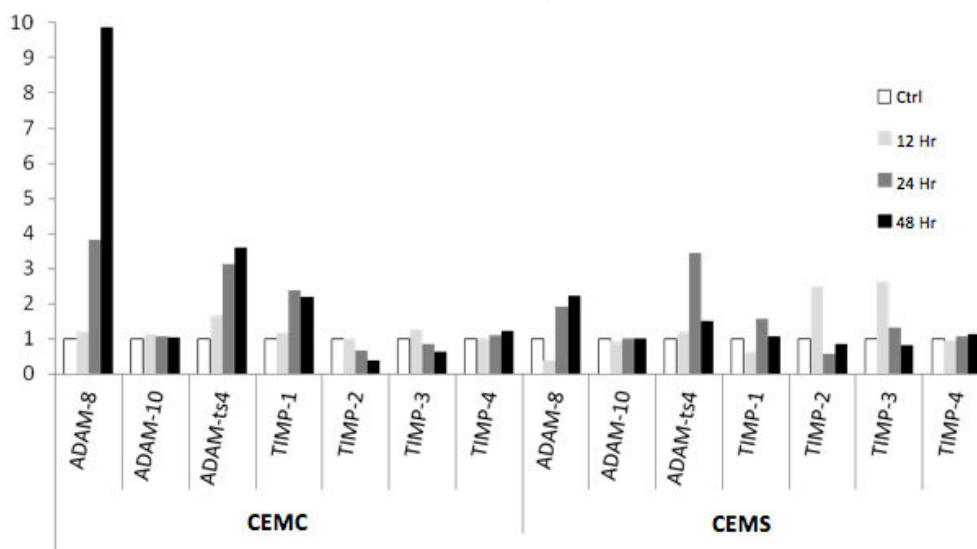
### (1) *Analyse des données du transcriptome*

Nous avons également analysé les données du transcriptome pour d'autres métalloprotéinases impliquées dans le métabolisme de la MEC et potentiellement impliquées dans la perte d'intégrité des barrières, notamment les Adamalysines. Nous avons également suivi l'expression des inhibiteurs endogènes de métalloprotéinases, les TIMPs.

## Transcriptome TNF $\alpha$



## Transcriptome TWEAK

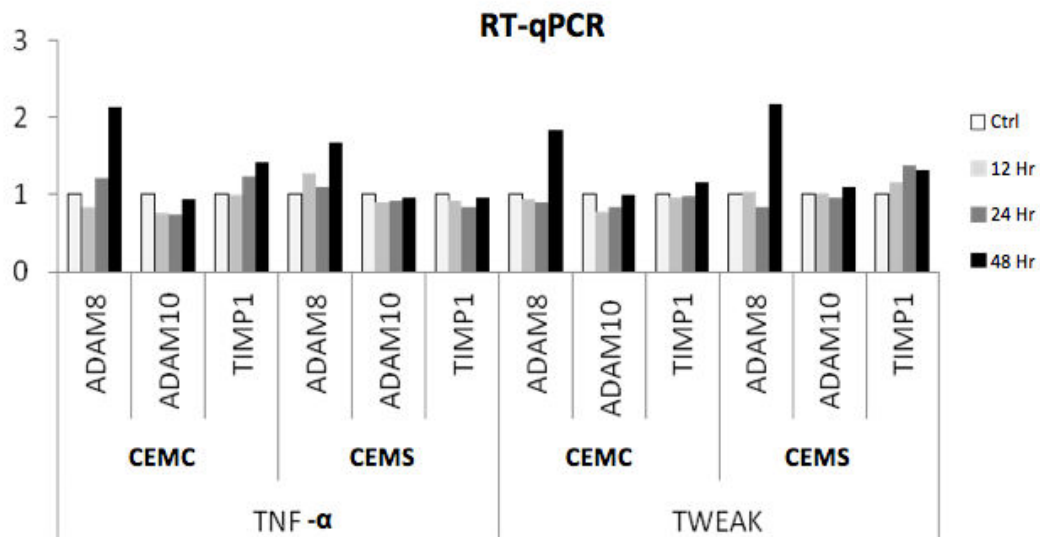


**Figure 12:** Analyse comparative de la modulation d'expression des gènes codant pour différentes Adamalysines et les quatre TIMPs entre les CEMCs et les CEMSs en condition enflammées par TNF- $\alpha$  ou TWEAK pendant 12 hr, 24 hr et 48 hr (méthode du fold change par rapport aux contrôles non traités à chaque temps).

La réponse des CEMCs après inflammation par le TNF- $\alpha$  ou TWEAK est similaire concernant l'induction d'ADAM-8 et ADAM-ts4 (fold change 4 à 10) et l'absence de modulation d'ADAM-10 (Figure 12). Ce profil se rapproche également du profil d'expression des CEMSs après inflammation par TWEAK bien que plus faible (fold change 2 à 3). A contrario, les CEMSs ne répondent pas au TNF- $\alpha$  pour ADAM-8 et ADAM-ts4.

Le TNF- $\alpha$  et TWEAK induisent une réponse similaire pour les CEMCs avec une induction modérée de TIMP-1 (fold change de 2 au temps 48 hr). Le TNF- $\alpha$  ou TWEAK ne modulent pas l'expression de TIMP-1 ou TIMP-4 dans les CEMs, alors qu'une induction (fold change de 2) de TIMP-2 et TIMP-3 est observée pour les CEMs enflammées par TWEAK au temps 12 hr.

(2) Validation par RT-qPCR



**Figure 13:** Analyse comparative par RT-qPCR de la modulation d'expression des gènes codant pour ADAM-8, ADAM-10 et TIMP-1 entre les CEMCs et les CEMs en condition enflammées par TNF- $\alpha$  ou TWEAK pendant 12 hr, 24 hr et 48 hr (méthode de  $\Delta\Delta C_t$  par rapport à l'ARNm référence GAPDH).

Les RT-qPCR confirment les résultats du transcriptome concernant l'induction des taux d'expression des ARNm codant ADAM-8, pour les CEMCs et CEMs enflammées par TNF- $\alpha$  ou TWEAK, uniquement au temps 48 hr (fold change entre 1.5 et 2) et confirment l'absence globale de réponse pour ADAM-10. Les RT-qPCR ne confirment pas l'induction modérée de TIMP-1 pour les CEMCs traitées avec le TNF- $\alpha$  pendant 48 Hr (Figure 13).

**L'ensemble de ces résultats montre la modulation différentielle des gènes codant pour les MMPs et les Adamalysines sélectionnées, entre les CEMCs et les CEMs et en fonction de l'agent pro-inflammatoire et du temps de traitement. Plus particulièrement, l'inflammation des CEMCs par le TNF- $\alpha$  révèle de forte induction dès 12 hr de traitement pour les gènes codant pour plusieurs MMPs et pour l'adamalysine ADAM8, alors que nous n'observons pas de modulation de l'expression des ARNm codant les 4 inhibiteurs endogènes TIMPs des métalloprotéinases. Même si les variations d'expression des ARNm ne se traduisent pas systématiquement en variations**

d'expression ou d'activité au niveau protéique, nos résultats suggèrent que les deux agents pro-inflammatoires TNF- $\alpha$  et TWEAK vont induire au niveau des CEMCs et les CEMSs, certes à des niveaux différents, un déséquilibre dans l'activité protéolytique avec plusieurs métalloprotéinases induites dans leurs expression alors que les taux de TIMPs restent stables.

c) **Analyse de l'expression protéique des MMPs et de l'activité enzymatique de MMP-9.**

*Western blot, gel zymographie et zymographie in situ (perspectives)*

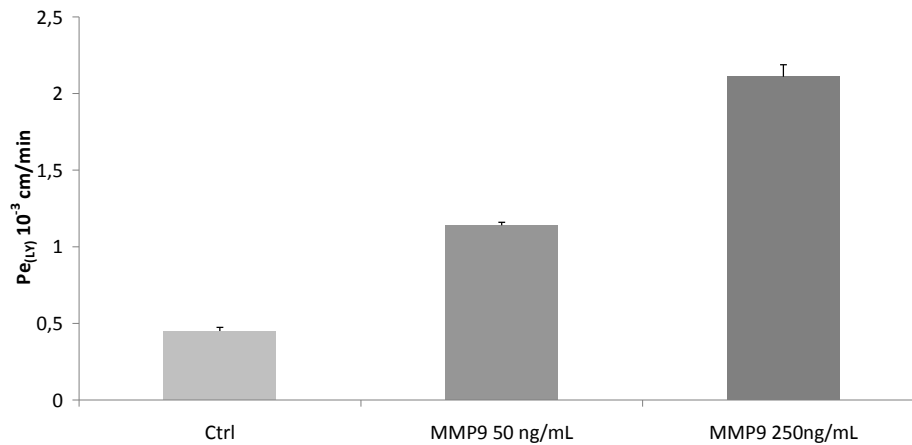
Dans notre étude, nous avons montré de fortes inductions des taux d'expression de l'ARNm codant la pro-MMP-9 entre 12 hr et 48 hr de traitement des CEMCs avec le TNF- $\alpha$ . Parce que les outils moléculaires et différentes approches sont bien validés pour suivre l'expression de cette protéase et son activité, nous l'avons sélectionnée parmi les MMPs pour déterminer si l'induction des ARNm se traduisait au niveau protéique. Comme précédemment pour la validation de l'inflammation induite par le TNF- $\alpha$  5 ng/mL pendant 24 hr et l'évaluation de la perte d'intégrité des monocouches (Figure 7-9), nous poursuivrons dans un premier temps le suivi de MMP-9 dans les CEMCs, sachant que nous avons déjà des indications d'une augmentation de l'expression et de l'activité de MMP-9 dans des cellules endothéliales traitées avec le TNF- $\alpha$  et TWEAK (Stephan *et al.*, 2013). Afin de mettre en évidence la traduction de ces ARNm en protéine et leur activité enzymatique sur les monocouches de CEMCs enflammées par le TNF- $\alpha$ , nous utiliserons: (i) la zymographie en gel et la zymographie *in situ* et (ii) le western blot et l'immunocytochimie avec des anticorps dirigés contre les différentes MMPs.

**Dans l'attente des résultats nous avons poursuivi notre étude sur les monocouches de CEMCs du modèle de BHE *in vitro* (Molino *et al.*, 2014) afin d'évaluer l'effet des MMPs sur l'intégrité des barrières enflammées.**

**C. Traitement des CEMCs avec MMP-9, TNF- $\alpha$  et inhibiteurs de protéases**

**1. Traitement des monocouches de CEMCs avec MMP-9**

Nous avons incubé la MMP-9 recombinante sur les monocouches de CEMCs afin d'évaluer ses effets sur l'intégrité des barrières par mesure du  $Pe_{(LY)}$  (Figure 14). Le graphe montre une ouverture paracellulaire des monocouches de CEMCs après 24 hr d'incubation de MMP-9 à 50 ng/mL ( $Pe_{(LY)}=1.14.10^{-3}$  cm/min) et 250 ng/mL ( $Pe_{(LY)}=2.11.10^{-3}$  cm/min) par rapport au contrôle dont le seuil d'intégrité a été arbitrairement établi à un  $Pe_{(LY)}<0.6.10^{-3}$  cm/min.

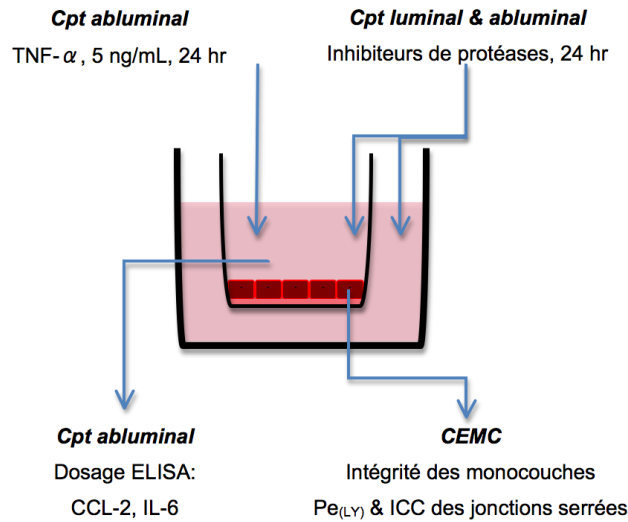


**Figure 14:** Evaluation de l'intégrité des monocouches de CEMCs par mesure du  $P_{e(LV)}$  après incubation de MMP-9 pendant 24 hr dans le compartiment luminal du modèle de BHE *in vitro*. Les barres représentent les moyennes  $\pm$  déviations standards de 3 expériences, chacune comprenant 3 inserts différents.

## 2. Traitement des monocouches de CEMCs avec TNF- $\alpha$ et inhibiteurs de protéases

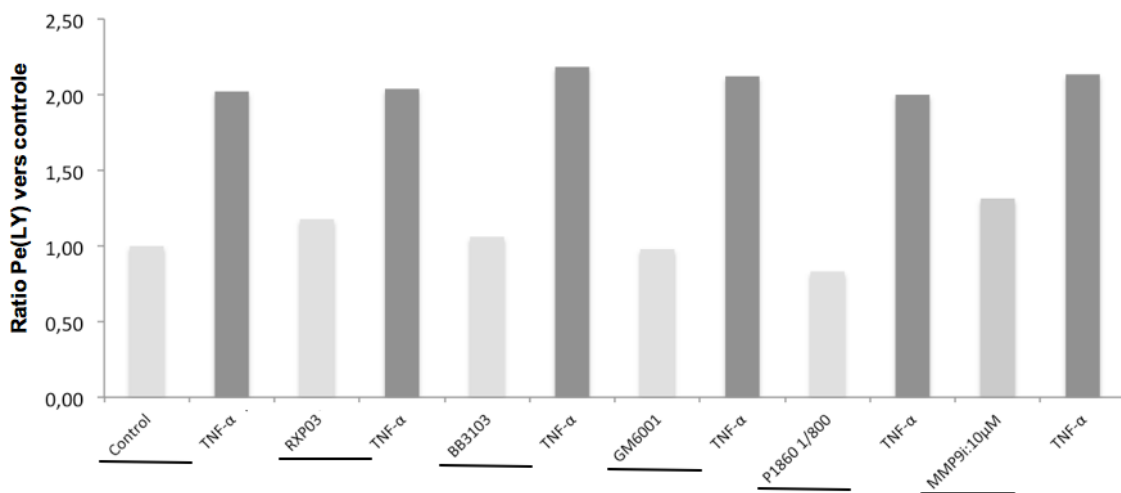
Afin de poursuivre l'étude de l'impact des MMPs sur la perte d'intégrité des barrières lors du processus inflammatoire induit par le TNF- $\alpha$ , nous avons évalué un potentiel effet protecteur de différents inhibiteurs de protéases. Ils ont été ajoutés au milieu de culture dans le compartiment luminal et abluminal pendant 24 hr, seuls ou en co-incubation avec le TNF- $\alpha$  5 ng/mL (Figure 15). Un cocktail d'inhibiteurs de protéases à large spectre utilisable sur cellules vivantes (Sigma Aldrich) a été incubé aux dilutions 1/400, 1/800 et 1/1600. Le RXPO3 est un inhibiteur spécifique des MMPs alors que les inhibiteurs GM6001 et BB3103 sont des inhibiteurs de métalloprotéinases, à spectres plus larges puisqu'ils inhibent les ADAMs en plus des MMPs. Le RXPO3 a été incubé à 5  $\mu$ M, 15  $\mu$ M et 30  $\mu$ M ; le GM6001 a été incubé à 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M et 10 $\mu$ M et le BB3103 a été incubé à 10 $\mu$ M, 30 $\mu$ M et 60  $\mu$ M. L'inhibiteur MMP-9i commercialisé comme « spécifique de MMP-9 » a été incubé à 10  $\mu$ M.





**Figure 15:** Schéma décrivant le protocole expérimental de co-incubation du TNF- $\alpha$  avec les différents inhibiteurs de protéases dans le modèle *in vitro* de BHE incluant (i) la caractérisation de l'induction de l'inflammation par dosage ELISA de CCL-2 et IL-6, (ii) l'observation de l'intégrité des monocouches de CEMCs par quantification du Pe<sub>(LY)</sub> et (iii) l'observation de la structure des protéines des jonctions serrées par immunocytochimie.

a) **Quantification de l'intégrité des barrières: mesure du Pe(LY)**

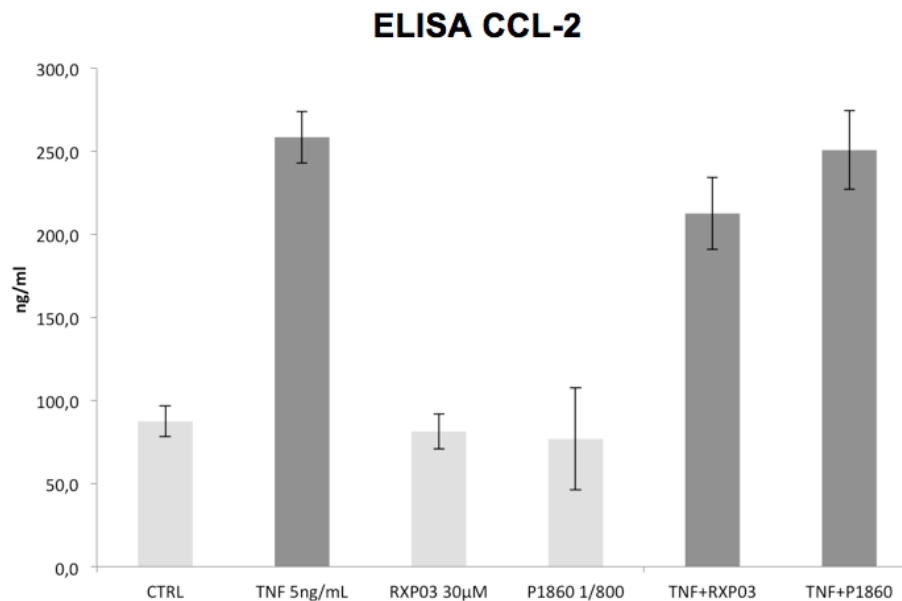


**Figure 16:** Evaluation de l'intégrité des monocouches de CEMCs par mesure du ratio Pe<sub>(LY)</sub> traité sur contrôle (Pe < 0.6.10<sup>-3</sup> cm/min), après incubation du TNF- $\alpha$  5 ng/mL pendant 24 hr dans le compartiment luminal du modèle de BHE *in vitro* seul ou en co-incubation avec des inhibiteurs de protéases. Les inhibiteurs ont été incubés seuls afin de contrôler leur éventuelle toxicité. Ce graphique est représentatif de l'ensemble des différentes concentrations d'inhibiteurs testés.

Le graphe montre une augmentation du passage du LY au travers de la monocouche de CEMCs après 24 hr d'incubation avec le TNF- $\alpha$ . Les inhibiteurs évalués dans notre étude n'ont pas révélé de toxicité cellulaire si l'on ne considère que le critère d'intégrité de la barrière, à l'exception de MMP-9i pour lequel on observe une perte d'intégrité d'un facteur 1.4 par rapport au contrôle. **Les inhibiteurs évalués, et ce quelle que soit leur concentration, n'ont pas eu d'effet sur l'ouverture de la barrière induit par le TNF- $\alpha$**  (Figure 16).

b) **Dosage ELISA CCL-2**

Suite à cette observation, nous avons évalué si certains des inhibiteurs testés dans les expériences décrites ci-dessus modulaient la réponse inflammatoire induite par le TNF- $\alpha$ , en quantifiant la sécrétion de CCL-2 dans les surnageants de cultures par dosage ELISA (Figure 17).



**Figure 17:** Quantification par ELISA de la sécrétion de CCL-2 dans les surnageants de culture des CEMCs incubées pendant 24 hr avec du TNF- $\alpha$  5 ng/mL seul ou en co-incubation avec le RXP03 30  $\mu$ M et le cocktail d'inhibiteur P1860 dilué au 1/800.

Nos résultats montrent que les inhibiteurs des métalloprotéinases, incubés en présence de l'agent pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  ne semblent pas avoir d'effet sur les CEMCs, tant sur la perte d'intégrité des modèles BHE *in vitro* évaluée par mesure des Pe, que sur la réponse inflammatoire de ces cellules évaluée par mesure par ELISA du marqueur d'inflammation CCL2.

Différentes hypothèses non exclusives peuvent être avancées pour tenter d'expliquer ces résultats. L'augmentation d'expression et/ou d'activité des métalloprotéinases et en particulier les MMPs pourraient n'avoir aucune incidence sur la perte d'intégrité des modèles BHE *in vitro* malgré toutes les données de la littérature suggérant un rôle de ces protéases dans l'ouverture de la BHE ; d'autres protéases seraient alors impliquées. Il est possible aussi que les inhibiteurs de métalloprotéinases soient sans effet sur ces protéases, notamment lorsqu'elles sont actives en périphérie ou au sein des membranes plasmiques. A titre d'exemple, TIMP-1, l'un des meilleurs inhibiteurs de MMP-9 ne peut inhiber son activité dans un environnement membranaire (Owen *et al.*, 2003 ; Lambert *et al.*, 2009). Il a également été montré que le RXPO3 agit en extracellulaire, mais ne franchirait pas les membranes plasmiques et n'aurait donc aucun effet sur des MMPs actives au niveau de la membrane plasmique, par exemple dans le clivage de protéines des JS.

#### **D. Les récepteurs impliqués dans le mécanisme de RMT**

Finalement, dans le cadre de notre intérêt sur l'expression dans les barrières, en particulier dans les barrières enflammées, de récepteurs cibles pour les approches de RMT, nous avons suivi deux paramètres d'expression à la BHE des ARNm codant pour ces récepteurs (i) une expression préférentielle ou non au niveau des CEMCs et CEMs et (ii) la modulation de leur expression par TNF- $\alpha$  ou TWEAK dans l'un ou l'autre des modèles cellulaires. Nous n'avons observé aucune variation entre chacune des conditions évaluées dans notre étude pour les récepteurs suivants : EPCR, IGFR1, IR, LDLR, LRP1, LRP8, RAGE et TfR. Ce résultat indique que l'expression de ces récepteurs est stable entre les deux endothéliums et qu'elle n'est pas modulée, au moins à court terme par la réponse inflammatoire des cellules. **Ainsi, l'activation des transport transcellulaire du LDL (Descamps *et al.*, 1997), de la transferrine (Miller *et al.*, 2005) et de la lactoferrine (Fillebeen *et al.*, 1999), induite par le TNF- $\alpha$ , pourraient être due à une augmentation du mécanisme de transport plutôt qu'à une surexpression des récepteurs.**

## **C. DISCUSSION GLOBALE & PERSPECTIVES**

Notre premier objectif a été de mettre en place des modèles *in vitro* de BHE et BSME en tant qu'outils mimant les caractéristiques *in vivo* de ces barrières, selon un protocole bien maîtrisé, reproductible, avec un contrôle qualité permettant de développer des projets avec des partenaires académiques et industriels.

Un second objectif a été d'utiliser ces outils pour évaluer d'une part les propriétés de nanoparticules générées par un partenaire académique, chargées avec la protéine TIMP-1 à potentiel neuroprotecteur, d'autre part, les taux d'expression, propriétés et trafic intracellulaire de différents récepteurs potentiellement impliqués dans des processus de transcytose, notamment le LDLR, en parallèle avec l'étude du passage de molécules vecteurs ou de conjugués. Le laboratoire NICN et la société VECT-HORUS poursuivent un partenariat établi depuis plusieurs années et étudient des récepteurs impliqués dans le mécanisme de transcytose à la BHE dont les plus connus sont, LDLR, LRP1, TfR et IR. Nos travaux les plus avancés portent sur le LDLR, pour lequel nous disposons de plusieurs familles de vecteurs peptidiques protégés par brevets, mais d'autres vecteurs ciblant d'autres récepteurs sont également en cours de développement.

Finalement, notre troisième objectif a été de mettre en place et de caractériser des modèles *in vitro* de BHE et BSME en situation inflammatoire, sachant que l'inflammation des cellules endothéliales est associée à des degrés divers à différentes pathologies du SNC. A terme, le développement de modèles de barrières enflammées doit permettre le développement de stratégies de vectorisation ciblant préférentiellement les barrières en situation pathologique.

## I. Les modèles *in vitro* de BHE et BSME

Parmi l'enchaînement des phases, permettant la mise en place de modèles *in-vitro* de BHE et BSME de rat et souris, on notera (i) l'élimination des péricytes et la pureté en cellules endothéliales, (ii) un contrôle stricte de l'environnement des primocultures de cellules endothéliales qui se différencient rapidement lorsqu'elles sont isolées de leur environnement pour induire leur prolifération et (iii) la ré-différenciation de ces cellules afin qu'elles acquièrent un certain nombre de propriétés caractéristiques des barrières endothéliales du SNC, notamment grâce à la co-culture avec des astrocytes et l'addition d'hydrocortisone.

Ces différentes phases, une fois maîtrisées, ont permis d'obtenir de manière reproductible des cultures primaires et ont ouvert la voie au développement de différents projets tels que ceux présentés mais ouvrent également des possibilités d'étude des échanges entre partenaires cellulaires de la BHE, par exemple avec la co-culture de péricytes et/ou de neurones afin de reconstituer des modèles d'unité neuro-glio vasculaire (UNGV). Cependant, ces modèles de tri- ou quadri-cultures sont plus complexes à mettre en œuvre en routine et ne sont pas forcément nécessaires dans nos

approches de screening des vecteurs et des conjugués développés en interne ou par des partenaires industriels.

Dans la majorité des études utilisant des modèles *in vitro* de BHE statique en insert à deux compartiments, il a été établi des corrélations entre le passage à travers les monocouches de cellules endothéliales *in vitro* et la BHE *in vivo*, essentiellement à l'aide de molécules organiques, substrats des pompes d'efflux. Cependant, nos travaux au cours de ces dernières années suggèrent que les principes qui régissent le passage de différentes molécules organiques ne correspondent pas à ceux du passage par RMT. L'imperméabilité des monocouches de cellules endothéliales du SNC est relative et en partie fonction du poids moléculaire des macromolécules (peptides vecteurs, conjugués peptidiques ou conjugués vecteurs-Fc) ou complexes macromoléculaires (nanoparticules, liposomes étudiées). Dans tous les cas, la quantité de signal quantifiée dans le compartiment abluminal après incubation des molécules dans le compartiment luminal est une résultante de la fuite paracellulaire et du passage spécifique transendothélial, voire d'un recyclage partiel vers l'espace luminal des récepteurs et des vecteurs ou conjugués qui leur sont liés. Une compétition s'installe alors entre ces flux, nécessitant un design adéquat des protocoles d'incubation en fonction du temps, de la dose, de la restrictivité des barrières, de la vitesse du mécanisme de transcytose putatif, et requiert quand c'est possible l'utilisation de contrôles basés sur des cellules endothéliales préparées à partir d'animaux invalidés pour le récepteur cible.

## II. Les nanovecteurs : liposomes et nanoparticules

Les nanovecteurs de types liposomes ou nanoparticules (NPs), de composition et de structure variées (revue par Vlieghe et Khrestchatisky, 2013), ont été largement décrits pour le transport de molécules à travers la BHE. Ils représentent une alternative à la stratégie de conjugaison d'une molécule thérapeutique à un vecteur peptidique ou protéique par l'intermédiaire d'un bras espaceur ou « linker ». En effet, certaines molécules resteront difficiles à vectoriser par ces approches, si le conjugué présente des propriétés différentes de celles de l'agent thérapeutique, s'il s'avère toxique ou si le principe actif ou le vecteur perdent leurs propriétés du fait de la conjugaison chimique. C'est notamment le cas pour les petites entités chimiques tels que les anti-cancéreux. Il est connu par exemple que le doxorubicine ne peut rentrer dans le noyau des cellules si elle est conjuguée à un peptide vecteur, voire même à un seul acide aminé (Meyer-Losic *et al.*, 2006). Des stratégies « pro-drogue » sont alors à mettre en place, notamment avec des linkers clivables ou « auto-immolables » (Abu Ajaj *et al.*, 2012 ; Zhong *et al.*, 2013) qui libèreront le principe actif dans sa version fonctionnelle. Pour ces molécules problématiques, la délivrance par NP ou liposome,

éventuellement fonctionnalisés ou vectorisés pour cibler un tissu particulier via le RMT représente une alternative intéressante.

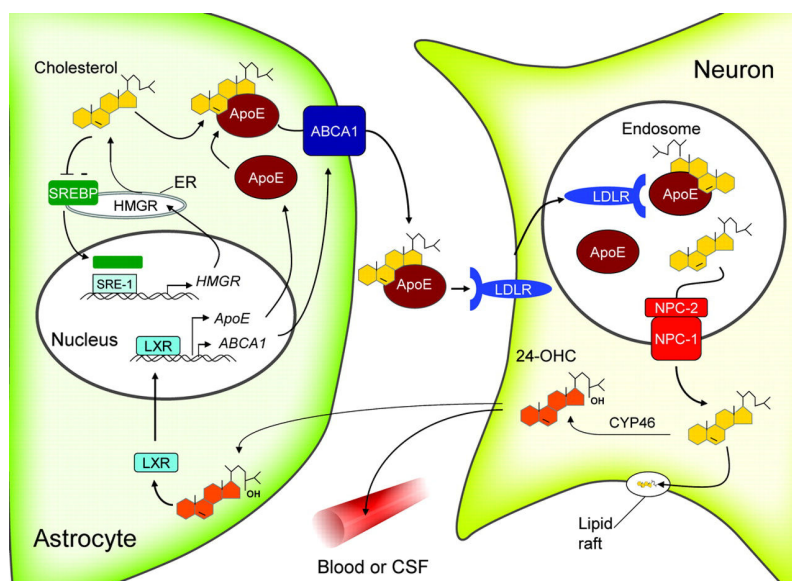
Dans le deuxième article de ce manuscrit, nous avons exploré l'interaction de nanoparticules de type PLGA avec les CEMCs du modèle *in vitro* de BHE. L'ensemble des données indiquent que ces NPs, lorsqu'elles sont traitées avec le surfactant Ps80, ne sont pas toxiques pour les CEMCs et peuvent franchir la BHE *in vitro* et *in vivo*. Parmi les hypothèses émises concernant la façon dont ces NPs traversent la monocouche de CEMCs, l'adsorption d'apolipoprotéines en surface des NPs, leur permettant d'interagir avec les récepteurs de la famille du LDLR exprimés en surface des cellules endothéliales de la BHE a été suggéré (Kreuter *et al.*, 2002, 2007 ; Kreuter, 2004 ; Michaelis *et al.*, 2006 ; Shamanenkov *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 2007 ; Kuwahara *et al.*, 2011 ; Zensi *et al.*, 2009 ; Wagner *et al.*, 2012). A ce stade, nous n'avons pas fonctionnalisé les NPs utilisés dans l'étude collaborative avec les vecteurs peptidiques ligands du LDLR à disposition dans le but d'évaluer leur captation par les CEMCs. Cependant, l'un de nos peptides vecteurs (peptide 22, Malcor *et al.*, 2012) a été conjugué par d'autres à des NPs contenant soit un fluorophore, soit du paclitaxel. Il a été montré que la fonctionnalisation des NPs par le peptide 22 favorisait l'adressage des NPs à des glioblastomes implantés chez la souris et prolongeaient significativement la survie des souris comparé aux NPs non fonctionnalisées ou le paclitaxel seul (Zhang *et al.*, 2013). Nous avons en projet de poursuivre la fonctionnalisation des NPs et nous explorons différentes stratégies de couplage de nos vecteurs peptidiques en surface de différents types de NPs. L'enjeu majeur de ce couplage consiste à préserver l'affinité des vecteurs peptidiques pour leur cible lorsqu'ils sont présentés en surface des NPs (voie de couplage, linker, nombre de peptides par NPs, etc...). Nous avons également une collaboration en cours avec un laboratoire spécialisé dans l'exploitation de liposomes et l'encapsulation de molécules à visée cérébrale. Avec le même objectif que pour les NPs, nous poursuivons l'évaluation de différentes stratégies de fonctionnalisation de ces liposomes avec les vecteurs peptidiques disponibles, en comparaison avec des vecteurs de type CPP, et évaluons le bénéfice de la fonctionnalisation des liposomes pour le transport de leur contenu à travers les modèles *in vitro* de BHE.

### III. Le rôle du LDLR exprimé à la BHE et transport par RMT

Le trafic intracellulaire des récepteurs impliqués dans un mécanisme de RMT à la BHE et les mécanismes permettant à différents ligands de s'engager dans une voie de transcytose sont très peu documentés. Dans le cadre d'une analyse comparée entre le trafic intracellulaire dans les cellules endothéliales des modèles *in vitro* de BHE et de cellules épithéliales (Thèse de doctorat de Karine Varini, 09/2015, et article soumis), nous avons confirmé des différences majeures qui sont liées

notamment au contrôle par la BHE de l'accès du cholestérol de la circulation plasmatique vers le parenchyme nerveux.

Bien que le SNC ne représente que 2,1 % de la masse corporelle totale, il contient 23% des stérols du corps entier qui se retrouvent pour 70 % de ce pool dans la myéline sous forme de cholestérol estérifié. Les astrocytes et les oligodendrocytes synthétisent 95 % des besoins en cholestérol cérébral, notamment sous la forme de HDL-ApoE et HDL-ApoAI (Borghini *et al.*, 1995; Demeester *et al.*, 2000 ; Karasinska *et al.*, 2009). Il y a peu d'évidence que les parties cholestérol et ApoB des LDL soient majoritairement transportés à travers la BHE chez l'adulte en condition physiologique (revue par Dietschy et Turley, 2004), en accord avec l'absence de détection d'ApoB dans le liquide céphalo-rachidien (Danik *et al.*, 1999). Il a été démontré que le métabolisme du cholestérol cérébral fonctionne essentiellement en circuit fermé (Björkhem *et al.*, 1998; Lund *et al.*, 2003; Björkhem et Meaney, 2004; Gosselet *et al.*, 2014). « L'excès » de production du cholestérol est hydrolysé par les neurones grâce à CYP46, un membre de la famille des cytochrome P450, sous la forme de 24-S-hydroxycholestérol, établissant ainsi une boucle interne de régulation qui contrôle la quantité de HDL disponible dans les fluides interstitiels. Le 24-S-hydroxycholestérol ne bloque pas la synthèse du cholestérol astrocytaire au niveau du facteur de transcription « sterol regulatory element-binding protein » (SREBP), il se lie au liver X receptor (LXR), responsable de la synthèse d'ApoE et d'ABCA1, une pompe d'efflux responsable de l'association puis de l'excrétion (lipidation) des particules de HDL formées par ApoE ou ApoAI et le cholestérol cytoplasmique néo-synthétisé (Figure 23).



**Figure 23** : Boucle de régulation de la synthèse du cholestérol cérébral (Benarroch, 2008).



La PCR quantitative et de les approches de la protéomique ont montré qu'ApoAI est synthétisée par les cellules endothéliales de la BHE (Möckel *et al.*, 1994) puis libérée du coté abluminal où elle s'enchâsse dans les radeaux lipidiques astrocytaires, afin d'être libérée dans les fluides interstitiels sous la forme de particules de HDL-ApoAI grâce à ABCA1 (Panzenboeck *et al.*, 2002). La quantité d'ApoAI détectée dans le LCR représente 0,5% de sa concentration plasmatique et la présence des deux types de particules HDL-ApoE et HDL-ApoAI au niveau cérébral suggère un rôle spécifique pour chacune d'elles. En effet, ApoAI a été suggéré comme un lien entre le SNC et la périphérie pour le métabolisme des lipides. Les particules de HDL-ApoAI sont captées par le Scavenger Receptor-class B member I (SR-BI) coté abluminal des cellules endothéliales de la BHE et libérées dans la circulation plasmatique ; il s'agit donc d'un « efflux cérébral » permettant au HDL d'être ensuite capté par les récepteurs hépatiques et intestinaux, assurant ainsi le turnover du cholestérol corporel.

Ces données suggèrent une faible implication du LDLR comme capteur et transporteur du cholestérol plasmatique à travers la BHE, et posent donc la question de son rôle au niveau de la BHE, notamment au niveau apical, où nous l'avons localisé préférentiellement. Au delà de ces questions sur le rôle physiologique du LDLR dans la BHE, on peut s'interroger sur l'intérêt de son ciblage dans le cadre d'approches de vectorisation d'agents thérapeutiques via RMT. A l'évidence, des précautions doivent être prises lorsque l'on compare l'équilibre entre l'influx et l'efflux d'ApoB et du cholestérol à travers la BHE quantifiés dans les études *in vivo* (Danik *et al.*, 1999 ; Dietschy et Turley, 2004) et les taux d'accumulation cellulaire et de transport du LDL à travers les monocouches de CEMCs observés dans un modèle de BHE *in vitro* bovin (Dehouck *et al.*, 1994; Dehouck *et al.*, 1997; Candela *et al.*, 2008) et dans notre étude. Grâce à l'approche de pulse-chase, nous avons comparé le trafic intracellulaire du LDLR et du LDL à celui de la Transferrin (Tf) car le TfR exprimé à la BHE a été largement décrit pour son implication dans la transcytose de ce ligand (Fishman *et al.*, 1987; Roberts *et al.*, 1993; Kissel *et al.*, 1998; Jones et Shusta, 2007). Cependant, le complexe TfR/Tf a été également décrit pour recycler vers la surface cellulaire, sans libération de la Tf à pH endosomal mais en libérant le fer qui est acheminé vers le tissu nerveux par d'autres transporteurs (Descamps *et al.*, 1996; Raub et Newton, 1991; Skarlatos *et al.*, 1995).

De telles études suggèrent que le mécanisme de RMT du TfR exprimé à la BHE pourrait impliquer ces deux mécanismes, transcytose et recyclage de la Tf, dont la régulation reste indéterminée. Nous avons montré que le LDL et la Tf co-localisent en surface cellulaire des CEMCs et sont engagés dans une voie intracellulaire similaire. De plus, nous avons montré que le LDLR suit cette même voie Tf-positive. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une partie du LDL présent dans

les endosomes pourrait être orienté vers la voie de transcytose tel que nous l'avons montré avec les approches de transport du LDL avec les CEMCs *Idlr* *-/-* et une autre partie pourrait être sécrétée vers le pôle apical des CEMCs. Ainsi, les CEMCs pourraient être impliquées dans un tri sélectif des composantes des particules lipoprotéiques circulantes, riches en vitamines et en acides gras (AG) essentiels, impliquant des lipoprotéines lipases (LPL) endothéliales, avant sécrétion de la particule évidée. Ce mécanisme a été observé avec des particules de HDL associées à l' $\alpha$ -tocopherol (un précurseur de la vitamine E nécessaire au bon fonctionnement cérébral) dans un modèle de BHE *in vitro* porcin impliquant des LPL endothéliales et le récepteur SR-BI, présenté cette fois-ci au pôle apical des cellules endothéliales (Goti *et al.*, 2000, 2001, 2002; Balazs *et al.*, 2004).

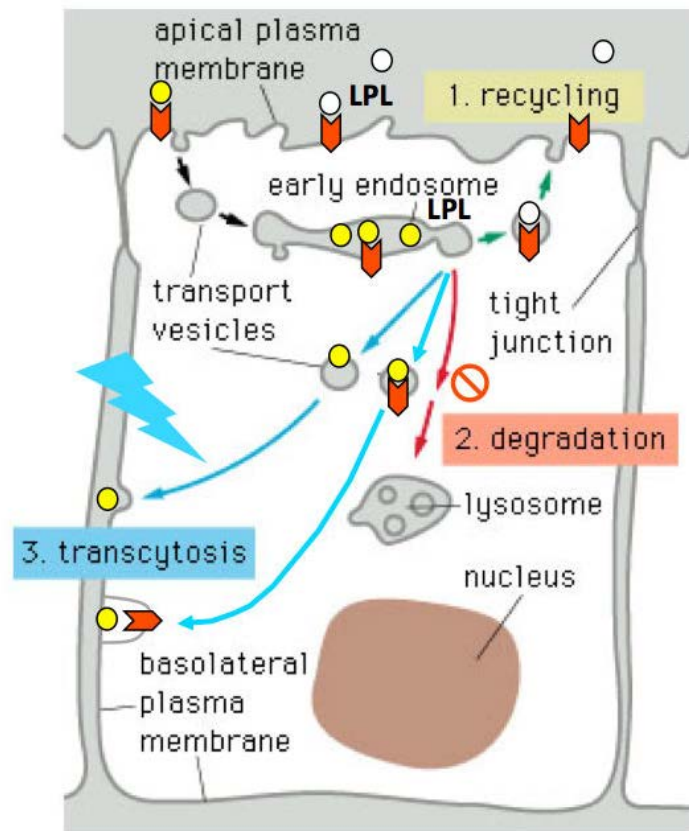
Par rapport aux autres organes, le cerveau est riche en cholestérol et en AG polyinsaturés tels que les AG essentiels, acide docosahexaénoïque (DHA) et acide arachidonique. Si le cholestérol est synthétisé *de novo* en quasi autonomie par les astrocytes et les oligodendrocytes, ce n'est pas le cas des précurseurs de ces AG essentiels tels que l'acide linoléique (omega3) et l'acide alpha-linolénique (omega6) qui ont pour seule origine l'alimentation. L'administration d'un supplément alimentaire en DHA est associée à une augmentation de sa concentration cérébrale. Ce mécanisme de transport des AG de type omega 3 alimentaire à travers la BHE a également été démontré chez l'homme (Freund *et al.*, 2014). L'apport d'AG au niveau cérébral peut se faire sous différentes formes (Cf. Bibliographie, chapitre III, II. La diffusion facilitée, C. Le transport des acides gras), cependant les lysophosphatidylcholines (lysoPC) seraient une base importante d'apport lipidique au cerveau (Illingworth et Portman, 1972; Brossard *et al.*, 1996; Croset *et al.*, 1996). Dans le sang, les lysoPC sont dissociées des particules lipoprotéiques circulantes par la lecithin cholestérol acyltransferase (LCAT), permettant ensuite leur transfert à travers la BHE par des transporteurs de type CMT. La partie choline des LysoPC est essentielle et facilite le passage cérébral. Cependant, l'expression de LPL par les cellules endothéliales de la BHE (Goti *et al.*, 2002; Sovic *et al.*, 2005; Chen et Subbaiah, 2007) suggère également une réaction enzymatique locale, soit membranaire au niveau du glycocalix (Rapoport *et al.*, 2001; Ishida *et al.*, 2003; Ouellet *et al.*, 2009), soit après endocytose de la particule lipoprotéique. Dans ce cas, les LPL endothéliales pourraient agir en synergie avec les récepteurs de la famille du LDLR, captant et endocytant les particules lipoprotéiques circulantes, en les élaguant de leur constituants essentiels sans avoir à pénétrer le parenchyme nerveux dans leur totalité, avec une sécrétion des composantes cholestérol et apolipoprotéine.

De façon intéressante, nous avons également montré avec l'approche de pulse-chase que le LDL évite le compartiment lysosomal dans les CEMCs. Sur ce point, le trafic intracellulaire du LDL à la BHE diffère du mécanisme généralement observé dans les cellules épithéliales. En effet, le LDLR

exprimé par les cellules épithéliales recycle de façon "constitutive" vers la surface cellulaire après libération du LDL à pH endosomal, orientation vers le lysosome, et relargage du cholestérol dans le cytoplasme où il sera mobilisé pour participer aux processus physiologiques (Brown et Goldstein, 1986; Broadwell, 1989; Davis *et al.*, 1987; Dunn *et al.*, 1989; Esser et Russell, 1988; Hussain *et al.*, 1999; Gotthardt *et al.*, 2000; Rudenko *et al.*, 2002). La co-localisation du LDLR et du LDL en surface cellulaire avec la cavéoline dans les CEMCs (Candela *et al.*, 2008; revue par Zlokovic, 2008) par rapport à la clathrine dans les cellules épithéliales (Rudenko *et al.*, 2002) suggère également un trafic intracellulaire différent pour différentes fonctions tissulaires. L'impact du cholestérol dans différentes activités métaboliques telles que l'induction de la synaptogenèse (Mauch *et al.*, 2001) suggère une fonction spécifique du LDLR exprimé à la BHE permettant (i) d'éviter le compartiment lysosomal et la libération du cholestérol dans le cytoplasme des CEMCs et (ii) d'éviter l'impact des fluctuations plasmatiques du cholestérol sur les fonctions cérébrales. Chaque contact synaptique est protégé de la fuite des neurotransmetteurs grâce à un bourgeon d'astrocytes englobant la synapse. Les astrocytes qui synthétisent le cholestérol ont certainement un rôle à jouer dans cette protection fonctionnelle en régulant le passage du cholestérol à la BHE. L'expression du LDLR en surface des CEMCs ne serait pas modulée par le flux plasmatique de cholestérol tel que décrit au niveau du foie, mais plutôt par les besoins en cholestérol des astrocytes qui réguleraient l'expression et la transcytose du LDL (Dehouck *et al.*, 1994; Abbott *et al.*, 2006). Le LDLR exprimé à la BHE et ApoB ont été également impliqués dans des désordres neurologiques affectant le métabolisme du cholestérol cérébral. Il a été montré que la réduction de synthèse ou de libération du cholestérol par les astrocytes dues à des mutations génétiques dans les pathologies de Huntington (Valenza *et al.*, 2010) et de Tangier (Karasinska *et al.*, 2009), respectivement au niveau de SREBP et de LXR, peut être compensée par une alimentation riche en cholestérol, entraînant une augmentation de son transfert à travers la BHE (Sun *et al.*, 2007; Camargo *et al.*, 2012).

En regroupant l'ensemble de ces données, nous émettons l'hypothèse que le LDLR exprimé à la BHE pourrait être associé à deux mécanismes, soit un recyclage "constitutif" du LDLR et du LDL avec un tri sélectif par les CEMCs de ces composants essentiels avant sécrétion de la particule évidée, soit une transcytose "régulée" en fonction des besoins cellulaires locaux du parenchyme nerveux. La transcytose pourrait également être associée à différents mécanismes, soit le transfert total du complexe LDLR/LDL vers le compartiment basolatéral et libération du LDL dans le parenchyme nerveux, soit une dissociation du complexe à pH endosomal avec recyclage du LDLR et orientation du LDL seul vers la voie de transcytose (Figure 24). Le modèle *in vitro* de BHE et la forte densité d'astrocytes dans le compartiment abluminal pourraient favoriser le mécanisme de transcytose

"régulée" en fonction des besoins cellulaires locaux et pose la question de son existence *in vivo*, dans l'ensemble de l'arbre vasculaire cérébral.



**Figure 24 :** Représentation schématique du trafic intracellulaire des entités du complexe LDLR/LDL selon l'hypothèse de recyclage constitutif et de transcytose régulée. Après endocytose et transfert du complexe LDLR/LDL vers le compartiment « early endosomes », plusieurs voies d'adressage ont été décrites : (1) voie de recyclage (marqueur Rab11) : des lipoprotéines lipases (LPL) pourraient interagir avec les LDL (jaune) afin de trier ses constituants essentiels avant sécrétion de la particule évidée (blanche) avec le LDLR vers la membranaire apicale ; un mécanisme similaire pourrait prendre place directement au niveau apical, à la surface cellulaire, en fonction de la localisation des LPL, (2) voie lysosomale (marqueur Rab7, late endosome et marqueur LAMP-1, lysosome) : le LDL pourrait être adressé vers le compartiment lysosomal pour dégradation et (3) voie de transcytose : le LDL et/ou le complexe LDLR/LDL pourraient être adressés vers la membrane basolatérale pour exocytose de tout ou partie du contenu (Adapté de Broadwell, 1989 ; adapté de Georgieva et al., 2014).

Au delà de ces hypothèses, l'intérêt principal de ciblage des récepteurs impliqués dans un mécanisme de RMT à la BHE est leur capacité à faire pénétrer et accumuler leurs ligands dans le compartiment vésiculaire endothélial dont tout ou partie du ligand plasmatique et tout ou partie de la charge endosomale peut ensuite atteindre le parenchyme nerveux. Cette stratégie s'est révélée

efficace dans de nombreuses études utilisant des apolipoprotéines ou des séquences peptidiques réduites au domaine de liaison à leurs récepteurs, soit liées par fusion à une protéine thérapeutique (Spencer et Verma, 2007; Sorrentino *et al.*, 2013; Spencer *et al.*, 2011, 2014 ; Sarkar *et al.*, 2011; Re *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2014; Böckenhoff *et al.*, 2014), soit fonctionnalisant des nanoparticules chargées avec des principes actifs (Kreuter *et al.*, 2002, 2004, 2007; Michaelis *et al.*, 2006; Shamenkov *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007; Zensi *et al.*, 2009 ; Kuwahara *et al.*, 2011 ; Wagner *et al.*, 2012).

Cependant, la majorité de ces études ne prennent pas en compte la notion de dissociation du ligand de son récepteur après endocytose, paramètre important qui s'il était contrôlé, permettrait sans doute d'augmenter le relargage de ce ligand « cargo » dans le tissu nerveux. Ces concepts ont été abordés très récemment dans le cadre de stratégies de vectorisation ciblant le TfR avec des anticorps dirigés contre le domaine extracellulaire (luminal). Alors qu'une trop faible affinité du vecteur-anticorps peut être délétère pour le ciblage spécifique du récepteur, une trop haute affinité peut limiter la libération du récepteur dans les cellules endothéliales ou dans le parenchyme nerveux. Or, certains vecteurs basés sur des anticorps monoclonaux dirigés contre le TfR, notamment le plus connu OX26, tout en ciblant bien le TfR de la BHE, présentait un transport médiocre des cargos associés à ce vecteur. Ces problèmes ont été résolus récemment par diminution de l'affinité des anticorps ciblant le TfR par le développement d'anticorps monovalents à la place des bivalents : en effet, ces derniers induisaient une dimérisation du récepteur et son adressage vers le lysosome avec son cargo (Yu *et al.*, 2011; Niewoehner *et al.*, 2014). D'autres approches ont consisté à modifier par génie génétique le domaine de liaison de ces anticorps afin de diminuer leur affinité pour le TfR à pH endosomal (Sade *et al.*, 2014).

Aujourd'hui, la compréhension des verrous technologiques qui impactent fortement sur l'efficacité du transfert transendothélial des vecteurs, peptidiques ou autres, du compartiment luminal vers le compartiment abluminal, nécessite en plus une exploration du trafic intracellulaire des récepteurs cibles exprimés à la BHE et de leurs ligands et cargos. Ces stratégies qui ont été mises en place au cours de cette thèse pour étudier le LDLR comme récepteur potentiellement efficace dans le processus RMT à la BHE sont utilisées pour étudier d'autres récepteurs exprimés à la BHE tel que LRP8 et SR-BI, afin de les caractériser en tant que cibles potentielles permettant de promouvoir le passage des biopharmaceutiques vers le SNC. L'expression de LRP8, tant à la membrane plasmique apicale des cellules endothéliales de la BHE qu'au niveau des cellules nerveuses du parenchyme nerveux, pourrait également avoir un impact sur le taux d'accumulation intracérébral des vecteurs et conjugués.

Le marché des anticorps thérapeutiques présentant une efficacité en périphérie est en pleine croissance et acheminer certains de ces anticorps vers le SNC représenterait une réelle valeur ajoutée dans le cadre de nombreuses pathologies telles que le cancer (pe. Rituximab, Trastuzumab ou Herceptin®, Gemtuzumab ozogamicin, Alemtuzumab, Ibritumomab tiuxetan, Cetuximab, Bévacicumab, Nivolumab et Ipilimumab) ou les pathologies neurodégénératives ayant une composante inflammatoire (Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Éculizumab, Omalizumab, Efalizumab). Il est donc essentiel de poursuivre les études en cours afin de développer des stratégies satisfaisantes de transport de ces anticorps thérapeutiques et autres biomolécules dans le tissu nerveux.

#### **IV. L'inflammation des barrières endothéliales du SNC**

L'analyse comparative des transcriptomes des cellules endothéliales de la BHE et de la BSME a permis de montrer des différences constitutives et des différences de réponse à l'inflammation. L'exploitation des résultats se fait notamment en collaboration avec le Dr. Philippe Benech grâce au logiciel PredicSearch qu'il a développé et qui permet de regrouper les inductions et répressions d'expression de gènes dans des voies de signalisations. Les données décrites dans notre manuscrit sont entrain d'être complétées et confirmées par différentes approches. Par exemple, la validation de l'expression des MMPs au niveau protéique ou la confirmation de l'inhibition enzymatique des MMPs par les inhibiteurs synthétiques utilisés lors des essais de protection de la perte d'intégrité de la barrière induite par le TNF- $\alpha$ . Nous avons mis en évidence une forte différence d'expression des marqueurs HOXA9 et HOXB7 au niveau des CEMSs par rapport au CEMCs dans leur état constitutif et nous avons pour objectif de déterminer l'impact fonctionnel de ces différences, au niveau basal, mais également dans des cellules en situation d'inflammation. En comparant les CEMSs aux CEMCs, nous n'avons pas observé de différences constitutives dans les taux d'expression des ARNm codant pour nos récepteurs d'intérêt, ni de modulation de cette expression entre cellules non-enflammées et cellules enflammées. Notre objectif à long terme reste l'identification de récepteurs ou protéines membranaires impliquées dans des processus d'endocytose qui permettrait le ciblage d'un type cellulaire afin de développer des stratégies de vectorisation permettant l'acheminement de biopharmaceutiques soit vers le cerveau ou certaines structures du cerveau d'une part, et la moelle épinière d'autre part, et préférentiellement des cellules endothéliales de barrières du SNC enflammées plutôt que saines.

# BIBLIOGRAPHIE

## A

- Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* **2002**, 200(6):629-38.
- Abbott NJ. Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from *in vivo*, *in vitro* and *in silico* models. *Drug Discov Today Technol.* **2004**, 1(4):407-16.
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* **2006**, 7(1):41-53.
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* **2010**, 37(1):13–25.
- Abbruscato TJ, Lopez SP, Mark KS, Hawkins BT, Davis TP. Nicotine and cotinine modulate cerebral microvascular permeability and protein expression of ZO-1 through nicotinic acetylcholine receptors expressed on brain endothelial cells. *J Pharm Sci.* **2002**, 91(12):2525-38.
- Abu Ajaj K, El-Abadla N, Welker P, Azab S, Zeisig R, Fichtner I, Kratz F. Comparative evaluation of the biological properties of reducible and acid-sensitive folate prodrugs of a highly potent doxorubicin derivative. *Eur J Cancer* **2012**, 48(13):2054-65.
- Abdul-Muneer PM, Chandra N, Haorah J. Interactions of Oxidative Stress and Neurovascular Inflammation in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol.* **2015**, 51(3):966-79.
- Abumrad N, Coburn C, Ibrahim A. Membrane proteins implicated in long-chain fatty acid uptake by mammalian cells: CD36, FATP and FABPm. *Biochim Biophys Acta.* **1999**, 1441(1):4-13.
- Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* **1996**, 271(5248):518-20.
- Aloisi F, Ambrosini E, Columba-Cabezas S, Magliozzi R, Serafini B. Intracerebral regulation of immune responses. *Ann Med.* **2001**, 33(8):510-5.
- Ambrosio A, Khalansky AS, Yamamoto H, Gelperina SE, Begley DJ, Kreuter J. Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [14C]-poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastoma-bearing rats. *J Drug Target* **2006**, 14(2):97-105.
- Anderson P. Antibody responses to Haemophilus influenzae type b and diphtheria toxin induced by conjugates of oligosaccharides of the type b capsule with the nontoxic protein CRM197. *Infect Immun* **1983**, 39 (1): 233–238.
- Anderson R, Higgins GA. Absence of central cholinergic deficits in ApoE knockout mice. *Psychopharmacology (Berl).* **1997**, 132(2):135-44.
- Andjelkovic AV, Kerkovich D, Pachter JS. Monocyte:astrocyte interactions regulate MCP-1 expression in both cell types. *J Leukoc Biol.* **2000**, 68(4):545-52.
- Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* **2011**, 21(2):193-215.
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH: Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* **2000**, 20:1681–9.
- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH: Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *The Journal of neuroscience* **2001**, 21:7724–32.
- ## B
- Bachoo RM, Kim RS, Ligon KL, Maher EA, Brennan C, Billings N, Chan S, Li C, Rowitch DH, Wong WH, DePinho RA. Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**, 101(22):8384-9.
- Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, Regli L. Aquaporins in brain: distribution, physiology, and pathophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2002**, 22(4):367-78.
- Badaut J, Fukuda AM, Jullienne A, Petry KG. Aquaporin and brain diseases. *Biochim Biophys Acta.* **2014**, 1840(5):1554-65.
- Baello S, Iqbal M, Bloise E, Javam M, Gibb W, Matthews SG. TGF- $\beta$ 1 regulation of multidrug resistance P-glycoprotein in the developing male blood-brain barrier. *Endocrinology.* **2014**, 155(2):475-84.
- Balazs Z, Panzenboeck U, Hammer A, Sovic A, Quehenberger O, Malle E, Sattler W. Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an *in vitro* blood-brain barrier model. *J Neurochem.* **2004**, 89(4):939-50.
- Bana L, Minniti S, Salvati E, Sesana S, Zambelli V, Cagnotto A, Orlando A, Cazzaniga E, Zwart R, Scheper W, Masserini M, Re F. Liposomes bi-functionalized with phosphatidic acid and an ApoE-derived peptide affect A $\beta$  aggregation features and cross the blood-brain-barrier: implications for therapy of Alzheimer disease. *Nanomedicine* **2014**, 10(7):1583-90.
- Banks WA, Farr SA, Morley JE. Entry of blood-borne cytokines into the central nervous system: effects on cognitive processes. *Neuroimmunomodulation.* **2002-2003**, 10(6):319-27.
- Barberger-Gateau P, Raffaitin C, Letenneur L, Berr C, Tzourio C, Dartigues JF, Alpérovitch A. Dietary patterns and risk of dementia: the Three-City cohort study. *Neurology* **2007**, 69(20), 1921-1930.
- Barger SW, Hörster D, Furukawa K, Goodman Y, Kriegstein J, Mattson MP. Tumor necrosis factors alpha and beta protect neurons against amyloid beta-peptide toxicity: evidence for involvement of a kappa B-binding factor and attenuation of peroxide and Ca<sup>2+</sup> accumulation. *Proc Natl Acad Sci. USA* **1995**, 92(20):9328-32.

Bartanusz V, Jezova D, Alajajian B, Digicaylioglu M. The blood-spinal cord barrier: morphology and clinical implications. *Ann Neurol*. **2011**, 70(2):194-206.

Bazzoni G, Dejana E. Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev*. **2004**, 84:869-901.

Benarroch EE. Brain cholesterol metabolism and neurologic disease. *Neurology* **2008**, 71(17):1368-73.

Berezowski V, Landry C, Dehouck MP, Cecchelli R, Fenart L. 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 Res*. **2004**, 1018(1):1-9.

Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*. **2005**, 7(4):452-64.

Bertrand Y, Currie JC, Demeule M, Régina A, Ché C, Abulrob A, Fatehi D, Sartelet H, Gabathuler R, Castaigne JP, Stanimirovic D, Béliveau R. Transport characteristics of a novel peptide platform for CNS therapeutics. *J Cell Mol Med*. **2010**, 14(12):2827-39.

Bertrand Y, Currie JC, Poirier J, Demeule M, Abulrob A, Fatehi D, Stanimirovic D, Sartelet H, Castaigne JP, Béliveau R. Influence of glioma tumour microenvironment on the transport of ANG1005 via low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Br J Cancer* **2011**, 105(11):1697-707.

Betsholtz C. Physiology: Double function at the blood-brain barrier. *Nature* **2014**, 509(7501):432-3.

Betz AL, Firth JA, Goldstein GW. Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res*. **1980**, 192(1):17-28.

Bhakar AL, Tannis LL, Zeindler C, Russo MP, Jobin C, Park DS, MacPherson S, Barker PA. Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J Neurosci*. **2002**, 22(19):8466-75.

Bickel U, Yoshikawa T, Pardridge WM. Delivery of peptides and proteins through the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* **2001**, 46(1-3):247-79.

Bien-Ly N, Boswell CA, Jeet S, Beach TG, Hoyte K, Luk W, Shihadeh V, Ulufatu S, Foreman O, Lu Y, DeVoss J, van der Brug M, Watts RJ. Lack of Widespread BBB Disruption in Alzheimer's Disease Models: Focus on Therapeutic Antibodies. *Neuron*. **2015**, 88(2):289-97.

Bjørbaek C, Elmquist JK, Michl P, Ahima RS, van Bueren A, McCall AL, Flier JS. Expression of leptin receptor isoforms in rat brain microvessels. *Endocrinology* **1998**, 139(8):3485-91.

Björkhem I, Lutjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J Lipid Res*. **1998**, 39(8):1594-600.

Björkhem I, Meaney S. Brain cholesterol: long secret life behind a barrier. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2004**, 24(5):806-15.

Black RA, Durie FH, Otten-Evans C, Miller R, Slack JL, Lynch DH, Castner B, Mohler KM, Gerhart M, Johnson RS, Itoh Y, Okada Y, Nagase H. Relaxed specificity of matrix metalloproteinases (MMPs) and TIMP insensitivity of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production suggest the major TNF-alpha converting enzyme is not an MMP. *Biochem Biophys Res Commun* **1996**, 225(2):400-405.

Blanc E, Bonnafous C, Merida P, Cisternino S, Clair P, Scherrmann JM, Tamsamani J. Peptide-vector strategy bypasses P-glycoprotein efflux, and enhances brain transport and solubility of paclitaxel. *Anticancer Drugs* **2004**, 15(10):947-54.

Blumenthal R, Loyter A. Reconstituted viral envelopes--'Trojan horses' for drug delivery and gene therapy? *Trends Biotechnol*. **1991**, 9(2):41-5.

Boado RJ, Zhang Y, Zhang Y, Pardridge WM. Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. *Biotechnol Bioeng*. **2007**, 96(2):381-391.

Boado RJ, Hui EK, Lu JZ, Pardridge WM. AGT-181: expression in CHO cells and pharmacokinetics, safety, and plasma iduronidase enzyme activity in Rhesus monkeys. *J Biotechnol*. **2009**, 144(2):135-41.

Boado RJ, Hui EK, Lu JZ, Pardridge WM. Glycemic control and chronic dosing of rhesus monkeys with a fusion protein of iduronidase and a monoclonal antibody against the human insulin receptor. *Drug Metab Dispos*. **2012**, 40(10):2021-5.

Boado RJ, Hui EK, Lu JZ, Pardridge WM. Insulin receptor antibody-iduronate 2-sulfatase fusion protein: pharmacokinetics, anti-drug antibody, and safety pharmacology in Rhesus monkeys. *Biotechnol Bioeng*. **2014**, 111(11):2317-25.

Böckenhoff A, Cramer S, Wölte P, Knieling S, Wohlenberg C, Gieselmann V, Galla HJ, Matzner U. Comparison of five peptide vectors for improved brain delivery of the lysosomal enzyme arylsulfatase A. *J Neurosci*. **2014**, 34(9):3122-9.

Bonifati DM, Kishore U. Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol*. **2007**, 44(5):999-1010.

Bonizzi G, Karin M. The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*. **2004**, 25, 280-288

Bonkowski D, Katyshev V, Balabanov RD, Borisov A, Dore-Duffy P. The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids Barriers CNS*. **2011**, 8(1):8.

Bonnaud P, Margetts PJ, Kolb M, Schroeder JA, Kapoun AM, Damm D, Murphy A, Chakravarty S, Dugar S, Higgins L, Protter AA, Gauldie J : Progressive TGF- $\beta$ 1-induced Lung Fibrosis is Blocked by an Orally Active ALK5 Kinase Inhibitor. *Am J Respir Crit Care Med*. **2004**, 171:889-98.

Bonoiu A, Mahajan SD, Ye L, Kumar R, Ding H, Yong KT, Roy I, Aalinkeel R, Nair B, Reynolds JL, Sykes DE, Imperiale MA, Bergey EJ, Schwartz SA, Prasad PN. MMP-9 gene silencing by a quantum dot-siRNA nanoplex delivery to maintain the integrity of the blood brain barrier. *Brain Res*. **2009**, 1282:142-55.

Bonomini F, Rezzani R. Aquaporin and blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol*. **2010**, 8(2):92-6.

Borghini I, Barja F, Pometta D, James RW. Characterization of subpopulations of lipoprotein particles isolated from human cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta*. **1995**, 1255(2):192-200.

Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. **2003**, 111(2 Suppl):S460-75.

Boscher C, Nabi IR. Caveolin-1: role in cell signaling. *Adv Exp Med Biol*. **2012**, 729:29-50.



- Bragagni M, Mennini N, Furlanetto S, Orlandini S, Ghelardini C, Mura P. Development and characterization of functionalized niosomes for brain targeting of dynorphin-B. *Eur J Pharm Biopharm.* **2014**, 87(1):73-9.
- Brasnjevic I, Steinbusch HWM, Schmitz C, Martinez-Martinez P. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. *Prog Neurobiol.* **2009**, 87(4):212–51.
- Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol.* **2005**, 7(2):122-33.
- Brew K, Dinakarparandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* **2000**, 1477 (1–2): 267–83.
- Brionne TC, Tesseur I, Masliah E, Wyss-Coray T. Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron* **2003**, 40(6):1133-45.
- Broadwell RD. Transcytosis of macromolecules through the blood-brain barrier: a cell biological perspective and critical appraisal. *Acta Neuropathol.* **1989**, 79(2):117-28.
- Brockner C, Vasiliou, V; Nebert, DW. Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Human Genomics* **2009**, 4 (1): 43–55.
- Brodeur MR, Luangrath V, Bourret G, Falstraull L, Brissette L. Physiological importance of SR-BI in the *in vivo* metabolism of human HDL and LDL in male and female mice. *J Lipid Res.* **2005**, 46(4):687-96.
- Brossard N, Croset M, Lecerc J, Pachiardi C, Normand S, Chirouze V, Macovschi O, Riou JP, Tayot JL, Lagarde M. Metabolic fate of an oral tracer dose of [<sup>13</sup>C]docosahexaenoic acid triglycerides in the rat. *Am J Physiol.* **1996**, 270(4 Pt 2):R846-54.
- Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* **2007**, 55: 1263-1271.
- Brown MS, Goldstein JL. Receptor-mediated endocytosis: insights from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci. USA* **1979**, 76(7):3330-7.
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* **1986**, 232(4746):34-47.
- Buckwalter MS, Wyss-Coray T. Modelling neuroinflammatory phenotypes *in vivo*. *J Neuroinflammation.* **2004**, 1(1):10.
- Burdo JR, Menzies SL, Simpson IA, Garrick LM, Garrick MD, Dolan KG, Haile DJ, Beard JL, Connor JR. Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J Neurosci Res.* **2001**, 66(6):1198-207.
- Burk RF, Hill KE, Olson GE, Weeber EJ, Motley AK, Winfrey VP, Austin LM. Deletion of apolipoprotein E receptor-2 in mice lowers brain selenium and causes severe neurological dysfunction and death when a low-selenium diet is fed. *J Neurosci.* **2007**, 27(23):6207-11.
- Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P-expression, functions, and roles in mammals. *Biochim Biophys Acta.* **2009**, 1790(11):1441-7.
- Buzzi S, Rubboli D, Buzzi G, Buzzi AM, Morisi C, Pironi F. CRM197 (nontoxic diphtheria toxin): effects on advanced cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **2004**, 53 (11): 1041–1048.
- C**
- Calabria AR, Weidenfeller C, Jones AR, de Vries HE, Shusta EV. Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *J Neurochem.* **2006**, 97 (4), 922-33.
- Calabria AR, Shusta EV. A genomic comparison of *in vivo* and *in vitro* brain microvascular endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2008**, 28 (1), 135-48.
- Calvo D, Gómez-Coronado D, Lasunción MA, Vega MA. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **1997**, 17(11):2341-9.
- Camargo N, Brouwers JF, Loos M, Gutmann DH, Smit AB, Verheijen MH. High-fat diet ameliorates neurological deficits caused by defective astrocyte lipid metabolism. *FASEB J.* **2012**, 26(10):4302-15.
- Candela P, Gosselet F, Miller F, Buee-Scherrer V, Torpier G, Cecchelli R, Fenart L. Physiological pathway for low-density lipoproteins across the blood-brain barrier: transcytosis through brain capillary endothelial cells *in vitro*. *Endothelium* **2008**, 15(5-6):254-64.
- Candela P, Saint-Pol J, Kuntz M, Boucau MC, Lamartiniere Y, Gosselet F, Fenart L. *In vitro* discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res.* **2014**, S0006-8993(14)01469-3.
- Cao D, Xue R, Xu J, Liu Z. Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. *J Nutr Biochem.* **2005**, 16(9), 538-46.
- Cao D, Fukuchi K, Wan H, Kim H, Li L. Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice. *Neurobiol Aging* **2006**, 27, 1632-1643.
- Carrell R, Travis J.  $\alpha$ 1-Antitrypsin and the serpins: Variation and countervariation. *Trends Biochem* **1985**. Sci. 10: 20–24.
- Castellano JM, Deane R, Gottesdiener AJ, Verghese PB, Stewart FR, West T, Paoletti AC, Kasper TR, DeMattos RB, Zlokovic BV, Holtzman DM. Low-density lipoprotein receptor overexpression enhances the rate of brain-to-blood A $\beta$  clearance in a mouse model of  $\beta$ -amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci. USA.* **2012**, 109(38):15502-7.
- Cavaillon JM. Pro- versus anti-inflammatory cytokines: myth or reality. *Cell Mol Biol.* **2001**, 47(4):695-702.
- Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, Fenart L, Buée-Scherrer V V, Duhem C, Lundquist S, Rentfel M, Torpier G, Dehouck MP. *In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* **1999**, 36(2-3):165-178.

- Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck MP, Fenart L. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* **2007**, 6(8):650-61.
- Ceckova-Novotna M, Pavek P, Staud F. P-glycoprotein in the placenta: expression, localization, regulation and function. *Reprod Toxicol.* **2006**, 22(3):400-10. Epub 2006 Mar 24.
- Cerletti A, Drewe J, Fricker G, Eberle AN, Huwyler J. Endocytosis and transcytosis of an immunoliposome-based brain drug delivery system. *J Drug Target.* **2000**, 8(6):435-46.
- Champeil-Potokar G, Chaumontet C, Guesnet P, Lavielle M, Denis I. Docosahexaenoic acid (22:6n-3) enrichment of membrane phospholipids increases gap junction coupling capacity in cultured astrocytes. *Eur J Neurosci.* **2006**, 24:3084-90.
- Chaturvedi M, Figiel I, Sreedhar B, Kaczmarek L. Neuroprotection from tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and its nanoparticles. *Neurochem Int.* **2012**, 61(7): 1065-1071.
- Ché C, Yang G, Thiot C, Lacoste MC, Currie JC, Demeule M, Régina A, Béliveau R, Castaigne JP. New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration. *J Med Chem.* **2010**, 53(7):2814-24.
- Chen LF, Williams SA, Nakano H, Duerr JM, Buckbinder L, Greene WC. NF- $\kappa$ B RelA phosphorylation regulates RelA acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **2005**, 25, 7966–7975
- Chen S, Subbaiah PV. Phospholipid and fatty acid specificity of endothelial lipase: potential role of the enzyme in the delivery of docosahexaenoic acid (DHA) to tissues. *Biochim Biophys Acta.* **2007**, 1771(10):1319-28.
- Chobanian AV, Burrows BA, Hollander W. Body cholesterol metabolism in man. II. Measurement of the body cholesterol miscible pool and turnover rate, *J Clin Invest.* **1962**, 41:1738–1744.
- Chobanian AV, Hollander W. Body cholesterol metabolism in man. I. The equilibration of serum and tissue cholesterol. *J Clin Invest.* **1962**, 41:1732–1737.
- Chung NS, Wasan KM. Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* **2004**, 56(9):1315-34.
- Clavey V, Agnani G, Bard JM, Lestavel-Delattre S, Fruchart JC. Interaction between LDL receptor and lipoproteins containing apo B. *Ann Endocrinol.* **1991**, 52(6):459-63.
- Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med.* **2003**, 9(6):661-8.
- Coen L, Osta R, Maury M, Brûlet P. Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci. USA* **1997**, 94(17):9400-5.
- Cooray HC, Blackmore CG, Maskell L, Barrand MA. Localisation of breast cancer resistance protein in microvessel endothelium of human brain. *Neuroreport.* **2002**, 13(16):2059-63.
- Cornford EM, Hyman S. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx.* **2005**, 2(1):27-43.
- Croset M, Brossard N, Pachiaudi C, Normand S, Lecerf J, Chirouze V, Riou JP, Tayot JL, Lagarde M. In vivo compartmental metabolism of 13C-docosahexaenoic acid, studied by gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry. *Lipids.* **1996**, 31 Suppl:S109-15.
- Crossgrove JS, Smith EL, Zheng W. Macromolecules involved in production and metabolism of beta-amyloid at the brain barriers. *Brain Res.* **2007**, 1138:187-95.
- Cucullo L, Hossain M, Tierney W, Janigro D. A new dynamic *in vitro* modular capillaries-venules modular system: cerebrovascular physiology in a box. *BMC Neurosci.* **2013**, 14:18.
- Cuitino L, Matute R, Retamal C, Bu G, Inestrosa NC, Marzolo MP. ApoER2 is endocytosed by a clathrin-mediated process involving the adaptor protein Dab2 independent of its Rafts' association. *Traffic* **2005**, 6(9):820-38.
- D**
- Daddi N, Kanaan SA, Suda T, Tagawa T, D'Ovidio F, Grapperhaus K, Kozower BD, Ritter JH, Mohanakumar T, Patterson GA : Recipient intramuscular administration of naked plasmid TGF-beta1 attenuates lung graft reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant* **2003**, 22:1323-34.
- Dalvi S, On N, Nguyen H, Pogorzelec M, Miller DW, Hatch GM. The Blood Brain Barrier - Regulation of Fatty Acid and Drug Transport. *Neurochemistry* **2014**.
- Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. The mouse blood-brain barrier transcriptome: a new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS One* **2010**, 5(10):e13741.
- Danik M, Champagne D, Petit-Turcotte C, Beffert U, Poirier J. Brain lipoprotein metabolism and its relation to neurodegenerative disease. *Crit Rev Neurobiol.* **1999**, 13(4):357-407.
- Datta G, Chaddha M, Garber DW, Chung BH, Tytler EM, Dashti N, Bradley WA, Gianturco SH, Anantharamaiah GM. The receptor binding domain of apolipoprotein E, linked to a model class A amphipathic helix, enhances internalization and degradation of LDL by fibroblasts. *Biochemistry* **2000**, 39(1):213-20.
- Davis CG, Goldstein JL, Südhof TC, Anderson RG, Russell DW, Brown MS. Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. *Nature* **1987**, 326(6115):760-5.
- de Boer AG, van der Sandt IC, Gaillard PJ. The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2003**, 43:629-56.
- de Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **2007**, 47:323-55.

- De Oliveira J, Moreira EL, dos Santos DB, Piermartiri TC, Dutra RC, Pinton S, Tasca CI, Farina M, Prediger RD, de Bem AF. Increased susceptibility to amyloid- $\beta$ -induced neurotoxicity in mice lacking the low-density lipoprotein receptor. *J Alzheimers Dis*. **2014**, 41(1):43-60.
- De Smedt-Peyrusse V, Sargueil F, Moranis A, Harizi H, Mongrand S, Layé S. Docosahexaenoic acid prevents lipopolysaccharide-induced cytokine production in microglial cells by inhibiting lipopolysaccharide receptor presentation but not its membrane subdomain localization. *J Neurochem*. **2008**, 105(2), 296-307.
- Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, LaRue B, Guo H, Wu Z, Holtzman DM, Zlokovic BV. IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor. *J Neurosci*. **2005**, 25(50):11495-503.
- Deeken JF, Löscher W. The blood-brain barrier and cancer: transporters, treatment, and Trojan horses. *Clin Cancer Res*. **2007**, 13(6):1663-74.
- Dehouck MP, Méresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neurochem*. **1990**, 54(5):1798-801.
- Dehouck B, Dehouck MP, Fruchart JC, Cecchelli R. Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol*. **1994**, 126(2):465-73.
- Dehouck B, Fenart L, Dehouck MP, Pierce A, Torpier G, Cecchelli R. A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J Cell Biol*. **1997**, 138(4):877-89.
- Delbart C, Fruchart JC, Cecchelli R. Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem* **1989**, 53 (2), 340-5.
- Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*. **2005**, 25(1):59-127.
- Deloire MS, Touil T, Brochet B, Dousset V, Caillé JM, Petry KG. Macrophage brain infiltration in experimental autoimmune encephalomyelitis is not completely compromised by suppressed T-cell invasion: *in vivo* magnetic resonance imaging illustration in effective anti-VLA-4 antibody treatment. *Mult Scler*. **2004**, 10(5):540-8.
- Demeester N, Castro G, Desrumaux C, De Geitere C, Fruchart JC, Santens P, Mulleners E, Engelborghs S, De Deyn PP, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Labeur C. Characterization and functional studies of lipoproteins, lipid transfer proteins, and lecithin:cholesterol acyltransferase in CSF of normal individuals and patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res*. **2000**, 41(6):963-74.
- Demeule M, Poirier J, Jodoin J, Bertrand Y, Desrosiers RR, Dagenais C, Nguyen T, Lanthier J, Gabathuler R, Kennard M, Jefferies WA, Karkan D, Tsai S, Fenart L, Cecchelli R, Béliveau R. High transcytosis of melanotransferrin (P97) across the blood-brain barrier. *J Neurochem*. **2002**, 83(4):924-33.
- Demeule M, Régina A, Ché C, Poirier J, Nguyen T, Gabathuler R, Castaigne JP, Béliveau R. Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther*. **2008a**, 324(3):1064-72.
- Demeule M, Currie JC, Bertrand Y, Ché C, Nguyen T, Regina A, Gabathuler R, Castaigne JP, Beliveau R. Involvement of the low-density lipoprotein receptor-related protein in the transcytosis of the brain delivery vector angiopep-2. *J Neurochem*. **2008b**, 106(4):1534-44.
- Demeule M, Beaudet N, Régina A, Besserer-Offroy É, Murza A, Tétreault P, Belleville K, Ché C, Larocque A, Thiot C, Béliveau R, Longpré JM, Marsault É, Leduc R, Lachowicz JE, Gonias SL, Castaigne JP, Sarret P. Conjugation of a brain-penetrant peptide with neurotensin provides antinociceptive properties. *J Clin Invest*. **2014**, 124(3):1199-213.
- Descamps L, Dehouck MP, Torpier G, Cecchelli R. Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am J Physiol*. **1996**, 270(4 Pt 2):H1149-58.
- Descamps L, Cecchelli R, Torpier G. Effects of tumor necrosis factor on receptor-mediated endocytosis and barrier functions of bovine brain capillary endothelial cell monolayers. *J Neuroimmunol*. **1997**, 74 (1-2), 173-84.
- Dietschy JM, Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr Opin Lipidol*. **2001**, 12(2):105-12.
- Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res*. **2004**, 45(8):1375-97.
- DiLuca M, Olesen J. The cost of brain diseases: a burden or a challenge? *Neuron* **2014**, 82(6):1205-8.
- Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV: Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **2006**, 26:797-810.
- Do TM, Noel-Hudson MS, Ribes S, Besengez C, Smirnova M, Cisternino S, Buyse M, Calon F, Chimini G, Chacun H, Scherrmann JM, Farinotti R, Bourasset F. ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid- $\beta$  peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis*. **2012**, 30(1):155-66.
- Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci*. **1999**, 19(23):10193-200.
- Duffy KR, Pardridge WM. Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. *Brain Res*. **1987**, 420(1):32-8.
- Duit S, Mayer H, Blake SM, Schneider WJ, Nimpf J. Differential functions of ApoER2 and very low density lipoprotein receptor in Reelin signaling depend on differential sorting of the receptors. *J Biol Chem*. **2010**, 285(7):4896-908.
- Duncan KG, Bailey KR, Kane JP, Schwartz DM. Human retinal pigment epithelial cells express scavenger receptors BI and BII. *Biochem Biophys Res Commun* **2002**, 292:1017-22.
- Dunn KW, McGraw TE, Maxfield FR. Iterative fractionation of recycling receptors from lysosomally destined ligands in an early sorting endosome. *J Cell Biol*. **1989**, 109(6 Pt 2): p. 3303-14.
- Dyrna F, Hanske S, Krueger M, Bechmann I. The blood-brain barrier. *J Neuroimmune Pharmacol*. **2013**, 8(4):763-73.

Dzwonek J, Rylski M, Kaczmarek L. Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett.* **2004**, 567(1):129-35.

## E

Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D. Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci.* **2004**, 117(Pt 1):19-29.

Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* **2008**. 29 (5): 258–89.

Erllich P. Das sauerstoffbedürfnis des organismus. Ein farbenanalytische studie. **1885**, A Hirschwald Edit Berlin.

Esser V, Russell DW. Transport-deficient mutations in the low density lipoprotein receptor. Alterations in the cysteine-rich and cysteine-poor regions of the protein block intracellular transport. *J Biol Chem.* **1988**, 263(26):13276-81.

Extier A, Langelier B, Perruchot MH, Guesnet P, Van Veldhoven PP, Lavielle M, Alessandri JM. Gender affects liver desaturase expression in a rat model of n-3 fatty acid repletion. *J Nutr Biochem.* **2010**, 21:180-187.

## F

Fan QW, Iosbe I, Asou H, Yanagisawa K, Michikawa M. Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture: A review. *J Am Aging Assoc.* **2001**, 24(1):1-10.

Fan ZK, Lv G, Wang YF, Li G, Yu DS, Wang YS, Zhang YQ, Mei XF, Cao Y. The protective effect of salvianolic acid B on blood-spinal cord barrier after compression spinal cord injury in rats. *J Mol Neurosci.* **2013**, 51(3):986-93.

Farina C, Aloisi F, Meini E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* **2007**, 28(3):138-45.

Farkas E, Luiten PG. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* **2001**, 64(6):575-611.

Farrell CL, Yang J, Partridge WM. GLUT-1 glucose transporter is present within apical and basolateral membranes of brain epithelial interfaces and in microvascular endothelia with and without tight junctions. *J Histochem Cytochem.* **1992**, 40(2):193-9.

Farrington GK, Caram-Salas N, Haqqani AS, Brunette E, Eldredge J, Pepinsky B, Antognetti G, Baumann E, Ding W, Garber E, Jiang S, Delaney C, Boileau E, Sisk WP3, Stanimirovic DB. A novel platform for engineering blood-brain barrier-crossing bispecific biologics. *FASEB J.* **2014**, 28(11):4764-78.

Federici T, Liu JK, Teng Q, Yang J, Boulis NM. A means for targeting therapeutics to peripheral nervous system neurons with axonal damage. *Neurosurgery* **2007**, 60(5):911-8; discussion 911-8.

Fellin T, D'Ascenzo M, Haydon PG. Astrocytes control neuronal excitability in the nucleus accumbens. *Scientific World Journal.* **2007**, 7:89-97.

Feng XH, Derynck R. Specificity and versatility in TGF- $\beta$  signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **2005**, 21, 659–693.

Fenstermacher J, Gross P, Sposito N, Acuff V, Pettersen S, Gruber K. Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann N Y Acad Sci.* **1988**, 529:21-30.

Figueiredo DM, Hallewell RA, Chen LL, Fairweather NF, Dougan G, Savitt JM, Parks DA, Fishman PS. Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase proteins to central nervous system neurons by retrograde axonal transport. *Exp Neurol.* **1997**, 145(2 Pt 1):546-54.

Fillebeen C, Dehouck B, Benaïssa M, Dhennin-Duthille I, Cecchelli R, Pierce A. Tumor necrosis factor-alpha increases lactoferrin transcytosis through the blood-brain barrier. *J Neurochem.* **1999**, 73 (6), 2491-500.

Firestone RA. Low-density lipoprotein as a vehicle for targeting antitumor compounds to cancer cells. *Bioconjug Chem.* **1994**, 5(2):105-13.

Fishman JB, Rubin JB, Handrahan JV, Connor JR, Fine RE. Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. *J Neurosci Res.* **1987**, 18(2):299-304.

Fishman PS, Savitt JM, Farrand DA. Enhanced CNS uptake of systemically administered proteins through conjugation with tetanus C-fragment. *J Neurol Sci.* **1990**, 98(2-3):311-25.

Förster C, Silwedel C, Golenhofen N, Burek M, Kietz S, Mankertz J, Drenckhahn D. Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine *in vitro* system. *J Physiol.* **2005**, 565(Pt 2):475-86.

Förster C, Waschke J, Burek M, Leers J, Drenckhahn D. Glucocorticoid effects on mouse microvascular endothelial barrier permeability are brain specific. *J Physiol.* **2006**, 573 (Pt. 2), 413.

Förster C, Kahles T, Kietz S, Drenckhahn D. Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND. *J Physiol.* **2007**, 580(Pt.3):937-49.

Forster C, Burek M, Romero I, Weksler B, Couraud P-O, Drenckhahn D. Differential effects of hydrocortisone and TNFa on tight junction proteins in an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. *J Physiol* **2008**, 7:1937–49.

Frankowski H, Gu YH, Heo JH, Milner R, Del Zoppo GJ. Use of gel zymography to examine matrix metalloproteinase (gelatinase) expression in brain tissue or in primary glial cultures. *Methods Mol Biol.* **2012**, 814:221-33.

Freudlsperger C, Bian Y, Contag Wise S, Burnett J, Coupar J, Yang X, Chen Z, Van Waes C. TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene* **2013**, 32(12):1549-59.

Freund Levi Y, Vedin I, Cederholm T, Basun H, Faxén Irving G, Eriksdotter M, Hjorth E, Schultzberg M, Vessby B, Wahlund LO, Salem N Jr, Palmblad J. Transfer of omega-3 fatty acids across the blood-brain barrier after dietary supplementation with a docosahexaenoic acid-rich omega-3 fatty acid preparation in patients with Alzheimer's disease: the OmegaAD study. *J Intern Med.* **2014**, 275(4):428-36.

Frey A, Meckelein B, Weiler-Güttler H, Möckel B, Flach R, Gassen HG. Pericytes of the brain microvasculature express gamma-glutamyl transpeptidase. *Eur J Biochem.* **1991**, 202(2):421-9.

Friden PM, Walus LR, Musso GF, Taylor MA, Malfroy B, Starzyk RM. Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci. USA* **1991**, 88(11):4771-5.

Friden PM, Walus LR, Watson P, Doctrow SR, Kozarich JW, Bäckman C, Bergman H, Hoffer B, Bloom F, Granholm AC. Blood-brain barrier penetration and *in vivo* activity of an NGF conjugate. *Science* **1993**, 259(5093):373-7.

Friden PM, Olson TS, Obar R, Walus LR, Putney SD. Characterization, receptor mapping and blood-brain barrier transcytosis of antibodies to the human transferrin receptor. *J Pharmacol Exp Ther.* **1996**, 278(3):1491-8.

## G

Gabathuler R. Development of new peptide vectors for the transport of therapeutic across the blood-brain barrier. *Ther Deliv.* **2010**, 1(4):571-86.

Gadient RA, Otten UH. Interleukin-6 (IL-6)--a molecule with both beneficial and destructive potentials. *Prog Neurobiol.* **1997**, 52(5):379-90.

Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **2009**, 29(5):630-8.

Gaillard PJ, Brink A, Boer de AG. Differentially expressed nucleic acids in the blood-brain barrier under inflammatory conditions. World patent WO2004069870, **2004**.

Gaillard PJ, Brink A, de Boer AG. Diphtheria toxin receptor-targeted brain drug delivery. *International Congress Series* **2005a**, 1277(0), 185-98.

Gaillard PJ, Visser CC, Boer, de AG. Targeted delivery across the blood-brain barrier, *Exp Opin Drug Deliv.* **2005b**, 2(2): 299-309.

Gaillard PJ, de Boer AG. A novel opportunity for targeted drug delivery to the brain. *J Control Release.* **2006**, 116(2):e60-2.

Gaillard PJ, de Boer AG. 2B-Trans technology: targeted drug delivery across the blood-brain barrier. *Methods Mol Biol.* **2008**, 437:161-75.

Gaillard PJ. Crossing barriers from blood-to-brain and academia-to-industry. *Ther Deliv.* **2010**, 1(4):495-500.

Galis Z, Sukhova GK, Libby P. Microscopic localisation of active protease by *in situ* zymography: a detection of matrix metalloproteinase activity in vascular tissue. *FASEB J.* **1995**, 9:974-80.

Gasche Y, Soccal PM, Kanemitsu M, Copin JC. Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci.* **2006**, 11:1289-301.

Ge R, Rajeev V, Subramanian G, Reiss KA, Liu D, Higgins L, Joly A, Dugar S, Chakravarty J, Henson M, McEnroe G, Schreiner G, Reiss M. Selective inhibitors of type I receptor kinase block cellular transforming growth factor-beta signaling. *Biochem Pharmacol*, **2004**, 68:41-50.

Ge S, Pachter JS. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord. *J Neuroimmunol* **2006**, 177(1-2):209-14.

Gegelashvili, G., Dehnes, Y., Danbolt, N.C., Schousboe, A. The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochem Int.* **2000**, 37(2-3):163-70.

Georgieva JV, Hoekstra D, Zuhorn IS. Smuggling Drugs into the Brain: An Overview of Ligands Targeting Transcytosis for Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics* **2014**, 6(4):557-83.

Gherzi-Egea JF, Leininger-Muller B, Cecchelli R, Fenstermacher JD. Blood-brain interfaces: relevance to cerebral drug metabolism. *Toxicol Lett.* **1995**, 82-83:645-53.

Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J Appl Physiol.* **2006**, 100(1):328-35.

Glabinski AR, Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors in CNS pathology. *J Neurovirol.* **1999**, 5 (1), 3-12.

Gliemann J. Receptors of the low density lipoprotein (LDL) receptor family in man. Multiple functions of the large family members via interaction with complex ligands. *Biol Chem.* **1998**, 379(8-9):951-64.

Goldmann E. Vitalfärbung am zentral nerven system. Beitrag zur physiologie des plexus choroïdus und der hirnhaut. **1913**, Berlin.

Golovatscka V, Ennes H, Mayer EA, Bradesi S. Chronic stress-induced changes in pro-inflammatory cytokines and spinal glia markers in the rat: a time course study. *Neuroimmunomodulation.* **2012**, 19(6):367-76.

Gosselet F, Candela P, Sevin E, Berezowski V, Cecchelli R, Fenart L. Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an *in vitro* model. *Brain Res.* **2009**, 1249:34-42.

Gosselet F, Saint-Pol J, Fenart L. Effects of oxysterols on the blood-brain barrier: implications for Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* **2014**, 446(3):687-91.

Goti D, Hammer A, Galla HJ, Malle E, Sattler W. Uptake of lipoprotein-associated alpha-tocopherol by primary porcine brain capillary endothelial cells. *J Neurochem.* **2000**, 74(4):1374-83.

Goti D, Hrzenjak A, Levak-Frank S, Frank S, van der Westhuyzen DR, Malle E, Sattler W. Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E. *J Neurochem.* **2001**, 76(2):498-508.

Goti D, Balazs Z, Panzenboeck U, Hrzenjak A, Reicher H, Wagner E, Zechner R, Malle E, Sattler W. Effects of lipoprotein lipase on uptake and transcytosis of low density lipoprotein (LDL) and LDL-associated alpha-tocopherol in a porcine *in vitro* blood-brain barrier model. *J Biol Chem.* **2002**, 277(32):28537-44.

Gotthardt M, Trommsdorff M, Nevitt MF, Shelton J, Richardson JA, Stockinger W, Nimpf J, Herz J. Interactions of the low density lipoprotein receptor gene family with cytosolic adaptor and scaffold proteins suggest diverse biological functions in cellular communication and signal transduction. *J Biol Chem.* **2000**, 275(33):25616-24.

- Gotti C, Clementi F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol.* **2004**, 74(6):363-96.
- Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G. Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF- $\beta$  receptor signaling pathways. *Trends Cardiovasc Med.* **2003**, 13(7):301-7.
- Green JA, Friedland JS. Astrocyte-leucocyte interactions and the mechanisms regulating matrix degradation in CNS tuberculosis. *Biochem Soc Trans.* **2007**, 35:686-688.
- Grieb P, Forster RE, Strome D, Goodwin CW, Pape PC. O<sub>2</sub> exchange between blood and brain tissues studied with 18O<sub>2</sub> indicator-dilution technique. *J Appl Physiol.* **1985**, 58(6):1929-41.
- Griffin WS, Stanley LC, Ling C, White L, MacLeod V, Perrot LJ, White CL 3rd, Araoz C. Brain interleukin 1 and S-100 immunoreactivity are elevated in Down syndrome and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1989**, 86(19):7611-5.
- Gu W, Luo J, Brooks CL, Nikolaev AY, Li M. Dynamics of p53 acetylation pathway. *Novartis Found. Symp.* **2004**, 259:197–205, discussion 205-7, 223-5.
- Guillemot L, Hammar E, Kaister C, Ritz J, Caille D, Jond L, Bauer C, Meda P, Citi S. Disruption of the cingulin gene does not prevent tight junction formation but alters gene expression. *Cell Sci.* **2004**, 117(Pt 22):5245-56.
- Gumbiner B, Simons K. A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier: identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J Cell Biol.* **1986**, 102(2):457-68.
- Guo X, Geng M, Du G. Glucose transporter 1, distribution in the brain and in neural disorders: its relationship with transport of neuroactive drugs through the blood-brain barrier. *Biochem Genet.* **2005**, 43(3-4):175-87.
- H**
- Hamilton JA, Brunaldi K. A model for fatty acid transport into the brain. *J Mol Neurosci.* **2007**, 33(1):12-7.
- Hamilton JA, Guo W, Kamp F. Mechanism of cellular uptake of long-chain fatty acids: Do we need cellular proteins? *Mol Cell Biochem.* **2002**, 239(1-2):17-23.
- Hansen EH, Ghose AK, Růzicka J. Flow injection analysis of environmental samples for nitrate using an ion-selective electrode. *Analyst.* **1977**, 102(1219):705-13.
- Hansmann F, Herder V, Kalkuhl A, Haist V, Zhang N, Schaudien D, Deschl U, Baumgärtner W, Ulrich R. Matrix metalloproteinase-12 deficiency ameliorates the clinical course and demyelination in Theiler's murine encephalomyelitis. *Acta Neuropathol.* **2012**, 124(1):127-42.
- Harrison RV, Harel N, Panesar J, Mount RJ. Blood capillary distribution correlates with hemodynamic-based functional imaging in cerebral cortex. *Cereb Cortex* **2002**, 12(3):225-33.
- Hatada E, Krappmann D, Scheidereit C. NF- $\kappa$ B and the innate immune response. *Curr Opin Immunol.* **2000**, 12, 52–58
- Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* **2005**, 57, 173-185.
- Hawkins RA, O'Kane RL, Simpson IA, Viña JR. Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr.* **2006**, 136(1 Suppl):218S-26S.
- Hayes KC, Lindsey S, Stephan ZF, Brecker D. Retinal pigment epithelium possesses both LDL and scavenger receptor activity. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **1989**, 30:225-32.
- Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, Betsholtz C. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* **2001**, 153(3):543-53.
- Hervé F, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.* **2008**, 10(3):455-72.
- Herz J, Bock HH. Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem.* **2002**, 71:405-34.
- Herz J. The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain. *Neuron* **2001**, 29(3):571-81.
- Hoberg JE, Popko AE, Ramsey CS, Mayo MW. I $\kappa$ B kinase  $\alpha$ -mediated derepression of SMRT potentiates acetylation of RelA/p65 by p300. *Mol Cell Biol.* **2006**, 26:457–71
- Hogg RC, Raggenbass M, Bertrand D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* **2003**, 147:1-46.
- Horuk R, Martin AW, Wang Z, Schweitzer L, Gerassimides A, Guo H, Lu Z, Hesselgesser J, Perez HD, Kim J, Parker J, Hadley TJ, Peiper SC. Expression of chemokine receptors by subsets of neurons in the central nervous system. *J Immunol* **1997**, 158: 2882  $\pm$  2890.
- Huang R, Ma H, Guo Y, Liu S, Kuang Y, Shao K, Li J, Liu Y, Han L, Huang S, An S, Ye L, Lou J, Jiang C. Angiopep-conjugated nanoparticles for targeted long-term gene therapy of Parkinson's disease. *Pharm Res.* **2013**, 30(10):2549-59.
- Huang S, Henry L, Ho YK, Pownall HJ, Rudenko G. Mechanism of LDL binding and release probed by structure-based mutagenesis of the LDL receptor. *J Lipid Res.* **2010**, 51(2):297-308.
- Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* **2001**, 24:719-725.
- Hussain MM, Strickland DK, Bakillah A. The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr.* **1999**, 19:141-72.
- Huwylar J, Wu D, Partridge WM. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc Natl Acad Sci. USA* **1996**, 93(24):14164-9.

**I**

Igawa T, Ishii S, Tachibana T, Maeda A, Higuchi Y, Shimaoka S, Moriyama C, Watanabe T, Takubo R, Doi Y, Wakabayashi T, Hayasaka A, Kadono S, Miyazaki T, Haraya K, Sekimori Y, Kojima T, Nabuchi Y, Aso Y, Kawabe Y, Hattori K. Antibody recycling by engineered pH-dependent antigen binding improves the duration of antigen neutralization. *Nat Biotechnol.* **2010**; 28(11):1203-7.

Ikeda E, Flamme I, Risau W. Developing brain cells produce factors capable of inducing the HT7 antigen, a blood-brain barrier-specific molecule, in chick endothelial cells. *Neurosci Lett.* **1996**, 209(3):149-52.

Illingworth DR, Portman OW. Exchange of phospholipids between low and high density lipoproteins of squirrel monkeys. *J Lipid Res.* **1972**, 13(2):220-7.

Innerarity TL. LDL Receptor's  $\beta$ -Propeller Displaces LDL. *Science* **2002**, 298, 2337-39.

Ishida T, Choi S, Kundu RK, Hirata K, Rubin EM, Cooper AD, Quertermous T. Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *J Clin Invest.* **2003**, 111(3):347-55.

Ishinaga H, Jono H, Lim JH, Komatsu K, Xu X, Lee J, Woo CH, Xu H, Feng XH, Chen LF, Yan C, Li JD. Synergistic induction of nuclear factor-kappaB by transforming growth factor-beta and tumour necrosis factor-alpha is mediated by protein kinase A-dependent RelA acetylation. *Biochem J.* **2009**, 417(2):583-91.

Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem.* **2000**, 267(24):6954-67.

Itoh T, Satou T, Nishida S, Hashimoto S, Ito H. Cultured rat astrocytes give rise to neural stem cells. *Neurochem Res.* **2006**, 31(11):1381-7.

## J

Jackson V, Olsson T, Kurtovic S, Folkersen L, Paloschi V, Wågsäter D, Franco-Cereceda A, Eriksson P. Matrix metalloproteinase 14 and 19 expression is associated with thoracic aortic aneurysms. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **2012**, 144(2):459-66.

Jefferies WA, Brandon MR, Hunt SV, Williams AF, Gatter KC, Mason DY. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* **1984**, 312(5990):162-3.

Jickling GC, Liu D, Stamova B, Ander BP, Zhan X, Lu A, Sharp FR. Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2014**, 34(2):185-99.

Jin R, Yang G, Li G. Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis.* **2010**, 38(3):376-85.

Johannes L, Lamaze C. Clathrin-dependent or not: is it still the question? *Traffic.* **2002**, 3(7):443-51.

Jones AR, Shusta EV. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res.* **2007**, 24(9):1759-71.

Jones JA, Zavadzka JA, Chang EI, Sheats N, Koval C, Stroud RE, Spinale FG, Ikonomidis JS. Cellular phenotype transformation occurs during thoracic aortic aneurysm development. *J Thorac Cardiovasc Surg.* **2010**, 140(3):653-9.

Jourquin J, Tremblay E, Décanis N, Charton G, Hanessian S, Chollet AM, Le Diguardher T, Khrestchatsky M, Rivera S. Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainate. *Eur J Neurosci.* **2003**, 18(6):1507-1517.

Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta.* **1976**, 455(1):152-62.

## K

Kania KD, Wijesuriya HC, Hladky SB, Barrand MA. Beta amyloid effects on expression of multidrug efflux transporters in brain endothelial cells. *Brain Res.* **2011**, 1418:1-11.

Kannan R, Kuhlenskamp JF, Jeandidier E, Trinh H, Ookhtens M, Kaplowitz N. Evidence for carrier-mediated transport of glutathione across the blood-brain barrier in the rat. *J Clin Invest.* **1990**, 85(6):2009-13.

Kannan R, Mittur A, Bao Y, Tsuruo T, Kaplowitz N. GSH transport in immortalized mouse brain endothelial cells: evidence for apical localization of a sodium-dependent GSH transporter. *J Neurochem.* **1999**, 73(1):390-9.

Kannan R, Chakrabarti R, Tang D, Kim KJ, Kaplowitz N. GSH transport in human cerebrovascular endothelial cells and human astrocytes: evidence for luminal localization of Na<sup>+</sup>-dependent GSH transport in HCEC. *Brain Res.* **2000**, 852(2): 374-82.

Karasinska JM, Rinninger F, Lutjohann D, Ruddle P, Franciosi S, Kruit JK, Singaraja RR, Hirsch-Reinshagen V, Fan J, Brunham LR, Bissada N, Ramakrishnan R, Wellington CL, Parks JS, Hayden MR. Specific loss of brain ABCA1 increases brain cholesterol uptake and influences neuronal structure and function. *J Neurosci.* **2009**, 29(11):3579-89.

Karkan D, Pfeifer C, Vitalis TZ, Arthur G, Ujii M, Chen Q, Tsai S, Koliatis G, Gabathuler R, Jefferies WA. A unique carrier for delivery of therapeutic compounds beyond the blood-brain barrier. *PLoS One* **2008**, 3(6):e2469.

Katsouri L, Georgopoulos S. Lack of LDL receptor enhances amyloid deposition and decreases glial response in an Alzheimer's disease mouse model. *PLoS One* **2011**, 6(7):e21880.

Kaur C, Ling EA. Blood brain barrier in hypoxic-ischemic conditions. *Curr Neurovasc Res.* **2008**, 5(1):71-81.

Kawakita E, Hashimoto M, Shido O. Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Neuroscience* **2006**, 139(3), 991-97.

Keck CM, Jansch M, Müller RH. Protein Adsorption Patterns and Analysis on IV Nanoemulsions—The Key Factor Determining the Organ Distribution. *Pharmaceutics* **2013**, 5(1): 36-68.

- Kenagy R, Bierman EL, Schwartz S, Albers JJ. Metabolism of low density lipoprotein by bovine endothelial cells as a function of cell density. *Arteriosclerosis* **1984**, 4(4):365-71.
- Kim DH, Iijima H, Goto K, Sakai J, Ishii H, Kim HJ, Suzuki H, Kondo H, Saeki S, Yamamoto T. Human apolipoprotein E receptor 2. A novel lipoprotein receptor of the low density lipoprotein receptor family predominantly expressed in brain. *J Biol Chem*. **1996**, 271(14):8373-80.
- Kim HR, Andrieux K, Gil S, Taverna M, Chacun H, Desmaële D, Taran F, Georgin D, Couvreur P. Translocation of poly(ethylene glycol-co-hexadecyl)cyanoacrylate nanoparticles into rat brain endothelial cells: role of apolipoproteins in receptor-mediated endocytosis. *Biomacromolecules* **2007**, 8(3):793-9.
- Kim JH, Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol*. **2006**, 39: 339-345.
- Kissel K, Hamm S, Schulz M, Vecchi A, Garlanda C, Engelhardt B. Immunohistochemical localization of the murine transferrin receptor (TfR) on blood-tissue barriers using a novel anti-TfR monoclonal antibody. *Histochem Cell Biol*. **1998**, 110(1):63-72.
- König HG, Kögel D, Rami A, Prehn JH. TGF- $\beta$ 1 activates two distinct type I receptors in neurons: implications for neuronal NF- $\kappa$ B signaling. *J Cell Biol*. **2005**, 168(7):1077-86.
- Korschineck I, Ziegler S, Breuss J, Lang I, Lorenz M, Kaun C, Ambros PF, Binder BR. Identification of a novel exon in apolipoprotein E receptor 2 leading to alternatively spliced mRNAs found in cells of the vascular wall but not in neuronal tissue. *J Biol Chem*. **2001**, 276(16):13192-7.
- Kossmann T, Stahel PF, Lenzlinger PM, Redl H, Dubs RW, Trentz O, Schlag G, Morganti-Kossmann MC. Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain injury is associated with blood-brain barrier dysfunction and nerve growth factor production. *J Cereb Blood Flow Metab* **1997**, 17: 280  $\pm$  289.
- Kreuter J, Shamenkov D, Petrov V, Ränge P, Cychutek K, Koch-Brandt C, Alyautdin R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target* **2002**, 10(4):317-25.
- Kreuter J. Influence of the surface properties on nanoparticle-mediated transport of drugs to the brain. *J Nanosci Nanotechnol*. **2004**, 4(5):484-8.
- Kreuter J, Hekmatara T, Dreis S, Vogel T, Gelperina S, Langer K. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J Control Release* **2007**, 118(1):54-8.
- Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* **2007**, 448(7149):39-43.
- Kurschat P, Graeve L, Erren A, Gatsios P, Rose-John S, Roeb E, Tschesche H, Koj A, Heinrich PC. Expression of a biologically active murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in baculovirus-infected insect cells. Purification and tissue distribution in the rat. *Eur J Biochem* **1995**, 234(2): 485-491.
- Kuwahara H, Nishina K, Yoshida K, Nishina T, Yamamoto M, Saito Y, Piao W, Yoshida M, Mizusawa H, Yokota T. Efficient *in vivo* delivery of siRNA into brain capillary endothelial cells along with endogenous lipoprotein. *Mol Ther*. **2011**, 19(12):2213-21.
- ## L
- Lagarde M, Bernoud N, Brossard N, Lemaitre-Delaunay D, Thiès F, Crosset M, Lecerf J. Lysophosphatidylcholine as a preferred carrier form of docosahexaenoic acid to the brain. *J Mol Neurosci*. **2001**, 16(2-3):201-4; discussion 215-21.
- Lai CH, Kuo KH, Leo JM. Critical role of actin in modulating BBB permeability. *Brain Res Brain Res Rev*. **2005**, 50(1):7-13.
- Lai CH, Kuo KH. The critical component to establish *in vitro* BBB model: Pericyte. *Brain Res Brain Res Rev*. **2005**, 50(2):258-65.
- Lajoie JM, Shusta EV. Targeting receptor-mediated transport for delivery of biologics across the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **2015**, 55:613-31.
- Lalatsa A, Schatzlein AG, Uchegbu IF. Strategies to deliver peptide drugs to the brain. *Mol Pharm*. **2014**, 11(4):1081-93.
- Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ, Reiner PB. beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem*. **2001**, 76(4):1121-8.
- Lambert E, Bridoux L, Devy J, Dassé E, Sowa ML, Duca L, Hornebeck W, Martiny L, Petitfrère-Charpentier E. TIMP-1 binding to proMMP-9/CD44 complex localized at the cell surface promotes erythroid cell survival. *Int J Biochem Cell Biol*. **2009**, 41(5):1102-15.
- Lan HY. Diverse roles of TGF- $\beta$ /Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci*. **2011**, (7):1056-67.
- Lane-Donovan C, Philips GT, Herz J. More than Cholesterol Transporters: Lipoprotein Receptors in CNS Function and Neurodegeneration. *Neuron* **2014**, 83(4):771-87.
- Lasbennes F, Lacombe P, Seylaz J. Effect of monoamine oxidase inhibition on the regional cerebral blood flow response to circulating noradrenaline. *Brain Res*. **1988**, 454(1-2):205-11.
- Lawrenson JG, Reid AR, Finn TM, Orte C, Allt G. Cerebral and pial microvessels: differential expression of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase. *Anat Embryol (Berl)*. **1999**, 199(1):29-34.
- Layé S. Polyunsaturated fatty acids, neuroinflammation and well being. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2010**, 82(4-6), 295-303
- Le Y, Iribarren P, Gong W, Cui Y, Zhang X, Wang JM. TGF- $\beta$ 1 disrupts endotoxin signaling in microglial cells through Smad3 and MAPK pathway. *J Immunol*. **2004**, 173, 962-68
- Lee M, Saver JL, Alger JR, Hao Q, Starkman S, Ali LK, Kim D, Ovbiagele B, Vespa PM, Froehler MT, Tenser MS, Salamon N, Villablanca JP, Jahan R, Duckwiler GR, Tateshima S, Gonzalez N, Vinuela F, Liebeskind DS. Blood-brain barrier permeability derangements in posterior circulation ischemic stroke: frequency and relation to hemorrhagic transformation. *J Neurol Sci*. **2012**, 313(1-2):142-6.
- Leybaert L. Neurobarrier coupling in the brain: a partner of neurovascular and neurometabolic coupling? *J Cereb Blood Flow Metab*. **2005**, 25(1):2-16.



- Li Q, Verma IM. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. **2002**, *2*, 725–734.
- Li Y, Lu W, Marzolo MP, Bu G. Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates. *J Biol Chem*. **2001**, *276*(21):18000–6.
- Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. The low density lipoprotein receptor-related protein 1: Unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev*. **2008**, *88*(3):887–918.
- Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem N Jr, Frautschy SA, Cole GM. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J Neurosci*. **2005**, *25*(12), 3032–3040.
- Lindstrom JM. Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves: comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology. *Ann N Y Acad Sci*. **2003**, 998:41–52.
- Lipinski CA. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J Pharmacol Toxicol Methods* **2000**, *44*(1):235–49.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. **2001**, *46*(1–3):3–26.
- Lipinski CA. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov Today Technol*. **2004**, *(4)*:337–41.
- Liu JK, Teng Q, Garrity-Moses M, Federici T, Tanase D, Imperiale MJ, Boulis NM. A novel peptide defined through phage display for therapeutic protein and vector neuronal targeting. *Neurobiol Dis*. **2005**, *19*(3):407–18.
- Liu PC, Liu X, Li Y, Covington M, Wynn R, Huber R, Hillman M, Yang G, Ellis D, Marando C, Katiyar K, Bradley J, Abremski K, Stow M, Rupar M, Zhuo J, Li YL, Lin Q, Burns D, Xu M, Zhang C, Qian DQ, He C, Sharief V, Weng L, Agrios C, Shi E, Metcalf B, Newton R, Friedman S, Yao W, Scherle P, Hollis G, Burn TC. Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain sheddase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biology and Therapy* **2006**, *5* (6): 657–664.
- Löscher W, Potschka H. Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx*. **2005**, *2*(1):86–98.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol*. **2006**, *147* Suppl 1: S232–S240.
- Lukiw WJ, Cui JG, Marcheselli VL, Bodker M, Botkjaer A, Gotlinger K, Serhan CN, Bazan NG. A role for docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 in neural cell survival and Alzheimer disease. *J Clin Invest*. **2005**, *115*:2774–2783
- Lund EG, Xie C, Kotti T, Turley SD, Dietschy JM, Russell DW. Knockout of the cholesterol 24-hydroxylase gene in mice reveals a brain-specific mechanism of cholesterol turnover. *J Biol Chem*. **2003**, *278*:22980–22988.
- Luo J, Lin AH, Masliah E, Wyss-Coray T. Bioluminescence imaging of Smad signaling in living mice shows correlation with excitotoxic neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* **2006**, *103*(48):18326–31.
- M**
- Macdonald JA, Murugesan N, Pachter JS. Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature. *J Neurosci Res*. **2010**, *88*(7):1457–74.
- Mahad DJ, Ransohoff RM. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol*. **2003**, *15* (1), 23–32.
- Maher F, Davies-Hill TM, Lysko PG, Henneberry RC, Simpson IA. Expression of two glucose transporters, GLUT1 and GLUT3, in cultured cerebellar neurons: Evidence for neuron-specific expression of GLUT3. *Mol Cell Neurosci*. **1991**, *2*(4):351–60.
- Maher F. Immunolocalization of GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in primary cultured neurons and glia. *J Neurosci Res*. **1995**, *42*(4):459–69.
- Malcor JD, Payrot N, David M, Faucon A, Abouzid K, Jacquot G, Floquet N, Debarbieux F, Rougon G, Martinez J, Khrestchatsky M, Vlieghe P, Lisowski V. Chemical optimization of new ligands of the low-density lipoprotein receptor as potential vectors for central nervous system targeting. *J Med Chem*. **2012**, *55*(5):2227–41.
- Maletínská L, Blakely EA, Bjornstad KA, Deen DF, Knoff LJ, Forte TM. Human glioblastoma cell lines: levels of low-density lipoprotein receptor and low-density lipoprotein receptor-related protein. *Cancer Res*. **2000**, *60*(8):2300–3.
- Malyukova I, Murray KF, Zhu C, Boedeker E, Kane A, Patterson K, Peterson JR, Donowitz M, Kovbasnjuk O. Macropinocytosis in Shiga toxin 1 uptake by human intestinal epithelial cells and transcellular transcytosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **2009**, *296*(1):G78–92.
- Martins IJ, Berger T, Sharman MJ, Verdile G, Fuller SJ, Martins RN. Cholesterol metabolism and transport in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. **2009**, *111*(6):1275–308.
- Maruvada P, Levine AE. Increased transforming growth factor- $\alpha$  levels in human colon carcinoma cell lines over-expressing protein kinase C. *Int J Cancer* **1999**, *80*(1):72–7.
- Masiulis I, Quill TA, Burk RF, Herz J. Differential functions of the Apoer2 intracellular domain in selenium uptake and cell signaling. *Biol Chem*. **2009**, *390*(1):67–73.
- Massague J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. **2005**, *19*, 2783–2810.
- Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinases: structures, evolution, and diversification. *FASEB J*. **1998**, *12*(12):1075–95.
- Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF- $\kappa$ B in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ*. **2006**, *13*(5):852–60.
- Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller EC, Otto A, Pfrieger FW. CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* **2001**, *294*(5545):1354–7.

- Mc Guire C, Prinz M, Beyaert R, van Loo G. Nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in multiple sclerosis pathology. *Trends Mol Med*. **2013**, 19(10):604-13.
- McGeer EG, McGeer PL. Brain inflammation in Alzheimer disease and the therapeutic implications. *Curr Pharm Des*. **1999**, 5(10):821-36.
- Meng Y, Sohar I, Sleat DE, Richardson JR, Reuhl KR, Jenkins RB, Sarkar G, Lobel P. Effective intravenous therapy for neurodegenerative disease with a therapeutic enzyme and a peptide that mediates delivery to the brain. *Mol Ther*. **2014**, 22(3):547-53.
- Meng YH, Tian C, Liu L, Wang L, Chang Q. Elevated expression of connective tissue growth factor, osteopontin and increased collagen content in human ascending thoracic aortic aneurysms. *Vascular* **2014**, 22(1):20-7.
- Méresse S, Delbart C, Fruchart JC, Cecchelli R. Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem*. **1989**, 53(2):340-5.
- Meyer J, Mischeck U, Veyhl M, Henzel K, Galla HJ. Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res*. **1990**, 514(2):305-9.
- Meyer-Losic F, Quinonero J, Dubois V, Alluis B, Dechambre M, Michel M, Cailler F, Fernandez AM, Trouet A, Kearsley J. Improved therapeutic efficacy of doxorubicin through conjugation with a novel peptide drug delivery technology (Vectocell). *J Med Chem*. **2006**, 49(23):6908-16.
- Michaelis K, Hoffmann MM, Dreis S, Herbert E, Alyautdin RN, Michaelis M, Kreuter J, Langer K. Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. *J Pharmacol Exp Ther*. **2006**, 317(3):1246-53.
- Migueluez M, Anisman H, Weber JM, Merali Z. Effects of acute or chronic omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid treatment on behavioral, neuroendocrine and cytokine changes elicited by exogenous interleukin-1beta challenge. *J Neuroimmunol*. **2006**, 181(1-2), 19-28.
- Miller DW, Keller BT, Borchardt RT. Identification and distribution of insulin receptors on cultured bovine brain microvessel endothelial cells: possible function in insulin processing in the blood-brain barrier. *J Cell Physiol*. **1994**, 161(2):333-41.
- Miller F, Fenart L, Landry V, Coisne C, Cecchelli R, Dehouck MP, Buée-Scherrer V. The MAP kinase pathway mediates transcytosis induced by TNF-alpha in an *in vitro* blood-brain barrier model. *Eur J Neurosci*. **2005**, 22 (4), 835-44.
- Mingam R, Moranis A, Bluthé RM, De Smedt-Peyrusse V, Kelley KW, Guesnet P, Lavielle M, Dantzer R, Layé S. Uncoupling of interleukin-6 from its signalling pathway by dietary n-3-polyunsaturated fatty acid deprivation alters sickness behaviour in mice. *Eur J Neurosci*. **2008**, 28(9), 1877-86
- Mitamura T, Higashiyama S, Taniguchi N, Klagsbrun M, Mekada E. Diphtheria toxin binds to the epidermal growth factor (EGF)-like domain of human heparin-binding EGF-like growth factor/diphtheria toxin receptor and inhibits specifically its mitogenic activity. *J Biol Chem* **1995**, 270 (3): 1015–1019.
- Mitchell RW, On NH, Del Bigio MR, Miller DW, Hatch GM. Fatty acid transport protein expression in human brain and potential role in fatty acid transport across human brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem*. **2011**, 117(4):735-46.
- Miyamoto S, Iwamoto R, Furuya A, Takahashi K, Sasaki Y, Ando H, Yotsumoto F, Yoneda T, Hamaoka M, Yagi H, Murakami T, Hori S, Shitara K, Mekada E. A novel anti-human HB-EGF monoclonal antibody with multiple antitumor mechanisms against ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res*. **2011**, 17: 6733–6741.
- Möckel B, Zinke H, Flach R, Weiss B, Weiler-Güttler H, Gassen HG. Expression of apolipoprotein A-I in porcine brain endothelium *in vitro*. *J Neurochem*. **1994**, 62(2):788-98.
- Moestrup SK, Gliemann J, Pallesen G. Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res*. **1992**, 269(3):375-82.
- Moore SA. Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells *in vitro*. *J Mol Neurosci*. **2001**, 16(2-3):195-200; discussion 215-21.
- Morgan L, Shah B, Rivers LE, Barden L, Groom AJ, Chung R, Higazi D, Desmond H, Smith T, Staddon JM. Inflammation and dephosphorylation of the tight junction protein occludin in an experimental model of multiple sclerosis. *Neuroscience*. **2007**, 147(3):664-73.
- Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol*. **1999**, 181(1):153-9.
- Murata M, Peränen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci. USA* **1995**, 92(22):10339-43.
- Murphy G, Crabbe T. Gelatinases A and B. *Methods Enzymol*. **1995**, 248:470–484.
- Murphy G, Willenbrock F. Tissue inhibitors of matrix metalloendopeptidases. *Methods Enzymol*. **1995**, 248:496–510.
- Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J*. **2002**, 16(2):240-2.

## N

- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*. **1997**, 378:151–160.
- Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoka R, Kataoka Y, Niwa M. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*. **2007**, 27(6):687-94.
- Nakazawa E, Ishikawa H. Ultrastructural observations of astrocyte end-feet in the rat central nervous system. *J Neurocytol*. **1998**, 27(6):431–40.
- Näthke IS, Heuser J, Lupas A, Stock J, Turck CW, Brodsky FM. Folding and trimerization of clathrin subunits at the triskelion hub. *Cell*. **1992**, 68(5):899-910.
- Nehlig A, Coles JA. Cellular pathways of energy metabolism in the brain: is glucose used by neurons or astrocytes? *Glia* **2007**, 55(12):1238-50.
- Nguyen LN, Ma D, Shui G, Wong P, Cazenave-Gassiot A, Zhang X, Wenk MR, Goh EL, Silver DL. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid. *Nature* **2014**, 509(7501):503-6.

Niewoehner J, Bohrmann B, Collin L, Urich E, Sade H, Maier P, Rueger P, Stracke JO, Lau W, Tissot AC, Loetscher H, Ghosh A, Freskgård PO. Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* **2014**, 81(1):49-60.

Nikanjam M, Gibbs AR, Hunt CA, Budinger TF, Forte TM. Synthetic nano-LDL with paclitaxel oleate as a targeted drug delivery vehicle for glioblastoma multiforme. *J Control Release* **2007**, 124(3):163-71.

## O

Oby E, Janigro D. The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia*. **2006**, 47(11):1761-74.

O'Kane RL, Martínez-López I, DeJoseph MR, Viña JR, Hawkins RA. Na(+)-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *J Biol Chem*. **1999**, 274(45):31891-5.

Okarvi SM. Peptide-based radiopharmaceuticals: future tools for diagnostic imaging of cancers and other diseases. *Med Res Rev*. **2004**, 24(3):357-97.

Oldendorf WH. Brain uptake of metabolites and drugs following carotid arterial injections. *Trans Am Neurol Assoc*. **1971**, 96:46-50.

Oldendorf WH, Cornford ME, Brown WJ. 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*. **1977**, 1(5):409-17.

Osono Y, Woollett LA, Herz J, Dietschy JM. Role of the low density lipoprotein receptor in the flux of cholesterol through the plasma and across the tissues of the mouse. *J Clin Invest*. **1995**, 95: 1124–1132.

Ouellet M, Emond V, Chen CT, Julien C, Bourasset F, Oddo S, LaFerla F, Bazinet RP, Calon F. Diffusion of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids through the blood-brain barrier: An in situ cerebral perfusion study. *Neurochem Int*. **2009**, 55(7):476-82.

Owen CA, Hu Z, Barrick B, Shapiro SD. Inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-resistant matrix metalloproteinase-9 on the cell surface of neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **2003**, 29(3 Pt 1):283-94.

Owens T, Babcock AA, Millward JM, Toft-Hansen H. Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS. *Brain Res Brain Res Rev*. **2005**, 48(2):178-84.

## P

Palade GE. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*. **1953**, 1(4):188-211.

Palmer AM. The role of the blood-CNS barrier in CNS disorders and their treatment. *Neurobiol Dis*. **2010**, 37(1):3–12.

Pan W, Kastin AJ. TNF- $\alpha$  transport across the blood-brain barrier is abolished in receptor knockout mice. *Exp Neurol*. **2002**, 174(2):193-200.

Pan W, Csernus B, Kastin AJ. Upregulation of p55 and p75 receptors mediating TNF-alpha transport across the injured blood-spinal cord barrier. *J Mol Neurosci*. **2003**;21(2):173-84.

Pan W, Kastin AJ, Zankl TC, van Kerkhof P, Terasaki T, Bu G. Efficient transfer of receptor-associated protein (RAP) across the blood-brain barrier. *J Cell Sci*. **2004**, 117(Pt 21):5071-8.

Panzenboeck U, Balazs Z, Sovic A, Hrzenjak A, Levak-Frank S, Wintersperger A, Malle E, Sattler W. ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an *in vitro* blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. *J Biol Chem*. **2002**, 277(45):42781-9.

Pardridge WM. Receptor-mediated peptide transport through the blood-brain barrier. *Endocr Rev*. **1986**, 7(3):314-30.

Pardridge WM, Eisenberg J, Yang J. Human blood-brain barrier transferrin receptor. *Metabolism* **1987**, 36(9):892-5.

Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem*. **1990**, 265(29):18035-40.

Pardridge WM, Buciak JL, Friden PM. Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier *in vivo*. *J Pharmacol Exp Ther*. **1991**, 259 (1), 66-70.

Pardridge WM. Vector-mediated drug delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev* **1999**, 36 (2-3), 299-321.

Pardridge WM. Crossing the blood-brain barrier: are we getting it right? *Drug Discov Today* **2001**, 6(1):1-2.

Pardridge WM. Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov*. **2002**, 1(2):131-9.

Pardridge WM. Blood-brain barrier drug targeting: The future of brain drug development. *Mol Interv*. **2003**, 3(2):90–105, 51.

Pardridge WM. Drug targeting to the brain. *Pharm Res*. **2007**, 24(9):1733–44.

Pardridge WM, Boado RJ. Reengineering biopharmaceuticals for targeted delivery across the blood-brain barrier. *Methods Enzymol*. **2012**, 503:269-92.

Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. **2012**, 32(11):1959-72.

Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2007**, 8(3):185-94.

Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, 91(22):10625-9.

Perry MM, Gilbert AB. Yolk transport in the ovarian follicle of the hen (*Gallus domesticus*): lipoprotein-like particles at the periphery of the oocyte in the rapid growth phase. *J Cell Sci*. **1979**, 39:257-72.

Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*. **2006**, 1:223-36.

- Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol.* **2004**, 22:929-79.
- Petry KG, Boiziau C, Dousset V, Brochet B. Magnetic resonance imaging of human brain macrophage infiltration. *Neurotherapeutics.* **2007**, 4(3):434-42.
- Petry KG, Brochet B, Dousset V, Vignes JR, Boiziau C. Inflammation induced neurological handicap processes in multiple sclerosis: new insights from preclinical studies. *J Neural Transm (Vienna).* **2010**, 117(8):907-17.
- Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol.* **2002**, 68 (5), 311-23.
- Petty MA, Wettstein JG. Elements of cerebral microvascular ischaemia. *Brain Res Brain Res Rev.* **2001**, 36(1):23-34.
- Pifferi F, Roux F, Langelier B, Alessandri JM, Vancassel S, Jouin M, Lavialle M, Guesnet P. N-3 polyunsaturated fatty acid deficiency reduced expression of both isoforms of the brain glucose transporter GLUT1 in rats. *J Nutr.* **2005**, 135, 2241-46.
- Pinzón-Daza M, Garzón R, Couraud P, Romero Ia, Weksler B, Ghigo D, Bosia A, Riganti C. The association of statins plus LDL receptor-targeted liposome-encapsulated doxorubicin increases *in vitro* drug delivery across blood-brain barrier cells. *Br J Pharmacol.* **2012**, 167(7):1431-47.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B,E (LDL) receptors in the brain. *J Biol Chem.* **1987**, 262(29):14352-60.
- Plotkin SR, Banks WA, Maness LM, Kastin AJ. Differential transport of rat and human interleukin-1alpha across the blood-brain barrier and blood-testis barrier in rats. *Brain Res.* **2000**, 881(1):57-61.
- Predescu SA, Predescu DN, Malik AB. Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* **2007**, 293(4):L823-42.
- Prince WS, McCormick LM, Wendt DJ, Fitzpatrick PA, Schwartz KL, Aguilera AI, Koppaka V, Christianson TM, Vellard MC, Pavloff N, Lemontt JF, Qin M, Starr CM, Bu G, Zankel TC. Lipoprotein receptor binding, cellular uptake, and lysosomal delivery of fusions between the receptor-associated protein (RAP) and alpha-L-iduronidase or acid alpha-glucosidase. *J Biol Chem.* **2004**, 279(33):35037-46.
- Prockop LD, Naidu KA, Binard JE, Ransohoff J. Selective permeability of [3H]-D-mannitol and [14C]-carboxyl-inulin across the blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in the rabbit. *J Spinal Cord Med.* **1995**, 18(4):221-6.
- Py N, Bonnet A, Bernard A, Marchalant Y, Charrat E, Checler F, Khrestchatsky M, Baranger K, Rivera S. Differential spatio-temporal regulation of MMPs in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease: evidence for a pro-amyloidogenic role of MT1-MMP. *Front Aging Neurosci.* **2014**, 6:247.
- R**
- Raab G, Klagsbrun, M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochim Biophys Acta* **1997**, 1333 (3): F179–199.
- Radu BM, Bramanti P, Osculati F, Flonta ML, Radu M, Bertini G, Fabene PF. Neurovascular unit in chronic pain. *Mediators Inflamm.* **2013**, 2013:648268.
- Ragnarsson EG, Schoultz I, Gullberg E, Carlsson AH, Tafazolli F, Lerm M, Magnusson KE, Söderholm JD, Artursson P. Yersinia pseudotuberculosis induces transcytosis of nanoparticles across human intestinal villus epithelium via invasin-dependent macropinocytosis. *Lab Invest.* **2008**, 88(11):1215-26.
- Ramirez AM, Takagawa S, Sekosan M, Jaffe HA, Varga J, Roman J. Smad3 deficiency ameliorates experimental obliterative bronchiolitis in a heterotopic tracheal transplantation model. *Am J Pathol.* **2004**, 165:1223-32.
- Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R. Angiogenesis of the blood-brain barrier *in vitro* and the function of cerebral pericytes. *FASEB J.* **2002**, 16(10):1274-6.
- Rapoport SI, Chang MC, Spector AA. Delivery and turnover of plasma-derived essential PUFAs in mammalian brain. *J Lipid Res.* **2001**, 42(5):678-85.
- Raub TJ, Newton CR. Recycling kinetics and transcytosis of transferrin in primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells. *J Cell Physiol.* **1991**, 149(1):141-51.
- Re F, Cambianica I, Zona C, Sesana S, Gregori M, Rigolio R, La Ferla B, Nicotra F, Forloni G, Cagnotto A, Salmona M, Masserini M, Sancini G. Functionalization of liposomes with ApoE-derived peptides at different density affects cellular uptake and drug transport across a blood-brain barrier model. *Nanomedicine* **2011**, 7(5):551-9.
- Redzic Z. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS* **2011**, 8(1):3.
- Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a bloodbrain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* **1967**, 34, 207-217.
- Regina A, Demeule M, Che C, Lavalée I, Poirier J, Gabathuler R, Beliveau R, Castaigne JP. Antitumour activity of ANG1005, a conjugate between paclitaxel and the new brain delivery vector Angiopep-2. *Br J Pharmacol.* **2008**, 155(2):185–97.
- Regina A, Demeule M, Tripathy S, Lord-Dufour S, Currie JC, Iddir M, Annabi B, Castaigne JP, Lachowicz JE. ANG4043, a Novel Brain-Penetrant Peptide-mAb Conjugate, Is Efficacious against HER2-Positive Intracranial Tumors in Mice. *Mol Cancer Ther.* **2014**.
- Rip J, Chen L, Hartman R, van den Heuvel A, Reijerkerk A, van Kregten J, van der Boom B, Appeldoorn C, de Boer M, Maussang D, de Lange EC, Gaillard PJ. Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood-brain barrier in rats. *J Drug Target* **2014**, 22(5):460-7.
- Risau W, Hallmann R, Albrecht U. Differentiation-dependent expression of proteins in brain endothelium during development of the blood-brain barrier. *Dev Biol.* **1986**, 117(2):537-45.
- Rivera S, Khrestchatsky M, Kaczmarek L, Rosenberg GA, Jaworski DM. Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci.* **2010**, 30(46):15337-57.
- Roberts RL, Fine RE, Sandra A. Receptor-mediated endocytosis of transferrin at the blood-brain barrier. *J Cell Sci.* **1993**, 104 (Pt 2):521-32.
- Robinson MS. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* **1994**, 6(4):538-44.

- Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. **1997**, 90(3):909-28.
- Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N, Reiners M, Ford CC: Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology* **1996**, 46:1626-32.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* **1992**, 68(4):673-82.
- Rothemberger S, Food MR, Gabathuler R, Kennard ML, Yamada T, Yasuhara O, McGeer PL, Jefferies WA. Coincident expression and distribution of melanotransferrin and transferrin receptor in human brain capillary endothelium. *Brain Res*. **1996**, 712(1):117-21.
- Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci*. **2000**, 23(12):618-25.
- Roux F, Couraud PO. Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. *Cell Mol Neurobiol*. **2005**, 25(1):41-58.
- Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci*. **1999**, 22: 11-28.
- Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, Janatpour M, Liaw CW, Manning K, Morales J. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol*. **1991**, 115(6):1725-1735.
- Rudenko G, Henry L, Henderson K, Ichtchenko K, Brown MS, Goldstein JL, Deisenhofer J. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* **2002**, 298(5602):2353-8.
- ## S
- Sade H, Baumgartner C, Hugenmatter A, Moessner E, Freskgård PO, Niewoehner J. A human blood-brain barrier transcytosis assay reveals antibody transcytosis influenced by pH-dependent receptor binding. *PLoS One* **2014**, 9(4):e96340.
- Sagare AP, Deane R, Zlokovic BV. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1: a physiological A $\beta$  homeostatic mechanism with multiple therapeutic opportunities. *Pharmacol Ther*. **2012**, 136(1):94-105.
- Saito A, Pietromonaco S, Loo AK, Farquhar MG. Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci. USA* **1994**, 91:9725-9729.
- Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol*. **1997**, 137(6):1393-401.
- Sarkar G, Curran GL, Mahlum E, Decklever T, Wengenack TM, Blahnik A, Hoesley B, Lowe VJ, Poduslo JF, Jenkins RB. A carrier for non-covalent delivery of functional beta-galactosidase and antibodies against amyloid plaques and IgM to the brain. *PLoS One* **2011**, 6(12):e28881.
- Sattler W, Levak-Frank S, Radner H, Kostner GM, Zechner R. Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase in transgenic mice results in increased alpha-tocopherol levels in skeletal muscle. *Biochem J*. **1996**, 318 ( Pt 1):15-9.
- Savarin-Vuillaud C, Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors in neurological disease: raise, retain, or reduce? *Neurotherapeutics*. **2007**, 4(4):590-601.
- Schiera G, Sala S, Gallo A, Raffa MP, Pitarresi GL, Savettieri G, Di Liegro I. Permeability properties of a three-cell type in vitro model of blood-brain barrier. *J Cell Mol Med*. **2005**, 9(2):373-9.
- Schindowski K, Belarbi K, Buée L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. *Genes Brain Behav*. **2008**, 7 Suppl 1:43-56.
- Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol*. **1994**, 127(5):1217-32.
- Schnitzer JE. Caveolae: from basic trafficking mechanisms to targeting transcytosis for tissue-specific drug and gene delivery *in vivo*. *Adv Drug Deliv Rev*. **2001**, 49(3):265-80.
- Sedlakova R, Shivers RR, Del Maestro RF. Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J Submicrosc Cytol Pathol*. **1999**, 31(1):149-61.
- Seelig A. The role of size and charge for blood-brain barrier permeation of drugs and fatty acids. *J Mol Neurosci*. **2007**, 33(1):32-41.
- Seo JH, Maki T, Maeda M, Miyamoto N, Liang AC, Hayakawa K, Pham LD, Suwa F, Taguchi A, Matsuyama T, Ihara M, Kim KW, Lo EH, Arai K. Oligodendrocyte precursor cells support blood-brain barrier integrity via TGF- $\beta$  signaling. *PLoS One* **2014**, 9(7):e103174.
- Serrano ID, Ribeiro MM, Castanho MA. A focus on glucose-mediated drug delivery to the central nervous system. *Mini Rev Med Chem*. **2012**, 12(4):301-12.
- Shamenkov DA, Petrov VE, Alyautdin RN. Effects of apolipoproteins on dalargin transport across the blood-brain barrier. *Bull Exp Biol Med*. **2006**, 142(6):703-6.
- Shawahna R, Declèves X, Scherrmann JM. Hurdles with using *in vitro* models to predict human blood-brain barrier drug permeability: a special focus on transporters and metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab*. **2013**, 14(1), 120-36.
- Shepro D, Morel NM. Pericyte physiology. *FASEB J*. **1993**, 7(11):1031-8.
- Shi N, Boado RJ, Pardridge WM. Receptor-mediated gene targeting to tissues *in vivo* following intravenous administration of pegylated immunoliposomes. *Pharm Res*. **2001a**, 18(8):1091-5.
- Shi X, Bai S, Li L, Cao X. Hoxa-9 represses transforming growth factor-beta-induced osteopontin gene transcription. *J Biol Chem*. **2001b**, 276(1):850-5.
- Silverman GA, Whisstock JC, Bottomley SP, Huntington JA, Kaiserman D, Luke CJ, Pak SC, Reichhart JM, Bird PI. Serpins Flex Their Muscle: I. Putting the clamps on proteolysis in diverse biological systems. *J Biol Chem*. **2010**, 285 (32): 24299-305.

Silwedel C, Förster C. Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli. *J Neuroimmunol.* **2006**, 179(1-2):37-45.

Simionescu M, Popov D, Sima A. Endothelial transcytosis in health and disease. *Cell Tissue Res.* **2009**, 335(1):27-40.

Sinha K, Box M, Lalli G, Schiavo G, Schneider H, Groves M, Siligardi G, Fairweather N. Analysis of mutants of tetanus toxin Hc fragment: ganglioside binding, cell binding and retrograde axonal transport properties. *Mol Microbiol.* **2000**, 37(5):1041-51.

Skarlatos S, Yoshikawa T, Pardridge WM. Transport of [125I]transferrin through the rat blood-brain barrier. *Brain Res.* **1995**, 683(2):164-71.

Son S, Hwang do W, Singha K, Jeong JH, Park TG, Lee DS, Kim WJ. RVG peptide tethered bioreducible polyethylenimine for gene delivery to brain. *J Control Release* **2011**, 155(1):18-25.

Song L, Ge S, Pachter JS. Caveolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood* **2007**, 109(4):1515-23.

Sorani MD, Zador Z, Hurowitz E, Yan D, Giacomini KM, Manley GT. Novel variants in human Aquaporin-4 reduce cellular water permeability. *Hum Mol Genet.* **2008**, 17(15):2379-89.

Sorrentino NC, D'Orsi L, Sambri I, Nusco E, Monaco C, Spampinato C, Polishchuk E, Saccone P, De Leonibus E, Ballabio A, Fraldi A. A highly secreted sulphamidase engineered to cross the blood-brain barrier corrects brain lesions of mice with mucopolysaccharidosis type IIIA. *EMBO Mol Med.* **2013**, 5(5):675-90.

Sovic A, Panzenboeck U, Wintersperger A, Kratzer I, Hammer A, Levak-Frank S, Frank S, Rader DJ, Malle E, Sattler W. Regulated expression of endothelial lipase by porcine brain capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier. *J Neurochem.* **2005**, 94(1):109-19.

Spector R. Fatty acid transport through the blood-brain barrier. *J Neurochem.* **1988**, 50(2):639-43.

Spencer BJ, Verma IM. Targeted delivery of proteins across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci. USA* **2007**, 104(18):7594-9.

Spencer BJ, Marr RA, Gindi R, Potkar R, Michael S, Adame A, Rockenstein E, Verma IM, Masliah E. Peripheral delivery of a CNS targeted, metallo-protease reduces A $\beta$  toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* **2011**, 6(1):e16575.

Spencer BJ, Verma IM, Desplats P, Morvinski D, Rockenstein E, Adame A, Masliah E. A neuroprotective brain-penetrating endopeptidase fusion protein ameliorates Alzheimer disease pathology and restores neurogenesis. *J Biol Chem.* **2014**, 289(25):17917-31.

Spuch C, Ortolano S, Navarro C. LRP-1 and LRP-2 receptors function in the membrane neuron. Trafficking mechanisms and proteolytic processing in Alzheimer's disease. *Front Physiol.* **2012**, 3:269.

Stamatovic SM, Shakuji P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2005**, 25 (5), 593-606.

Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. Brain endothelial cell-cell junctions: how to 'open' the blood brain barrier. *Curr Neuropharmacol.* **2008**, 6 (3), 179-92.

Stanimirovic D, Kemmerich K, Haqqani AS, Farrington GK. Engineering and pharmacology of blood-brain barrier-permeable bispecific antibodies. *Adv Pharmacol.* **2014**, 71:301-35.

Stenehjem DD, Hartz AM, Bauer B, Anderson GW. Novel and emerging strategies in drug delivery for overcoming the blood-brain barrier. *Future Med Chem.* **2009**, 1(9):1623-41.

Stephan D, Sbai O, Wen J, Couraud PO, Putterman C, Khrestchatsky M, Desplat-Jégo S. TWEAK/Fn14 pathway modulates properties of a human microvascular endothelial cell model of blood brain barrier. *J Neuroinflammation* **2013**, 10 (9).

Stern LS, Gautier R. Les rapports entre le liquide céphalo-rachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal. *Arch Inter Physiol.* **1922**, 17, 391-488.

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol.* **1986**, 103(3):755-66.

Stewart PA, Wiley MJ. Structural and histochemical features of the avian blood-brain barrier. *J Comp Neurol.* **1981**, 202(2):157-67.

Stewart PA. Endothelial vesicles in the blood-brain barrier: are they related to permeability? *Cell Mol Neurobiol.* **2000**, 20(2):149-63.

Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Mol Pharm.* **2013**, 10(5):1473-91.

Sumbria RK, Zhou QH, Hui EK, Lu JZ, Boado RJ, Pardridge WM. Pharmacokinetics and brain uptake of an IgG-TNF decoy receptor fusion protein following intravenous, intraperitoneal, and subcutaneous administration in mice. *Mol Pharm.* **2013**, 10(4):1425-31.

Sun LP, Seemann J, Goldstein JL, Brown MS. Sterol-regulated transport of SREBPs from endoplasmic reticulum to Golgi: Insig renders sorting signal in Scap inaccessible to COPII proteins. *Proc Natl Acad Sci. USA* **2007**, 104(16):6519-26.

Suominen-Taipale AL, Partonen T, Turunen AW, Männistö S, Jula A, Verkasalo PK. Fish consumption and omega-3 polyunsaturated fatty acids in relation to depressive episodes: a cross-sectional analysis. *PLoS One* **2010**, 5(5):e10530.

Suzuki T, Ishii-Watabe A, Tada M, Kobayashi T, Kanayasu-Toyoda T, Kawanishi T, Yamaguchi T. Importance of neonatal FcR in regulating the serum half-life of therapeutic proteins containing the Fc domain of human IgG1: a comparative study of the affinity of monoclonal antibodies and Fc-fusion proteins to human neonatal FcR. *J Immunol.* **2010**, 184(4):1968-76.

Szelenyi J. Cytokines and the central nervous system. *Brain Res Bull.* **2001**, 54(4):329-38.

T

Tagami M, Nara Y, Kubota A, Fujino H, Yamori Y. Ultrastructural changes in cerebral pericytes and astrocytes of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Stroke* **1990**, 21(7):1064-71.

Takemura M, Nishiyama H, Itohara S. Distribution of phosphorylated glial fibrillary acidic protein in the mouse central nervous system. *Genes Cells* **2002**, 7(3):295-307.

Tamaru M, Akita H, Fujiwara T, Kajimoto K, Harashima H. Leptin-derived peptide, a targeting ligand for mouse brain-derived endothelial cells via macropinocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, 394(3):587-92.

Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP. Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem*. **1996**, 271(4):2255-61.

Tansey MG, Szymkowski DE. The TNF superfamily: new pathways, new indications, and new drugs. *Drug Discov Today*. **2009**; 14:1082–1088.

Tarkowski E, Andreassen N, Tarkowski A, Blennow K. Intrathecal inflammation precedes development of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **2003**, 74(9):1200-5.

Tchetina EV, Antoniou J, Tanzer M, Zukor DJ, Poole AR. Transforming growth factor-beta2 suppresses collagen cleavage in cultured human osteoarthritic cartilage, reduces expression of genes associated with chondrocyte hypertrophy and degradation, and increases prostaglandin E(2) production. *Am J Pathol*. **2006**, 168(1):131-40.

Temsamani J, Vidal P. The use of cell-penetrating peptides for drug delivery. *Drug Discov Today* **2004**, 9(23):1012-9.

ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*. **2004**, 29(5):265-73.

Tesseur I, Zou K, Esposito L, Bard F, Berber E, Can JV, Lin AH, Crews L, Tremblay P, Mathews P, Mucke L, Masliah E, Wyss-Coray T. Deficiency in neuronal TGF-beta signaling promotes neurodegeneration and Alzheimer's pathology. *J Clin Invest*. **2006**, 116(11):3060-9.

Tilling T, Korte D, Hoheisel D, and Galla HJ. Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function *in vitro*. *J Neurochem*. **1998**, 71, 1151-1157.

Tourdias T, Mori N, Dragonu I, Cassagno N, Boiziau C, Aussudre J, Brochet B, Moonen C, Petry KG, Dousset V. Differential aquaporin 4 expression during edema build-up and resolution phases of brain inflammation. *J Neuroinflammation*. **2011**, 8:143.

Townsend SA, Evrony GD, Gu FX, Schulz MP, Brown RH Jr, Langer R. Tetanus toxin C fragment-conjugated nanoparticles for targeted drug delivery to neurons. *Biomaterials* **2007**, 28(34):5176-84.

Townson DH, Liptak AR. Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis. *Reprod Biol Endocrinol*. **2003**, 1:94.

Trickler WJ, Mayhan WG, Miller DW. Brain microvessel endothelial cell responses to tumor necrosis factor-alpha involve a nuclear factor kappa B (NF-kappaB) signal transduction pathway. *Brain Res*. **2005**, 1048(1-2):24-31.

Trigatti B, Rigotti A, Krieger M. The role of the high-density lipoprotein receptor SR-BI in cholesterol metabolism. *Curr Opin Lipidol*. **2000**, 11(2):123-31.

Trivedi CM, Patel RC, Patel CV. Homeobox gene HOXA9 inhibits nuclear factor-kappa B dependent activation of endothelium. *Atherosclerosis* **2007**, 195(2):e50-60.

Trysberg E, Blennow K, Zachrisson O, Tarkowski A. Intrathecal levels of matrix metalloproteinases in systemic lupus erythematosus with central nervous system engagement. *Arthritis Res Ther*. **2004**, 6(6):R551-6. Epub 2004 Sep 23.

Tsou R, Isik FF. Integrin activation is required for VEGF and FGF receptor protein presence on human microvascular endothelial cells. *Mol Cell Biochem* **2001**, 224 (1-2): 81-9.

Tsujioka H, Fukami T, Yotsumoto F, Ueda T, Hikita S, Takahashi Y, Kondo H, Kuroki M, Miyamoto S. A possible clinical adaptation of CRM197 in combination with conventional chemotherapeutic agents for ovarian cancer. *Anticancer Res* **2011**, 31: 2461–65.

Tuma PL, Hubbard AL. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiological Reviews* **2003**, 83(3):871-932.

## U

Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, Kamiie J, Terasaki T. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem*. **2011**, 117(2):333-45.

Ueda F, Raja KB, Simpson RJ, Trowbridge IS, Bradbury MW. Rate of 59Fe uptake into brain and cerebrospinal fluid and the influence thereon of antibodies against the transferrin receptor. *J Neurochem*. **1993**, 60(1):106-13.

Ueno M, Wu B, Nakagawa T, Nagai Y, Onodera M, Huang CL, Kusaka T, Kanenishi K, Sakamoto H. The expression of LDL receptor in vessels with blood-brain barrier impairment in a stroke-prone hypertensive model. *Histochem Cell Biol*. **2010**, 133(6):669-76.

Unsicker K, Kriegstein K. TGF-betas and their roles in the regulation of neuron survival. *Adv Exp Med Biol*. **2002**, 513:353-74.

Urich E, Lasic SE, Molnos J, Wells I, Freskgård P. Transcriptional Profiling of Human Brain Endothelial Cells Reveals Key Properties Crucial for Predictive *In vitro* Blood-Brain Barrier Models. *PLoS one* **2012**, 7(5).

## V

Valenza M, Leoni V, Karasinska JM, Petricca L, Fan J, Carroll J, Pouladi MA, Fossale E, Nguyen HP, Riess O, MacDonald M, Wellington C, DiDonato S, Hayden M, Cattaneo E. Cholesterol defect is marked across multiple rodent models of Huntington's disease and is manifest in astrocytes. *J Neurosci*. **2010**, 30(32):10844-50.

Vance JE. Dysregulation of cholesterol balance in the brain: contribution to neurodegenerative diseases. *Dis Model Mech*. **2012**, 5(6):746-55.

Vermeulen L, Wilde GD, Damme PV, Berghe WV, Haegeman G. Transcriptional activation of the NF-kB p65 subunit by MSK1. *EMBO J*. **2003**, 22, 1313–24

- Versluis AJ, Rensen PC, Rump ET, Van Berkel TJ, Bijsterbosch MK. Low-density lipoprotein receptor-mediated delivery of a lipophilic daunorubicin derivative to B16 tumours in mice using apolipoprotein E-enriched liposomes. *Br J Cancer* **1998**, 78(12):1607-14.
- Vestweber D, Winderlich M, Cagna G, Nottebaum AF. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol.* **2009**, 19(1):8-15.
- Vineros SA. Assessment of blood–retinal barrier integrity. *Histology and histopathology* **1995**, 10 (1): 141–54.
- Virgintino D, Robertson D, Errede M, Benagiano V, Tauer U, Roncali L, Bertossi M. Expression of caveolin-1 in human brain microvessels. *Neuroscience* **2002**, 115(1):145-52.
- Virkkunen M, Penttinen H. Serum cholesterol in aggressive conduct disorder: a preliminary study. *Biol Psychiatry* **1984**, 19:435–439.
- Vlieghe P, Khrestchatsky M. Medicinal chemistry based approaches and nanotechnology-based systems to improve CNS drug targeting and delivery. *Med Res Rev.* **2013**, 33(3):457-516.
- Vlieghe P, Khrestchatsky M. Peptide-based vectors for blood-brain barrier targeting and delivery of drugs to the central nervous system. *Ther Deliv.* **2010**, 1(4):489-94.
- Vlieghe P, Lisowski V, Martinez J, Khrestchatsky M. Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discov Today* **2010**, 15(1-2):40-56.
- Vlodavsky I, Fielding PE, Fielding CJ, Gospodarowicz D. Role of contact inhibition in the regulation of receptor-mediated uptake of low density lipoprotein in cultured vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* **1978**, 75(1):356-60.
- Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* **2005**, 6(8):626-40.
- W**
- Wagner S, Zensi A, Wien SL, Tschickardt SE, Maier W, Vogel T, Worek F, Pietrzik CU, Kreuter J, von Briesen H. Uptake mechanism of ApoE-modified nanoparticles on brain capillary endothelial cells as a blood-brain barrier model. *PLoS One* **2012**, 7(3):e32568.
- Wang D, El-Amouri SS, Dai M, Kuan CY, Hui DY, Brady RO, Pan D. Engineering a lysosomal enzyme with a derivative of receptor-binding domain of apoE enables delivery across the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci. USA* **2013**, 110(8):2999-3004.
- Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, Baldwin Jr AS. TNF- $\alpha$ -induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II. *J Biol Chem.* **2000**, 275, 32592–32597
- Wang N, Arai T, Ji Y, Rinninger F, Tall AR. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J Biol Chem.* **1998**, 273(49):32920-6.
- Watts RJ, Dennis MS. Bispecific antibodies for delivery into the brain. *Curr Opin Chem Biol.* **2013**, 17(3):393-9.
- Webb NR, de Beer MC, Yu J, Kindy MS, Daugherty A, van der Westhuyzen DR, de Beer FC. Overexpression of SR-BI by adenoviral vector promotes clearance of apoA-I, but not apoB, in human apoB transgenic mice. *J Lipid Res.* **2002**, 43(9):1421-8.
- Wei X, Zhan C, Shen Q, Fu W, Xie C, Gao J, Peng C, Zheng P, Lu W. A d-Peptide ligand of nicotine acetylcholine receptors for brain-targeted drug delivery. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2015**, 54(10):3023-7.
- Weidenfeller C, Svendsen CN, Shusta EV. Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J Neurochem.* **2007**, 101(2):555-65.
- Weinstein M, Yang X, Deng C. Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2000**, 11(1-2):49-58.
- Whisstock JC, Silverman GA, Bird PI, Bottomley SP, Kaiserman D, Luke CJ, Pak SC, Reichhart JM, Huntington JA. Serpins Flex Their Muscle: II. Structural insights into target peptidase recognition, polymerization and transport functions. *J Biol Chem.* **2010**, 285 (32): 24307–12.
- Whitton PS. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br J Pharmacol.* **2007**, 150(8):963-76.
- Wilhelmus MM, Otte-Höller I, van Triel JJ, Veerhuis R, Maat-Schieman ML, Bu G, de Waal RM, Verbeek MM. Lipoprotein receptor-related protein-1 mediates amyloid-beta-mediated cell death of cerebrovascular cells. *Am J Pathol.* **2007**, 171(6):1989-99.
- Williard DE, Harmon SD, Kaduce TL, Preuss M, Moore SA, Robbins ME, Spector AA. Docosahexaenoic acid synthesis from n-3 polyunsaturated fatty acids in differentiated rat brain astrocytes. *J Lipid Res.* **2001**, 42(9):1368-76.
- Wilsie LC, Chanchani S, Navaratna D, Orlando RA. Cell surface heparan sulfate proteoglycans contribute to intracellular lipid accumulation in adipocytes. *Lipids Health Dis.* **2005** 6;4:2.
- Winkler EA, Sengillo JD, Bell RD, Wang J, Zlokovic BV. Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* **2012**, 32(10):1841-52.
- Wolburg H, Liebner S, Lippoldt A. Freeze-fracture studies of cerebral endothelial tight junctions. *Methods Mol Med.* **2003**, 89:51-66.
- Wolburg H, Noell S, Mack A, Wolburg-Buchholz K, Fallier-Becker P. Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. *Cell Tissue Res.* **2009**, 335(1):75-96.
- Wolff JR, Bär T. 'Seamless' endothelia in brain capillaries during development of the rat's cerebral cortex. *Brain Res.* **1972**, 41(1):17-24.
- Wolfsberg TG, Straight PD, Gerena RL, Huovila AP, Primakoff P, Myles DG, White JM. ADAM, a widely distributed and developmentally regulated gene family encoding membrane proteins with a disintegrin and metalloprotease domain. *Dev Biol.* **1995**. 169 (1): 378–383.
- Woollett LA. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. *Am J Clin Nutr.* **2005**, 82: 1155-1161.



Wright EM, Loo DD, Hirayama BA. Biology of human sodium glucose transporters. *Physiol Rev.* **2011**, 91(2):733-94.

Wu LJ, Leenders AG, Cooperman S, Meyron-Holtz E, Smith S, Land W, Tsai RY, Berger UV, Sheng ZH, Rouault TA. Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res.* **2004**, 1001(1-2):108-17.

Wu Q, Jing Y, Yuan X, Li B, Wang B, Liu M, Li H, Xiu R. The distinct abilities of tube-formation and migration between brain and spinal cord microvascular pericytes in rats. *Clin Hemorheol Microcirc.* **2015**, 60(2):231-40.

## Y

Yamamoto T, Davis CG, Brown MS, Schneider WJ, Casey ML, Goldstein JL, Russell DW. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple Alu sequences in its mRNA. *Cell* **1984**, 39(1):27-38.

Yamashita T, Abe K. Therapeutic approaches to vascular protection in ischemic stroke. *Acta Med Okayama* **2011**, 65(4):219-23.

Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. 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.* **2007** 27(4):697-709.

Yao Y, Tsirka SE: Truncation of monocyte chemoattractant protein 1 by plasmin promotes blood-brain barrier disruption. *Journal of cell science* **2011**, 124:1486–95.

Yu C, Kastin AJ, Tu H, Waters S, Pan W. TNF activates P-glycoprotein in cerebral microvascular endothelial cells. *Cell Physiol Biochem.* **2007**, 20(6) 853–858.

Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, Hoyte K, Luk W, Lu Y, Atwal J, Elliott JM, Prabhu S, Watts RJ, Dennis MS. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target. *Sci Transl Med.* **2011**, 3(84):84ra44.

## Z

Zach O, Bauer HC, Richter K, Webersinke G, Tontsch S, Bauer H. Expression of a chemotactic cytokine (MCP-1) in cerebral capillary endothelial cells *in vitro*. *Endothelium* **1997**;5(3):143-53.

Zensi A, Begley D, Pontikis C, Legros C, Mihoreanu L, Büchel C, Kreuter J. Human serum albumin nanoparticles modified with apolipoprotein A-I cross the blood-brain barrier and enter the rodent brain. *J Drug Target.* **2010**, 18(10):842-8.

Zensi A, Begley D, Pontikis C, Legros C, Mihoreanu L, Wagner S, Büchel C, von Briesen H, Kreuter J. Albumin nanoparticles targeted with Apo E enter the CNS by transcytosis and are delivered to neurones. *J Control Release* **2009**, 137(1):78-86.

Zhan C, Yan Z, Xie C, Lu W. Loop 2 of Ophiophagus hannah toxin b binds with neuronal nicotinic acetylcholine receptors and enhances intracranial drug delivery. *Mol Pharm.* **2010**, 7(6):1940-7.

Zhan C, Li B, Hu L, Wei X, Feng L, Fu W, Lu W. Micelle-based brain-targeted drug delivery enabled by a nicotine acetylcholine receptor ligand. *Angew Chem Int Ed Engl.* **2011**, 50(24):5482-5.

Zhang B, Gensel JC. Is neuroinflammation in the injured spinal cord different than in the brain? Examining intrinsic differences between the brain and spinal cord. *Exp Neurol.* **2014**, 258:112-20.

Zhao B, Chen YG. Regulation of TGF- $\beta$  Signal Transduction. *Scientifica (Cairo)* **2014**, 2014:874065.

Zhao YL, Song JN, Zhang M. Role of caveolin-1 in the biology of the blood-brain barrier. *Rev Neurosci.* **2014**, 25(2):247-54.

Zhong YJ, Shao LH, Li Y. Cathepsin B-cleavable doxorubicin prodrugs for targeted cancer therapy (Review). *Int J Oncol.* **2013**, 42(2):373-83.

Zlokovic BV, Mackic JB, McComb JG, Weiss MH, Kaplowitz N, Kannan R. Evidence for transcapillary transport of reduced glutathione in vascular perfused guinea-pig brain. *Biochem Biophys Res Commun* **1994**, 201(1):402-8.

Zlokovic BV, Jovanovic S, Miao W, Samara S, Verma S, Farrell CL. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology.* **2000**, 141(4):1434-41.

Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **2008**, 57(2):178-201.

Zozulya A, Weidenfeller C, Galla HJ. Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier *in vitro*. *Brain Res.* **2008**, 1189:1-11.

