

Université de Montréal

Développement d'un modèle *in vitro* de la
barrière hémato-encéphalique

par Ina Puscas

Axe Formulation et Analyse du Médicament
Faculté de Pharmacie

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en Sciences Pharmaceutiques
option Technologies pharmaceutiques

Avril, 2019

© **Ina Puscas, 2019**

Résumé

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une structure retrouvée au niveau des capillaires cérébraux. Elle représente un véritable obstacle pour les actifs qui doivent se rendre au cerveau pour y exercer un effet pharmacologique.

Durant les étapes du développement du médicament, des modèles cellulaires *in vitro* sont utilisés pour l'évaluation de la perméabilité au cerveau des nouveaux médicaments. Le modèle assemblé avec des cellules endothéliales (CEs) isolées des capillaires des cerveaux de souris présente un intérêt particulier pour la recherche en raison de sa facilité d'obtention et sa pertinence pour le criblage des médicaments.

Le but de ce projet a été de construire et de caractériser un modèle monocouche de CEs primaires de souris. En parallèle, un modèle monocouche de la lignée murine b.End3 a été investigué. L'évaluation de ces modèles a été basée sur les valeurs de TEER et de perméabilité aux marqueurs fluorescents, ainsi que sur la présence des protéines spécifiques de la BHE. La validation du modèle a été établie par la corrélation des résultats de perméabilité obtenus avec le modèle développé (*in vitro*) avec ceux obtenus chez la souris (*in vivo*).

L'intégrité et l'expression des protéines spécifiques de la BHE du modèle primaire se sont montrées supérieures au modèle bEnd.3. La corrélation *in vitro/in vivo* du modèle primaire a abouti à un $r^2 = 0,765$ comparé au $r^2 = 0,019$ pour le modèle bEnd.3.

Ce travail de recherche montre que le modèle primaire monocouche issu de cellules endothéliales cérébrales de souris est un modèle simple et fiable pour la prédiction de la perméabilité des actifs à travers la BHE.

Mots clés : Barrière hémato-encéphalique, cellules endothéliales cérébrales de souris, culture cellulaire primaire, ligné cellulaire bEnd.3, criblage des médicaments, perméabilité, corrélation IVIVC, logBB, perméabilité *in vivo*, modèle Transwell®.

Abstract

The blood-brain barrier (BBB), a central nervous system structure, is found in the cerebral capillaries. It represents a major obstacle for the drugs that have to reach the brain in order to exercise their pharmacological effect.

In the early stages of the drug development, *in vitro* cell models are used to evaluate the brain permeability of new drugs. Models assembled using primary endothelial cells (ECs) isolated from mouse brain capillaries are of particular interest for research, as for their ease of obtaining and relevance for the drug screening.

Thus, the goal of this project was to build and characterize a primary mouse monolayer model. At the same time, a murine b.End3 cell line monolayer model was investigated. The evaluation of these models was based on the TEER and fluorescent marker permeability values, as well as on the presence of the BBB hallmark proteins. The model validation was established by the correlation of the permeability data obtained with the *in vitro* model and the data obtained in mice (*in vivo*).

As a result, the primary mouse model showed superior monolayer integrity and higher expression of the tight junction and membrane transporter proteins when compared with the bEnd.3 cell line model. The *in vitro/in vivo* correlation of the primary model resulted in $r^2 = 0.765$ compared to the bEnd.3 model with $r^2 = 0.019$.

This research work shows that the primary monolayer mouse model is a simple and reliable model for predicting the drug permeability across the BBB.

Keywords: Blood-brain barrier, mouse brain microvascular endothelial cells, primary cell culture, bEnd.3 cell line, drug permeability, log BB, drug screening; IVIVC, *in vivo* permeability, Transwell®-type model.

Table de matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table de matières	iv
Liste des figures	vii
Liste des tableaux.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Contribution des auteurs	xv
Remerciements.....	xvi
Chapitre 1 : Introduction	1
1. La barrière hémato-encéphalique.....	1
1.1 Contexte historique.....	1
1.2 Présentation et rôles	2
1.3 Composition cellulaire	4
1.3.1 Les cellules endothéliales et la membrane basale.....	4
1.3.2 Les péricytes	5
1.3.3 Les astrocytes.....	6
1.3.4 Les autres cellules de la BHE	6
1.4 Intérêt de l'étude de la BHE pour l'industrie pharmaceutique	7
2. Le passage de la BHE	9
2.1 Définition	9
2.2 Le transport paracellulaire	10
2.3 Le transport transcellulaire	11
2.3.1 Le transport transcellulaire passif.....	11
2.3.2 Le transport transcellulaire actif	12
3. Modélisation <i>in vitro</i> de la BHE	15
3.1 La valeur de TEER.....	16

3.2 La perméabilité endothéliale.....	18
3.3 L'évaluation de la présence des marqueurs spécifiques de la BHE.....	19
4. Modèles <i>in vitro</i> de la BHE	20
4.1 Les modèles statiques	20
4.1.1 Les modèles monocultures.....	21
4.1.2 Les modèles de co-culture en bicouche	22
4.1.3 Les modèles de co-culture tricellulaire	24
4.2 Les modèles dynamiques	24
4.3 Les modèles microfluidiques	25
4.4 Le modèle PAMPA-BBB	26
4.5 Les cellules utilisées dans la construction des modèles <i>in vitro</i>	27
4.5.1 Les cellules primaires	27
4.5.2 Les lignées cellulaires.....	29
4.5.3 Les cellules souches.....	30
5. Validation des modèles de BHE	31
5.1 Évaluation <i>in vivo</i> de la perméabilité de la BHE	32
5.2 Choix des molécules	33
5.3 Classement des molécules.....	34
6. Mise en place du projet de recherche.....	34
6.1 Hypothèse de recherche	35
6.2 Objectifs de recherche.....	36
Chapitre 2 : Essais préliminaires sur le modèle tricellulaire PrimB3 : mise en place des modèles bicouches.....	37
1. Introduction.....	37
2. Hypothèse de recherche	37
3. Objectifs de recherche.....	38
4. Matériel et méthodes.....	39
4.1 Isolation des cellules primaires	39

4.2 Construction des modèles	40
4.3 Mesure de l'étanchéité des modèles	41
5. Résultats	41
5.1 L'isolation des cellules	41
5.2 Construction et caractérisations des modèles	44
6. Discussion	47
7. Conclusion	51
Chapitre 3: Modèle primaire monocouche	52
1. Introduction	57
2. Materials and methods	59
3. Results	72
4. Discussion	78
5. Conclusion	84
Discussion générale	93
Conclusions et perspectives	101
Bibliographie	103

Liste des figures

Figure 1.1. Les deux expériences d'Edwin Goldman en 1909 et 1913. (A) L'injection du bleu de trypan dans la circulation sanguine de la souris et (B) l'injection de bleu de trypan dans la cavité sous-arachnoïdienne de l'animal.....	2
Figure 1.2. Les constituants cellulaires de la barrière hémato-encéphalique.....	3
Figure 1.3. Schéma simplifié de l'organisation intracellulaire des jonctions serrées (TJs) et des jonctions adhérentes (AJs) endothéliales.....	5
Figure 1.4. Les voies de transport à travers la BHE.....	10
Figure 1.5. Exemples de molécules et voies de transport à travers la BHE.....	14
Figure 1.6. Mesure de la résistance de la couche cellulaire d'un modèle Transwell® en utilisant (A) les électrodes de type « chopsticks » et (B) les électrodes concentriques de la chambre Endohm®.....	18
Figure 1.7. Construction d'un modèle monocouche des CEs.....	21
Figure 1.8. Modèles <i>in vitro</i> de la BHE de type Transwell ® en bi- ou tri-culture. Modèles co-culture bicellulaire de CEs avec les ACs et les PCs dans l'assemblage avec contact (a et b) et sans contact (c et d). Modèles co-culture tricellulaires des CEs avec les PCs, les ACs et/ou les neurones (e, f, g, h).....	23
Figure 1.9. Stratégie proposée pour la prédiction de la perméabilité des NTCs à la BHE. Organigramme illustrant la séquence de criblage des « hits » du SNC pour aboutir au classement des principaux composés pour un passage optimal de la BHE.....	27
Figure 2.1. Les modèles 2D Transwell® à assembler: 1. Monocouche de CEs; 2. Co-culture avec contact CEs/ACs; 3. Co-culture sans contact CEs/ACs; 4. Co-culture avec contact CEs/PCs; 5. Co-culture sans contact CEs/PCs; 6. Tri-culture en contact CEs/ACs et sans contact CEs/PCs; 7. Tri-culture en contact CEs/PCs et sans contact CEs/ACs.....	38
Figure 2.2. Schéma des trois grandes étapes du protocole d'isolation des capillaires cérébraux de souris.....	40
Figure 2.3. Les étapes de la croissance cellulaire des CEs extraites des capillaires cérébraux de souris. Microscopie en champs clair, grossissement × 100.....	42
Figure 2.4. Les étapes de la croissance cellulaire des ACs extraits des cerveaux de souris. Microscopie en champs clair, barre d'échelle : 120 µm.....	43

Figure 2.5. Les étapes de la croissance cellulaire des PCs extraits des cerveaux de souris. Microscopie en champs clair, barre d'échelle : 120 μm	43
Figure 2.6. Résistance électrique transendothéliale (TEER, exprimée en $\Omega \times \text{cm}^2$) de la monocouche de cellules endothéliales (EC), des modèles avec les astrocytes avec contact (EC/(AC(R))) et sans contact (EC/(AC(B))). Toutes les données sont présentées en tant que moyenne \pm SD (n = 3). Test statistique: unpaired t test avec Kruskal-Wallis test (ns: $p \geq 0.0332$, * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$).....	44
Figure 2.7. Coefficient de perméabilité Peff du FITC-D (Peff, exprimé en cm/s) à 235 min des modèles sans cellules (Control), de la monocouche de CEs (EC), des modèles avec les astrocytes avec contact (EC/(AC(R))), sans contact (EC/(AC(B))) et en contact avec la lignée cellulaire U-138 (EC/U138(R)). Toutes les données sont présentées en tant que moyenne \pm SD (n = 4). Test statistique: unpaired t test avec Kruskal-Wallis test (ns: $p \geq 0.0332$, * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$).....	45
Figure 2.8. (A) Coefficient de perméabilité Peff du FITC-D (Peff, exprimé en cm/s au jour 6 du modèle) et résistance électrique transendothéliale (TEER, exprimée en $\Omega \times \text{cm}^2$) des modèles sans cellules (Control, n=2), de la monocouche de CEs (EC, n=3), du modèle avec les astrocytes avec contact (EC/(AC(R), n=4) et sans contact (EC/(AC(B), n=3). Toutes les données sont présentées en moyenne \pm SDT. Test statistique: unpaired t test avec Kruskal-Wallis test (ns: $p \geq 0.0332$, * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$).....	46
Figure 2.9. (A) Coefficient de perméabilité Peff du FITC-D (Peff, exprimé en cm/s) et résistance électrique transendothéliale (TEER, exprimée en $\Omega \times \text{cm}^2$) des modèles sans cellules (Control), de la monocouche de CEs (EC), du modèle avec les péricytes avec contact (EC/(PC(R))) et sans contact (EC/(PC(B))). Toutes les données sont présentées en tant que moyenne \pm SD (n = 12 pour Peff et TEER). Test statistique : unpaired t test avec Kruskal-Wallis test (ns: $p \geq 0.0332$, * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$).....	47
Figure 3.1. mRNA expression fold-change between BMEC and bEnd.3 cell line grown in (A) DMEM medium and in (B) specialized BMEC medium. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with HPRT as the housekeeping gene and the bEnd.3 cell line as the calibrator. The bars indicate the average mRNA fold change \pm SD (n=3). Data were analyzed using an unpaired t test with Welch's correction (non-statistically significant (ns): $p \geq 0.0332$, * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$).....	73

Figure 3.2. Effect of puromycin on BMEC (blue) and bEnd.3 cell (red) viability. Data were analyzed using a 2-way ANOVA test (****p<0.0001). Points represent the average cell viability \pm SD (n=6).....74

Figure 3.3. (A) Transendothelial electrical resistance (TEER, expressed as $\Omega \times \text{cm}^2$) and (B) endothelial P_e for sodium fluorescein (NaFl) and FITC-dextran (P_e , expressed in cm/s) of the blood–brain barrier models built from mouse primary brain endothelial cells (BMEC, blue) and from mouse brain endothelial cell line (bEnd.3, red). All data are presented as means \pm SD (n = 12 for TEER, n = 4 for P_e). Statistical analysis: unpaired t test with Welch’s correction (ns: $p \geq 0.0332$, ****p<0.0001, ND- not detected).....75

Figure 3.4. Differences in the fold-change of gene expression between (A) BMEC and (B) bEnd.3 cells grown on a polyester membrane insert filter compared to cells grown on plastic cell culture flask. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with HPRT as the housekeeping gene and cells grown on the plastic cell culture flask as the calibrator. Data were analyzed using an unpaired t test with Welch’s correction (ns : $p \geq 0.0332$, *p<0.0332, **p<0.0021, ***p<0.0002, ****p<0.0001). The bars indicate the average mRNA fold change \pm SD (n=3).....76

Figure 3.5. Linear regression plots for *in vitro* P_e – *in vivo* log BB correlation (IVIVC) using different models for seven drugs: (A) PAMPA-BBB, (B) bEnd.3 model and (C) BMEC. (D) Distribution of drug ranking according to the selected model. D1: chlorpromazine; D2: midazolam, D3 caffeine, D4: theophylline, D5: verapamil, D6: atenolol, D7: tenoxicam.....78

Figure S1. Morphology of (A) murine primary brain endothelial cells (BMEC, passage 1) and (B) murine bEnd.3 endothelial cell line (bEnd.3, passage 15) analyzed by optical inverted microscopy. Images were captured at a magnification of $\times 20$. Scale bar: 100 μm90

Figure S2. Differences in mRNA expression fold-change between BMEC (red) and bEnd.3 cell line (blue), both grown in specialized BMEC medium. Gene expression was quantified by ddPCR, using HPRT mRNA expression as the internal control gene and the bEnd3 cell line as the calibrator.....90

Figure S3. Differences in gene expression fold-change between (A) BMEC and (B) bEnd.3 cells grown on a polyester membrane insert filter (red) compared to cells grown on plastic cell

culture flask (blue). Gene expression was quantified by ddPCR, using HPRT mRNA expression as the internal control gene and cells grown on the plastic cell culture flask as the calibrator....91

Figure S4. Immunocytochemistry of tight junctions (TJs) on BMECs and bEnd.3 *in vitro* cell monolayer models. The 7-day old cell monolayers were directly fixed on the insert membrane and then incubated with Alexa 488-labelled (green) anti-ZO-1 and anti-CL-5 antibodies. DAPI staining (blue) was used to show nuclei. Magnification in all images: $\times 20$. Scale bar 50 μm92

Liste des tableaux

Table 3.1. List of the drugs selected for the validation of BMEC and bEnd.3 model monolayers.....	63
Table 3.2. Summary of mass spectrometry conditions.....	64
Table 3.3. Primers sequences and their parameters used in this study for the analysis of the mRNA expression of main transporters and tight junction proteins.....	67
Table 3.4. Drug formulation (<i>in vivo</i> and <i>in vitro</i>) and dosage (<i>in vivo</i>) used for the permeability studies.....	70

Liste des abréviations

ABC : la famille des transporteurs *ATP Binding Cassette*

AC(s): Astrocyte(s)

AJ(s): Jonction(s) adhérente(s)

AMP : adénosine monophosphate

AQP4 : l'aquaporine 4

ARNm : acide ribonucléique messenger

ATP : adénosine triphosphate

BCRP : Breast cancer resistance protein

bEnd.3 : lignée cellulaire des CEs de souris

bFGF : facteur basique de croissance de fibroblastes

BHE : Barrière hémato-encéphalique

C6 gliome : lignée cellulaire de glioblastome de rat

Caco-2 : lignée épithéliale humaine d'adénocarcinome colorectale

CE(s): Cellule(s) endothéliale(s)

CL-5: Claudine 5

DIV-BBB: dynamic *in vitro* - BBB model

ER : ratio d'efflux

FITC-D : Dextran conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine

GFAP : Glial fibrillary acidic protein

GLUT-1 : transporteur de glucose 1

GDNF : fibroblastes et le facteur neurotrophe dérivé de la glie

hCME /D3 : lignée cellulaire des CEs humaines

iPSC : cellules souches pluripotentes induites

IVIVC: corrélation *in vitro-in vivo*

JAM(s) : molécule(s) d'adhésion jonctionnelle

LAT-1 : Transporteur *Large amino transporter 1*

LC-MS/MS : liquid chromatography-mass spectrometry coupled with mass spectrometry

LDLR, LRP-1 et LRP-2 : les récepteurs des lipoprotéines

log BB : le logarithme de la valeur du ratio cerveau/sang

logP : le logarithme de la valeur du coefficient de partition
MA : la maladie d'Alzheimer
MB : membrane basale
MCT-1 : Transporteur des acides monocarboxyliques
MDCK-MDR1 : la lignée cellulaire Madin Darby canine kidney transfectée avec le gène codant pour la Pgp humaine (MDR-1)
MDR1 et MDR2 : multidrug resistance receptor 1 et 2
MP : la maladie de Parkinson
MRP : multidrug resistance protein
NaFl : sodium fluoresceine
NCT(s) : Nouveaux candidats thérapeutique(s)
NVU : unité neurovasculaire
O₂ : oxygène
OCL : Occludine
PAMPA-BBB : blood-brain barrier specific parallel artificial membrane permeability assay
PBMEC/C1-2 : lignée cellulaire des CEs de porc
PC : polycarbonate
PC(s) : Péricyte(s)
PDGFRB : Beta type Platelet-derived growth factor receptor
P_e : coefficient de perméabilité endothéliale
Peff : coefficient de perméabilité effective
PET : polyester
Pgp : la P-glycoprotéine
qPCR : réaction en chaîne par polymérase quantitative
R&D : recherche et développement
RBE4 : lignée cellulaire des CEs de rat
SLC : la classe de transporteurs *Solute carrier*
SNC : Système nerveux central
SP : la sclérose en plaque
t-BBEC-117 : lignée cellulaire des CEs bovines
TEER : résistance électrique transendothéliale

TGF- β : facteur de croissance transformant de type bêta (transforming growth factor beta)

TJ(s) : Jonction(s) serrée(s)

TMBR : transporteurs membranaires

U-138 : lignée cellulaire de glioblastome humaine

U87 : lignée cellulaire de glioblastome humaine

ZO-1 : Zonula occludens-1

μ BBB : modèles microfluidiques

Contribution des auteurs

Une partie de ce mémoire a été rédigé par l'article présenté au Chapitre 3. La contribution de chaque auteur est présentée ci-dessus :

Chapitre 3. Blood–brain barrier permeability assays: which one is the more reliable for drug screening between mouse primary endothelial cells, bEnd.3 endothelial cells or PAMPA-BBB ?

Ina Puscas^{#1}, Florian Bernard-Patrzynski^{#1}, Martin Jutras¹, Marc-André Lécuyer^{2,3}, Lyne Bourbonnière², Alexandre Prat², Grégoire Leclair*¹ and V Gaëlle Roullin*¹

Ina Puscas – a mis au point les protocoles de construction des modèles *in vitro* de la BHE et des tests de perméabilité des marqueurs fluorescents ainsi que des composés chimiques. Elle a réalisé les tests de caractérisation des modèles construits, les qPCR (avec l'aide de Mouna Derbali), l'immunocoloration, l'analyse des échantillons biologiques par LC-MS/MS. Elle a développé (avec l'aide de Mihaela Friciu) les formulations des composés injectés aux souris. Elle a analysé les résultats et rédigé la première version de cet article.

Florian Bernard-Patrzynski – a mis au point les protocoles d'isolation des trois types de cellules primaires, a développé les méthodes d'analyse LC-MS/MS ainsi que le modèle PAMPA-BBB. Il a participé aux études animales et aux analyses des échantillons biologiques.

Martin Jutras – a contribué au développement des méthodes d'analyse LC-MS/MS et a fourni des conseils précieux sur l'analyse des échantillons biologiques.

Marc-André Lécuyer, Lyne Bourbonnière, Alexandre Prat – ont contribué à l'élaboration des protocoles d'isolation des cellules primaires.

Grégoire Leclair - a géré ce projet en tant que co-directeur de projet de recherche. Il a contribué au projet en tant que consultant scientifique.

V Gaëlle Roullin – a géré ce projet en tant que directrice de projet de recherche. Elle a analysé et rédigé la version finale de cet article.

Remerciements

Premièrement, je tiens à remercier mes deux directeurs de recherche, Dre. Gaëlle Roullin et Dr. Grégoire Leclair de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires et donné l'occasion de travailler sur ce sujet de recherche. Un merci particulier à Gaëlle qui m'a soutenu tout le long de ce parcours plein d'imprévus. Merci pour les fautes d'orthographe corrigées, pour les conseils tant reliés à la science qu'aux sujets non scientifiques. Merci aussi d'avoir su comment accepter ma franchise, parfois un peu trop directe.

Je remercie les employés de la Plateforme de Biopharmacie qui ont été présents tout le long de ma maîtrise. Merci à Mihaela pour sa disponibilité à n'importe quel moment, pour tout le travail qu'on a fait ensemble sur l'élaboration des formulations. Ainsi que pour sa présence, pour les mots d'encouragement et pour son grand soutien dès mes premiers jours à la faculté de Pharmacie. Merci à Martin et Isa pour leur aide avec le MS et le traitement des échantillons biologiques.

Merci à tous les étudiants qui sont passés ou qui font partie du Laboratoire des Nanotechnologies Pharmaceutiques. Merci à Soudeh pour ses histoires drôles et ses conseils précieux, à Florian pour son aide avec le projet des cellules primaires et pour les remontées de moral et à Imane avec qui nous avons fait une équipe de feu pendant son stage au laboratoire.

Un merci spécial à mes chéries Cloé et Mouna : « Les filles vous êtes géniales! ». Merci à Cloé d'avoir été la meilleure voisine de bureau et une amie avec le plus grand cœur au monde! Merci à Mouna pour les histoires interminables et la bonne humeur qu'elle sème autour d'elle, ainsi que pour tous les conseils sur la culture cellulaire, qPCR et beaucoup d'autres.

Merci aux étudiants et aux professeurs du 4e étage que j'ai côtoyé durant ma maîtrise et qui d'une manière ou autre ont laissé leur empreinte sur mon parcours.

Merci à ma mère, Lidia, qui a traversé l'océan deux fois pour venir m'aider durant les temps chargés. Même si loin de moi, elle a été toujours proche, comme juste une maman sait le faire. Enfin, je remercie particulièrement mes deux M : Maxim et Marie-Sophie. Max tu as toujours su comment transformer un moment de crise en un moment de fous rires. Merci d'avoir pris soin de notre petite famille et de m'avoir donné le temps pour me consacrer aux études. Mes diplômes sont autant les tiens que les miens. Et merci à ma fille, Marie-Sophie, qui me montrait le monde à travers des yeux d'enfant et ainsi le rendait meilleur.

Chapitre 1 : Introduction

1. La barrière hémato-encéphalique

1.1 Contexte historique

Les premières observations de la nature protectrice du cerveau ont été décrites par le médecin anglais Humphrey Ridley (1653-1708). En injectant du mercure dans la circulation sanguine, il remarqua la coloration des ramifications des vaisseaux sanguins, mais pas du tissu nerveux (1). En 1885, le scientifique Paul Ehrlich, spécialisé dans la coloration des tissus animaux, observa que l'injection des colorants acides ne colorait pas le cerveau. Il attribua cette observation à l'absence de l'affinité du cerveau pour ces colorants, mais n'admit pas que l'endothélium vasculaire exerce différentes fonctions selon l'organe qu'il irrigue (2, 3).

En 1900, Lewandowsky utilisa la strychnine et le ferrocyanure de sodium dans ses travaux et démontra que ces toxines sont efficaces dans de plus petites doses une fois injectées directement dans le cerveau plutôt qu'en périphérie. Il constata que le faible passage au cerveau de ces deux toxines était dû aux propriétés spécifiques de l'endothélium cérébral et qu'une affinité était nécessaire entre les toxines et l'endothélium cérébral afin qu'elles soient transportées aux cellules nerveuses (3).

L'existence d'une barrière entre la circulation sanguine et le système nerveux central (SNC) fut encore une fois soulignée avec deux expériences d'Edwin Goldmann. Premièrement, en 1909, il observa que l'injection par voie parentérale du bleu de trypan ne colorait pas le cerveau comparativement aux restes des organes (Figure 1.1. A). Ensuite, en 1913, l'injection de ce colorant dans la cavité sous-arachnoïdienne teignit le cerveau et la moelle épinière, mais laissa intact le reste du corps (Figure 1.1. B) (3).

Finalement en 1967, avec l'arrivée de la microscopie électronique, Reese et Karnosky ont montré la structure de l'endothélium cérébral des capillaires chez la souris et ont souligné la présence et l'importance des jonctions cellulaires dans le transport des molécules au cerveau (4, 5).

En passant de « mur » à la « barrière », la notion de « barrière hémato-encéphalique » fut employée pour la première fois en 1921 par Stern et Gauthier (3, 6) .



Figure 1.1. Les deux expériences d'Edwin Goldmann en 1909 et 1913. (A) L'injection du bleu de trypan dans la circulation sanguine de la souris et (B) l'injection de bleu de trypan dans la cavité sous-arachnoïdienne de l'animal. Repris et adapté de (3) disponible sur <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2014.00404/full>, Figure 2. Copyright © 2014 Saunders, Dreifuss, Dziegielewska, Johansson, Habgood, Møllgård and Bauer. Cet article est en accès libre et distribué sous les conditions de la licence Creative Commons Attribution License (CC BY).

1.2 Présentation et rôles

On sait aujourd'hui que la barrière hémato-encéphalique (BHE) est un réseau de capillaires qu'on retrouve au niveau du cerveau et qui se présente comme une interface entre le système vasculaire et le parenchyme cérébral. Chez un humain adulte, le réseau de capillaires est caractérisé par une longueur de 600 km et une surface totale de 15-20 m² (7). Les principaux types cellulaires qui composent la BHE sont les cellules endothéliales (Ces) avec leur membrane basale (MB), les péricytes (PCs), les astrocytes (ACs), les neurones et les cellules de la microglie (Figure 1.2.). Le contact étroit établi entre les composantes cellulaires de la BHE, les interactions fonctionnelles et de signalisation qui en découlent, forment une entité dynamique connue sous le nom d'unité neurovasculaire (NVU) (8). Ensemble, ces éléments forment une barrière

physique, de transport, métabolique et immunologique qui maintient l'homéostasie du SNC (9). Le rôle de « barrière » de la BHE empêche le transport au cerveau des substances retrouvées dans le sang qui pourraient être dommageables pour son bon fonctionnement. Les bactéries, les virus, les médicaments et les hormones circulent aisément dans le sang, sans effets délétères pour le corps, mais peuvent être fatals pour le cerveau. D'un autre côté, le cerveau, organe qui constitue seulement 2% du poids corporel, utilise 15-20% de l'oxygène et 15-20 % du glucose consommé quotidiennement (10). Puisque le cerveau n'a pas la capacité d'emmagasiner les nutriments, la BHE a le rôle de lui fournir constamment ces éléments essentiels (7). Le glucose, les acides aminés, les nucléosides et les bases azotées sont des exemples de molécules nécessaires au cerveau qui sont transférées via des transporteurs retrouvés à la surface membranaire des CEs composant la BHE (11).

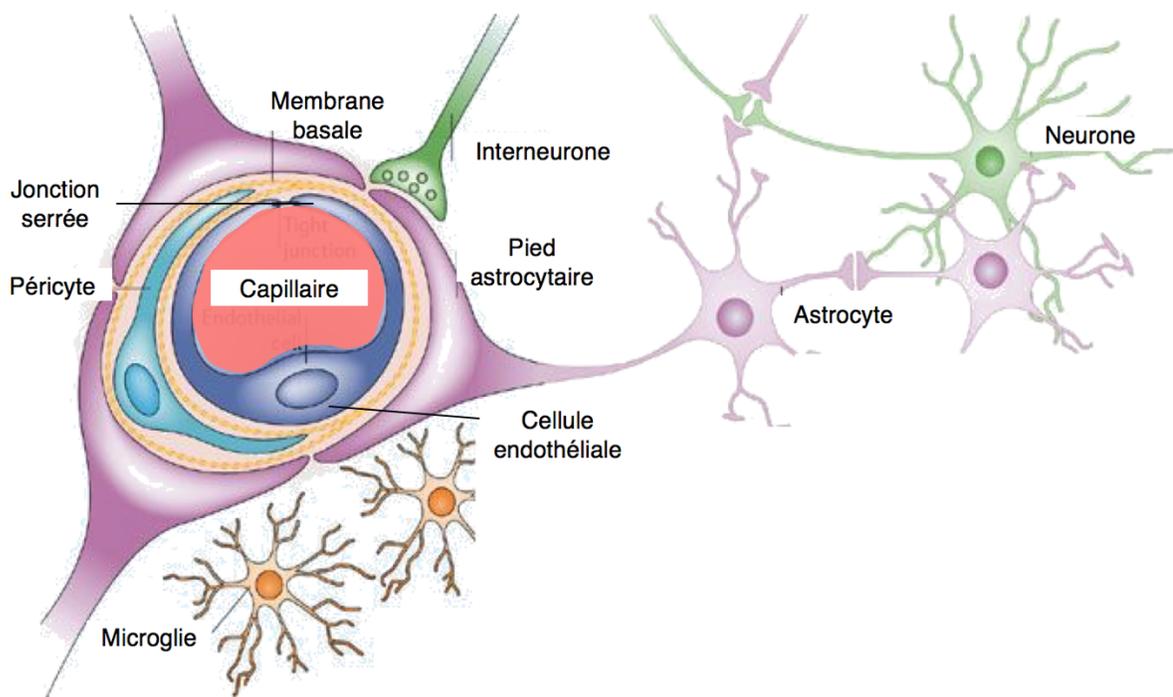


Figure 1.2. Les constituants cellulaires de la barrière hémato-encéphalique. Repris, adapté et traduit avec permission de (11).

1.3 Composition cellulaire

1.3.1 Les cellules endothéliales et la membrane basale

La monocouche de CEs, qui forme les capillaires irriguant le cerveau, constitue la première barrière physique entre la circulation sanguine et le tissu cérébral. Elle est caractérisée par l'absence de fenestrations, un niveau bas de pinocytose, un nombre élevé de mitochondries et la présence de transporteurs polarisés à la surface membranaire (12, 13).

Du côté basal (cerveau), les CEs sont ancrées dans une MB de 30-40 nm, composée principalement de collagène de type IV, laminine, fibronectine et du polysaccharide héparane sulfate (8), matrice sécrétée par les CEs et par les PCs (14). Une deuxième MB sécrétée par les ACs sert à recouvrir les PCs et à ancrer les pieds astrocytaires aux capillaires cérébraux. Ces deux matrices, indispensables à la structure de la BHE, servent de plateforme d'ancrage de toutes ces composantes. Elles forment par elles-mêmes une barrière supplémentaire au passage des molécules au cerveau.

Les CEs sont maintenues de façon cohésive par les jonctions serrées (TJs) et les jonctions adhérentes (AJs). Ces jonctions scellent les cellules adjacentes comme une fermeture éclair, ce qui crée une monocouche continue de cellules. Les protéines des TJs et des AJs sont localisées du côté basolatéral de la membrane cellulaire et sont attachées au cytosquelette de la cellule à l'aide des protéines cytoplasmiques.

Les TJs (Figure 1.3.) constituent la première résistance à la diffusion paracellulaire (entre les cellules) des molécules et des petits ions comme le Na^+ et le Cl^- (11). Elles sont composées de trois familles de protéines transmembranaires : les claudines (principalement CL-3 et 5), l'occludine (OCL) et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAMs) (15). Ces protéines sont attachées au cytosquelette d'actine de la cellule à l'aide des protéines cytoplasmiques Zonula occludens (ZO-1 et 2) (9, 16). Le complexe des protéines des TJs joue un rôle critique dans l'homéostasie du SNC en limitant le passage paracellulaire des ions et des petites molécules hydrophiles au BHE (17). De plus, elles séparent le domaine apical (sang) du domaine basal (cerveau) de la cellule, ce qui résulte dans la polarisation de la cellule (11). L'OCL, la CL-5 et la ZO-1 sont considérées comme des indicateurs des changements structuraux de la BHE. Ainsi, des CEs traitées avec l'amyloïde bêta, protéine impliquée dans le processus pathologique de la maladie d'Alzheimer, ont montré une suppression de l'OCL et la redistribution dans le

cytoplasme cellulaire de la ZO-1 et la CL-5, contrairement à leur localisation membranaire dans les cellules non traitées (18).

Les AJs (Figure 1.3.) sont composées de cadhérines, liées au cytoplasme de la cellule par les caténines. La protéine la plus importante des AJs est la VE-cadhérine, protéine indispensable à l'intégrité vasculaire, à l'adhérence et à la survie cellulaires (19).

Du côté apical des capillaires, les CE expriment des récepteurs et des transporteurs qui régissent le transport transcellulaire des petites molécules, des protéines et des ions au parenchyme cérébral.

La structure unique des CE et les caractéristiques qui en découlent définissent en grande partie les fonctions de BHE.

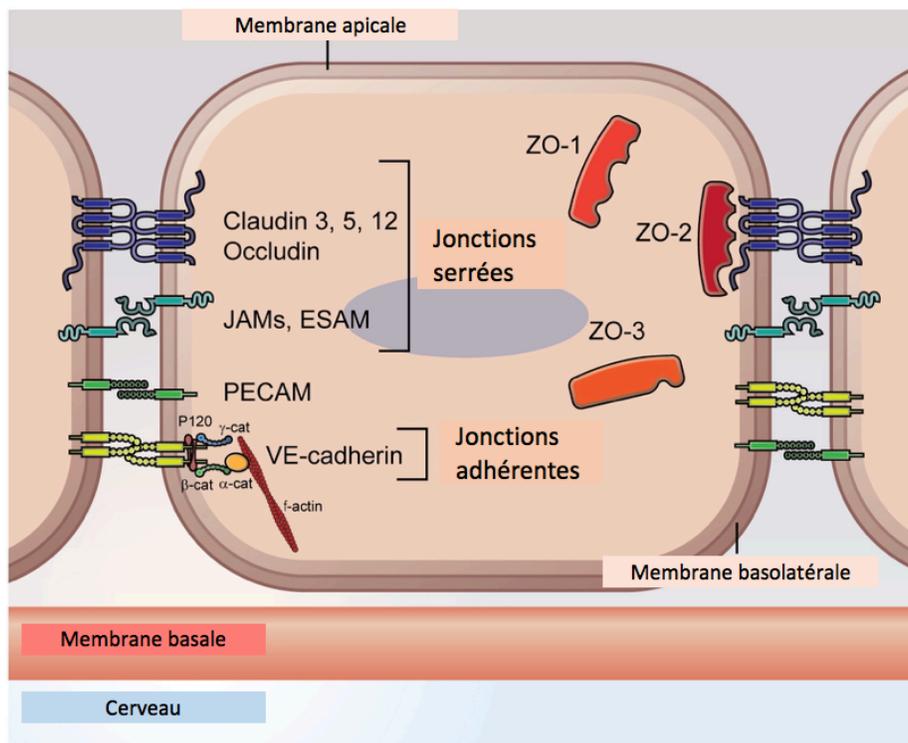


Figure 1.3. Schéma simplifié de l'organisation intracellulaire des jonctions serrées (TJs) et des jonctions adhérentes (AJs) endothéliales. Repris, adapté et traduit avec permission de (20).

1.3.2 Les péricytes

Les PC sont des cellules périvasculaires avoisinantes des vaisseaux sanguins. Dans la structure de la BHE, les PC sont retrouvés dans un rapport de 1 : 3 comparativement aux CE (21). Ils

entourent les capillaires en formant une monocouche discontinue et partagent la même MB, qu'ils sécrètent, avec les CE. Les PCs sont responsables de la régulation du débit sanguin en gérant la contraction et la relaxation des capillaires. Ils sont impliqués dans la formation des TJs par la sécrétion du facteur de croissance transformant de type bêta (TGF- β), dans l'inhibition de l'expression de molécules qui augmentent la perméabilité vasculaire et l'infiltration de cellules immunitaires au SNC (22).

1.3.3 Les astrocytes

Morphologiquement, les ACs sont des cellules en forme d'étoile avec des projections qui émergent de leurs corps cellulaires. Dans la structure de la BHE, ils interagissent avec les CE par leurs projections, qu'on appelle des pieds astrocytaires, en recouvrant entièrement les capillaires (17). Les ACs sont responsables du passage de l'eau de part et d'autre des membranes cellulaires et de la régulation du flux des ions via l'aquaporine 4 (AQP4) et le canal Kir4.1K⁺, respectivement (23). Ils agissent sur les CE par l'intermédiaire de molécules sécrétées, notamment l'interleukine-6, le TGF- β , le facteur basique de croissance de fibroblastes (bFGF) et le facteur neurotrope dérivé de la glie (GDNF). Ainsi, les ACs détiennent un rôle important dans la formation des TJs, la polarisation des transporteurs membranaires (TMBRs) et la promotion des complexes d'enzymes spécialisées (7).

1.3.4 Les autres cellules de la BHE

Les neurones sont la composante cellulaire majoritaire du cerveau. Ils définissent les fonctions remplies par le cerveau et sont très sensibles aux variations des taux d'oxygène (O₂) et de la température. La BHE a le rôle de prévenir ces changements et donc protéger les neurones. Leur impact sur l'augmentation de l'intégrité des modèles *in vitro* semblerait montrer qu'ils ont un rôle de support des CE (24).

La microglie est constituée des cellules immunitaires du SNC. Ces macrophages maintiennent l'homéostasie cérébrale en nettoyant les débris et les neurotoxines par phagocytose. Leur présence en grand nombre est un indicateur de l'inflammation du cerveau et donc d'une diminution de l'intégrité de la BHE (24).

1.4 Intérêt de l'étude de la BHE pour l'industrie pharmaceutique

Le marché mondial des agents thérapeutiques destinés au SNC se classe deuxième en importance dans le marché mondial des produits pharmaceutiques. Ceci est dû en partie au grand nombre des personnes âgées de plus de 65 ans, groupe d'âge le plus affecté par les maladies neurodégénératives. Il a été estimé que vers 2050, la population mondiale de 65 ans et plus augmentera d'un billion de personnes. Ainsi, l'Organisation mondiale de la Santé a indiqué que les troubles du SNC seraient le principal défi médical du XXI^e siècle (25). Hormis la maladie de Parkinson (MP), la maladie d'Alzheimer (MA) et la démence, on compte la dépression, l'épilepsie, la sclérose en plaques (SP), l'obésité et la douleur neuropathique parmi les maladies les plus courantes de SNC (26). Ainsi, le développement de médicaments destinés à traiter les maladies du SNC doit devenir une priorité pour l'industrie pharmaceutique.

Malgré le fait que le développement de médicaments des maladies du SNC constitue le segment de l'industrie pharmaceutique avec la croissance la plus rapide, les traitements disponibles restent seulement palliatifs (25). Le processus du développement de médicaments du SNC dure entre 12 à 16 ans, de 2 à 4 ans de plus comparativement au développement des médicaments non SNC. De plus, il montre un taux d'échec et des coûts associés beaucoup plus élevés.

Les trois principales causes déterminantes de ce retard dans le développement de médicaments du SNC sont (27) :

- 1) La complexité du fonctionnement du cerveau et le manque de compréhension de son implication dans l'étiologie des pathologies du SNC;
- 2) Les effets secondaires modérés ou graves générés par les nouveaux candidats thérapeutiques (NCTs) agissant au cerveau;
- 3) La capacité limitée de passage au cerveau des molécules, imposée par la présence de la BHE. Ainsi, la BHE constitue non seulement un obstacle pour le passage des molécules au cerveau, mais aussi une interface complexe et dynamique qui répond aux changements pathologiques. Toutefois, cette complexité dans la fonction de la BHE offre aussi des opportunités uniques et variées pour le développement de médicaments (28). Ainsi, l'industrie pharmaceutique peut viser le développement d'actifs thérapeutiques qui tendent à prévenir la perte d'intégrité de la BHE, comme dans le cas des maladies du SNC, ou à l'ouvrir de façon sélective et temporaire pour faciliter le passage de molécules.

L'implication directe de la BHE dans les processus pathologiques des maladies du SNC l'identifie comme cible thérapeutique dans la recherche des traitements du SNC. Toutefois, il n'est pas encore clair si les détériorations de la BHE sont la cause ou les conséquences des maladies du SNC (12). Chez les patients atteints de MA, il a été observé que le transporteur d'influx RAGE, responsables du transport de la protéine bêta-amyloïde (A β) est surexprimé, ce qui menait à une accumulation plus importante de cette protéine au cerveau (18). Le développement des antagonistes des RAGE diminuerait le transport et l'accumulation de A β dans les tissus cérébraux (29) .

D'autre part, la baisse de l'expression des TJs de la BHE accroît l'infiltration massive des leucocytes. Ce phénomène est observé dans la SP, les accidents vasculaires cérébraux, les tumeurs cérébrales. Le traitement par anticorps anti-VLA-4 est récemment apparu comme une approche intéressante pour limiter l'infiltration de leucocytes au cerveau chez les patients atteints de SP (30). Les transporteurs présents à la surface membranaire des CEs et la compréhension de leur implication dans les pathologies de SNC constituent donc des cibles thérapeutiques potentielles à exploiter pour la conception ciblée des NTCs (28).

Dans le but de faciliter le transport à travers la BHE, plusieurs techniques ont été développées : utilisation des mécanismes des transporteurs des CEs cérébrales, ouverture temporaire des jonctions cellulaire, choc osmotique. Une autre approche pour faciliter le transport à travers la BHE est constituée par l'utilisation des nanovecteurs. Il s'agit de particules de taille de 10 à 1000 nm (idéalement de 100 nm), non toxiques et non immunogéniques, biodégradables et biocompatibles et qui sont stables dans la circulation sanguine. Les liposomes et les nanoparticules polymériques sont présentement les nanovecteurs les plus investigués dans les traitements du SNC (31).

Un autre volet important de l'industrie pharmaceutique impliquant la BHE repose sur les programmes d'évaluation de la perméabilité des NCTs. Le processus de criblage à haut débit est mis en place tôt dans la recherche et développement (R&D) et sert à tester la perméabilité de grandes bibliothèques de composés. Des modèles BHE *in silico*, *in vitro* et animaux sont actuellement disponibles pour évaluer la capacité de molécules (32) et de nanoparticules (33) à passer au cerveau. Actuellement, le défi de ces programmes consiste essentiellement dans le développement d'un modèle *in vitro* qui refléterait le phénotype *in vivo* de la BHE, mais qui serait également compatible avec le criblage haut débit imposé par le contexte industriel.

2. Le passage de la BHE

2.1 Définition

L'évaluation de la perméabilité à travers la BHE des NCTs est une étape importante et décisive dans les phases précoces du développement du médicament. Ceci est primordial non seulement pour les traitements des maladies du SNC, mais aussi pour les molécules qui agissent en périphérie, dont le passage au cerveau résultera possiblement en des effets secondaires délétères. Pour se rendre au cerveau, les molécules qui se retrouvent dans le sang doivent traverser l'endothélium, pénétrer dans la MB d'où elles pourraient être transportées dans un PC ou un AC, ou diffuser latéralement dans un espace acellulaire entre les pieds des ACs et dans l'espace extracellulaire (7). Ainsi, même en connaissant les propriétés physicochimiques de la molécule étudiée, il est difficile de prédire quel transport serait emprunté et si la molécule atteindrait éventuellement le cerveau. Le passage de la BHE est régi en grande partie par les propriétés des CEs. Ainsi, la composition lipidique de la membrane cellulaire des CEs, la structure des TJs et la présence des transporteurs d'efflux, des récepteurs et canaux transmembranaires détermineront majoritairement la capacité de passage à travers la BHE.

Par sa structure particulière, la BHE bloque l'entrée au cerveau de 100% des grosses molécules et 98% de petites (masse molaire < 400 g/mol) (34). Toutefois, malgré son étanchéité, le transport de nutriments et d'O₂ et l'élimination des déchets sont impératifs pour le bon fonctionnement du cerveau.

Ainsi les molécules de faible masse molaire, dont la plupart des actifs, peuvent se rendre au cerveau par passage paracellulaire ou transcellulaire (Figure 1.4).

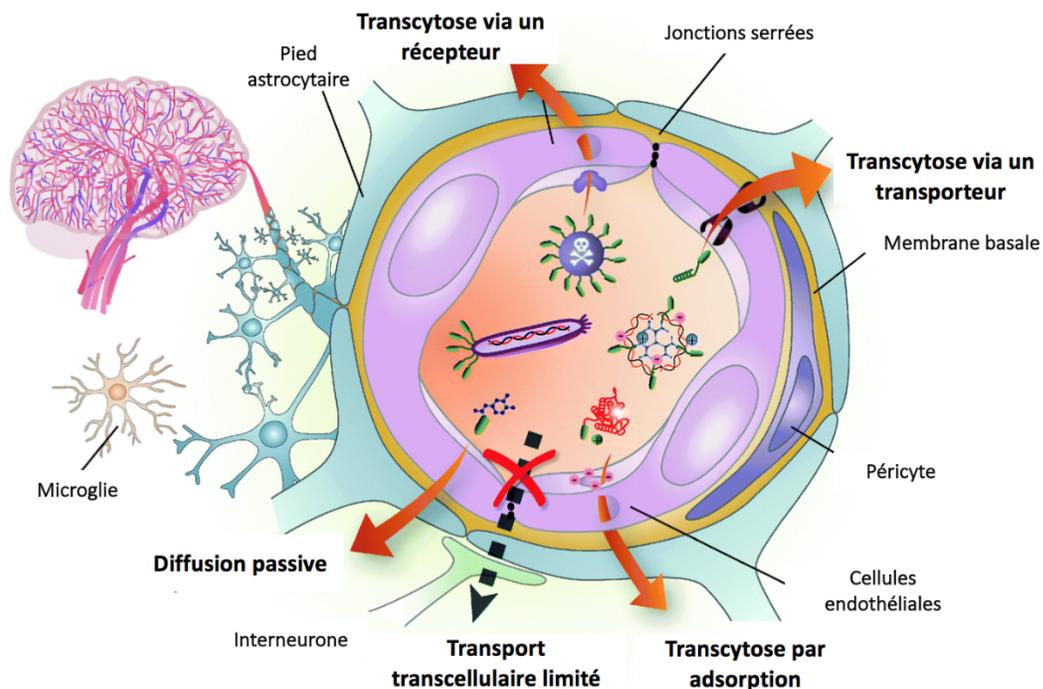


Figure 1.4. Les voies de transport à travers la BHE. Repris, adapté et traduit de (35) disponible sur <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/cs/c6cs00076b#!divAbstract>, Figure 1. Publié par ©The Royal Society of Chemistry 2016. Cet article est un article en accès libre distribué sous les conditions de la licence [Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/).

2.2 Le transport paracellulaire

Le transport paracellulaire de la BHE désigne le passage des molécules entre deux cellules adjacentes, à travers le complexe des TJs. C'est un processus de diffusion passive dépendant du gradient électrochimique et osmotique (15). Il permet le mouvement des petites molécules hydrophiles, comme le sucrose et le mannitol (Figure 1.5.) qui d'ailleurs sont utilisés comme marqueurs de perméabilité dans l'évaluation de l'intégrité des modèles *in vitro* de la BHE. Toutefois, en raison de la présence des TJs qui scellent les CEs, le passage de la BHE par voie paracellulaire est négligeable.

Le passage paracellulaire étant réduit, les molécules sont forcées de prendre la route transcellulaire pour atteindre les tissus cérébraux.

2.3 Le transport transcellulaire

2.3.1 Le transport transcellulaire passif

Le passage transcellulaire passif inclut la diffusion passive et la diffusion facilitée.

La diffusion passive est régie par le gradient de concentration établie entre le sang et le parenchyme cérébral. Ce type de transport est privilégié pour les petites molécules qui sont assez hydrophiles pour être solubles dans l'eau et assez lipophiles pour être solubles dans la couche lipidique de la membrane cellulaire (7). Une faible masse molaire (< 400 Da) et une charge globale neutre des molécules favorisent davantage la diffusion passive (36). Les petites molécules gazeuses, comme O₂ et CO₂ (Figure 1.5.), peuvent diffuser aisément à travers la membrane lipidique. Ce transport non saturable est aussi utilisé par les molécules lipophiles comme les barbituriques et l'éthanol, les anesthésiques, la caféine, la nicotine, les hormones (11). Un NCT qui possède la combinaison de ces caractéristiques est très susceptible de passer la BHE, pourvu qu'il ne soit pas expulsé dans la circulation sanguine par les pompes à efflux ou absorbé dans les autres tissus de corps avant de se rendre au cerveau.

La diffusion facilitée est un processus qui ne nécessite pas d'apport d'énergie, est saturable et se fait selon un gradient de concentration. La diffusion facilitée permet le passage des petites molécules polaires (Figure 1.5.), comme le glucose, les acides aminés, les cations et anions organiques, à travers la membrane cellulaire en passant par des protéines de transport ou des canaux protéiques. Un récepteur peut être propre à une seule ou plusieurs molécules et est généralement impliqué dans le mécanisme d'influx ou le transport bidirectionnel des molécules. Ce type de transport est spécifique aux molécules endogènes qui ne peuvent pas passer par diffusion passive. Les CEs cérébrales possèdent le transporteur de glucose (GLUT-1) qui sert au transport du glucose et du mannose. Le transporteur GLUT-1, qui est codé par le gène Slc2a1, fait partie des transporteurs de la classe SLC (solute carrier). L'importance du GLUT-1 dans la structure de la BHE a été soulignée chez les souris Slc2a1^{+/-} qui présentaient un taux réduit d'absorption de glucose au cerveau et une réduction du débit sanguin. Cela s'est traduit par une perméabilité augmentée de la BHE et une faible expression des TJs (17). *In vitro*, la présence du GLUT-1 à la surface membranaire des CEs utilisées pour la construction des modèles BHE, indique que le phénotype cérébral des cellules après l'isolation a été conservé. Le transporteur des acides monocarboxyliques (MCT-1, Slc16a1) et le transporteur des acides aminés (LAT-1,

Slc7a5) de la famille SLC (37) sont également présents au niveau des CEs cérébrales. Ils sont généralement impliqués dans l'approvisionnement du cerveau en nutriments.

Cette voie de transport est particulièrement intéressante dans le développement du médicament. La conjugaison d'un NTC avec une substance endogène spécifique au transporteur ou au canal protéique sera capable d'entraîner un changement de conformation et de délivrer la molécule au cerveau. La L-dopa, utilisée chez les malades de Parkinson, et le baclofène, un puissant relaxant musculaire, utilisent ainsi le transporteur LAT-1 pour atteindre le cerveau (36).

2.3.2 Le transport transcellulaire actif

Le passage transcellulaire actif permet le transport via un récepteur ou des pompes d'efflux.

Le transport actif via les transporteurs est un mécanisme de transcytose qui nécessite un apport d'énergie et s'effectue contre un gradient de concentration. Cette voie est importante dans le transport des peptides endogènes comme l'insuline, les facteurs de croissance insuline-like, la transferrine, les récepteurs des lipoprotéines (LDLR et LRP-1 et 2). L'interaction entre le substrat et le récepteur est de nature très spécifique, les molécules reconnues étant transportées de la lumière du capillaire vers le cerveau (31). Dans les cas des pathologies où les transporteurs sont surexprimés, le transcytose via un récepteur sera augmenté. Dans ce cas, les molécules conjuguées aux substances endogènes reconnues par ces transporteurs auraient la possibilité d'être délivrées au cerveau, de la même manière que les molécules transportées par diffusion facilitée.

Le transport actif via les pompes d'efflux implique des protéines transmembranaires qui font partie de la famille ABC (ATP Binding Cassette) (Figure 1.5.). Ce transport se fait contre le gradient de concentration et utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. À la surface membranaire des CEs cérébrales, on trouve les protéines de la classe ABC suivantes : la Pgp (P-glycoprotein), la BCRP (breast cancer resistance protein), la MRP (multidrug resistance protein) qui sont impliqués dans les phénomènes de résistance aux traitements. Ces transporteurs, les pompes à efflux, empêchent les molécules substrats de passer au cerveau en les expulsant dans la circulation sanguine.

Les pompes à efflux constituent le principal obstacle à la livraison des NCTs au cerveau. Ainsi, l'identification précoce des substrats de ces transporteurs permettrait de faire les changements

de structure nécessaires pour éviter leur reconnaissance par ces pompes à efflux et par conséquent augmenter la quantité de médicaments livrée. Dans le même but, ces transporteurs doivent être présents à la surface membranaire des cellules utilisées dans la construction des modèles *in vitro* de la BHE. Une attention particulière a été attribuée à la quantification de ces transporteurs dans ce projet, notamment pour le transporteur Pgp. En effet, l'absence ou l'expression réduite de la Pgp à la surface membranaire des CEs pourraient surestimer erronément la capacité de passage de molécules reconnues par cette protéine.

La Pgp est une protéine de 170 kDA encodée par le gène MDR1 et MDR2 chez les humains et par les gènes *mdr1a*, *mdr1b*, et *mdr2* chez les rongeurs. Le rôle principal de cette protéine est de prévenir l'accumulation dans les cellules des xénobiotiques potentiellement toxiques pour l'organisme humain (38).

Dans la structure de la BHE, la Pgp est exprimée à la fois du côté apical et basal des CEs, ainsi qu'à la surface membranaire des pieds astrocytaires. Il a été démontré que les niveaux d'expression de la Pgp se distinguent entre les capillaires fraîchement isolés, les cellules primaires et les lignées cellulaires, le niveau d'expression le plus important étant confirmé dans les capillaires fraîchement isolés (38).

L'expression et le fonctionnement de la Pgp sont altérés dans les pathologies du SNC. Dans la MA et la MP, son expression est fortement réduite, tandis que dans le cas de l'épilepsie et de l'ischémie cérébrale, son expression est augmentée (31).

Les substrats de la Pgp sont des molécules avec des propriétés très différentes et incluent les agents chimiothérapeutiques, les immunosuppresseurs, les quinolones, les antibiotiques, etc. (38). Le potentiel d'une molécule à être un substrat de Pgp est déterminé *in vitro* à l'aide des tests de perméabilité sur des monocouches des cellules MDCK-MDR1 ou Caco-2. Le ratio d'efflux (ER) est défini comme le rapport entre la perméabilité d'une molécule dans le sens de l'efflux et sa perméabilité dans le sens de l'influx. Un $ER > 3$ indique que la molécule testée sera soumise à efflux important, tandis qu'un $ER < 1$ indique que la molécule sera un faible substrat pour la Pgp (39).

Durant les étapes du développement des médicaments, la Pgp est considéré comme le principal obstacle dans la livraison des NCTs au cerveau. Ainsi, pour faciliter la livraison de ces molécules, il faut prévoir une co-administration avec un inhibiteur de la Pgp (par ex. Pluronic P85) ou modifier la structure de la molécule pour lui éviter d'être reconnue par les transporteurs

d'efflux (31).

Le transport par adsorption des peptides et des protéines cationiques (ex. l'albumine) est un transport saturable (Figure 1.5.). Le contact initial se fait par interactions électrostatiques des protéines cationiques et les sites anioniques des résidus glycoprotéiques présents à la surface membranaire de la cellule. Dans le développement du médicament, cette voie de transport par transcytose présente un intérêt particulier pour la livraison des molécules au cerveau. Par exemple, la conjugaison du bêta-endorphine avec l'albumine cationique a augmenté le passage au BHE de cette dernière (15). Toutefois, c'est une voie de transport non spécifique, ainsi l'adsorption aux cellules des autres organes est grandement probable. Ceci peut mener à l'accumulation des molécules dans d'autres organes, réduisant ainsi grandement la concentration de médicaments requise pour le passage cérébral. La toxicité et les réactions immunitaires qui sont provoquées par les protéines cationiques doivent être surveillées lors de la mise au point des NCTs pour le passage par adsorption (31).

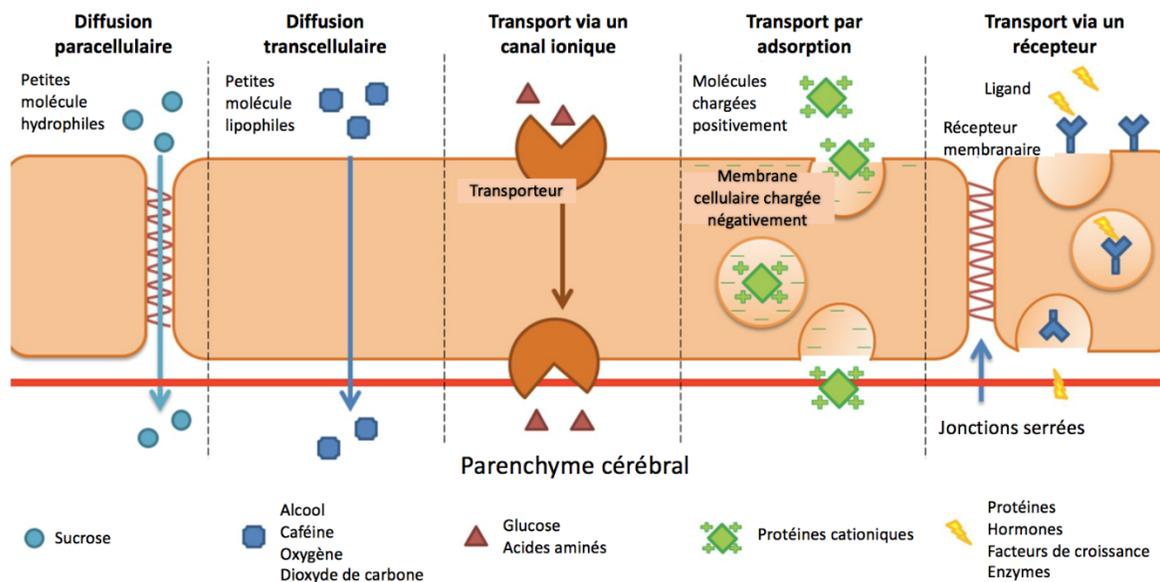


Figure 1.5. Exemples de molécules et voies de transport à travers la BHE. Repris, adapté et traduit de (40) disponible sur <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/2/381/htm>, Figure 1. Publié par © 2019 by the authors. Licencié : MDPI, Basel, Switzerland. Cet article est un article en accès libre distribué sous les conditions de la licence Creative Commons Attribution (CC BY) <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

3. Modélisation *in vitro* de la BHE

La méthode la plus ancienne et la mieux établie pour étudier le transport des NCTs à travers la BHE est réalisée *in vivo*. Ceci permet d'étudier le passage des molécules au cerveau dans son environnement complexe. Comme les études *in vivo* ne peuvent pas être réalisées chez les humains, ce sont les animaux de laboratoire qui sont utilisés (24). Toutefois, le grand nombre d'animaux utilisés en recherche a toujours été une question éthique soulevant des polémiques. L'utilisation des modèles *in vitro* de la BHE dans le développement de médicaments présente une solution de remplacement aux essais sur les animaux. Elle offre de nouvelles opportunités pour les tests de perméabilité, tout en restant engagée envers les 3R (41). Ces modèles permettent l'étude de la BHE dans un environnement qui mime les propriétés de la BHE, mais qui contrôle aussi le degré de complexité par rapport à celui retrouvé chez l'animal vivant.

Le modèle BHE *in vitro* idéal doit reproduire la structure *in vivo* de la BHE, donc posséder les caractéristiques suivantes (42) :

- 1) L'expression des TJs (CL-5, OCL, ZO-1) chargées de réguler le transport paracellulaire ;
- 2) La disposition asymétrique (apicale/basale) des principaux TMBRs (Pgp, MRP-1, GLUT-1, LAT-1 etc) ;
- 3) L'expression des principaux transporteurs d'efflux (Pgp, BCRP, MRP-1) ;
- 4) La capacité de discriminer la perméabilité des NCTs selon leur degré de lipophilie et de la masse molaire ;
- 4) La présence d'une force de cisaillement, liée à la circulation sanguine ;
- 5) Une réponse spécifique aux facteurs inflammatoires.

De plus, du point de vue pratique, le modèle *in vitro* doit être facile à utiliser, polyvalent, à un coût réduit et compatible avec le criblage à haut débit requis dans l'industrie pharmaceutique.

Actuellement, il n'existe pas un seul modèle qui englobe toutes les caractéristiques nommées précédemment. Ainsi, les modèles statiques sont jugés trop simples, mais ont l'avantage du faible coût et du criblage à haut débit. Par contre, les modèles complexes miment la structure et les interactions cellulaires de la BHE, mais sont difficiles à reproduire. Compte tenu de la grande diversité des modèles *in vitro* de la BHE, la sélection du modèle se fait en fonction du but de l'expérience, selon le choix des expérimentateurs.

Ainsi, le défi actuel consiste à mettre au point un modèle qui conserve les caractéristiques fondamentales de la BHE tout en restant compatible avec les exigences du criblage à haut débit. Également, ce modèle doit permettre la prédiction fiable de la perméabilité des NTCs à travers la BHE (43).

Afin de pouvoir évaluer l'intégrité et la qualité des modèles *in vitro* de la BHE construits, les techniques suivantes sont utilisées :

- 1) La mesure de la résistance de la monocouche de CEs et le calcul de la valeur de TEER;
- 2) L'évaluation de la perméabilité paracellulaire à l'aide de marqueurs hydrophiles fluorescents et le calcul des coefficients de perméabilité, P_e ou P_{eff} ;
- 3) La quantification de la présence des protéines de TJs et des AJs, ainsi que des principaux TMBRs.

Les données obtenues à la suite de la vérification de ces paramètres permettent de comparer différents modèles entre eux ainsi que de mesurer leur performance. Ces paramètres doivent être vérifiés avant d'utiliser ces modèles pour les tests de perméabilité des NCTs.

3.1 La valeur de TEER

Le calcul de la valeur de TEER s'appuie sur la mesure de la résistance électrique et reflète la conductance ionique de la voie paracellulaire de la couche cellulaire. C'est une méthode non invasive pour la quantification de l'intégrité et de la perméabilité cellulaire. Pour la mesure de la résistance d'un modèle Transwell®, on utilise deux électrodes qui sont placées l'une dans le compartiment donneur et l'autre dans le receveur, donc séparées par la couche cellulaire cultivée sur la membrane poreuse de l'insert (44). L'atteinte d'une valeur stable de TEER au bout de quelques jours indique que le modèle est à son maximum d'intégrité, ainsi que le moment opportun pour réaliser les essais de perméabilité.

Généralement, on mesure la résistance de la couche cellulaire (R_{Total}) et la résistance du filtre (R_{Insert}) dépourvu de cellules. La résistance ($R_{Endothelial}$) engendrée par la couche de cellules est calculée comme suit (Équation 1):

$$R_{Endothelial} (\Omega) = R_{Total} - R_{Insert} \text{ (Eq.1)}$$

La valeur de TEER est ensuite calculée en prenant en considération de la surface de l'insert (S , cm^2) sur laquelle les cellules ont été cultivées (Équation 2):

$$\text{TEER}_{\text{Endotelial}} (\Omega \times \text{cm}^2) = R_{\text{endothelial}} \times S \text{ (Eq.2)}$$

La résistance des modèles monocouches statiques est généralement mesurée à l'aide d'un voltmètre équipé d'électrodes en forme de baguettes « STX2/chopsticks electrodes » (Figure 1.6.) ou de chambres d'électrodes « Endohm chamber electrode » (Figure 1.6.), mais plus rarement avec des systèmes de mesure continue (CellZscope®). La résistance enregistrée dépend grandement du positionnement exact des « chopsticks », donnant ainsi des valeurs plus grandes, mais aussi plus variables selon l'expertise du manipulateur. Dans l'assemblage « Endohm chamber electrode », la chambre et le capuchon contiennent une paire d'électrodes concentriques. La disposition symétrique des électrodes à disques circulaires des deux côtés de la membrane génère une densité de courant plus uniforme. Les valeurs obtenues sont plus stables et la variabilité des résultats plus petite comparée aux électrodes « chopsticks » (45). Finalement, dans les modèles dynamiques microfluidiques, la résistance est mesurée par un assemblage inclus dans le modèle qui permet un monitoring continu de la formation de la monocouche endothéliale (46).

Le calcul de la valeur de TEER est une méthode facile et directe pour l'évaluation de l'intégrité du modèle construit. Toutefois, une simple valeur TEER fournit peu d'informations, donc elle devrait être accompagnée par les conditions de l'expérience qui ont mené à cette valeur. Le rapport des conditions de la mesure de la résistance et le calcul de TEER permettra une comparaison robuste entre les modèles établis dans les différents laboratoires de recherche.

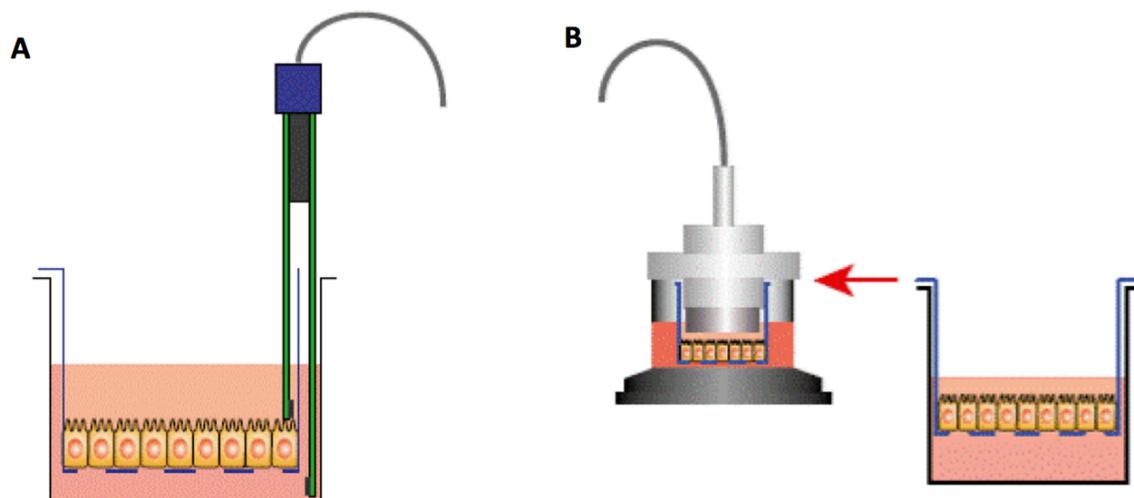


Figure 1.6. Mesure de la résistance de la couche cellulaire d'un modèle Transwell® en utilisant (A) les électrodes de type « chopsticks » et (B) les électrodes concentriques de la chambre Endohm®. Repris et adapté de [https://ebrary.net/24380/health/measurement transepithelial electrical resistance teer](https://ebrary.net/24380/health/measurement%20transepithelial%20electrical%20resistance%20teer).

3.2 La perméabilité endothéliale

Contrairement à la mesure de la résistance qui est une technique non invasive, le coefficient de perméabilité endothéliale (P_e) est évalué avec des petits marqueurs hydrophiles non électrolytiques. C'est un indicateur du flux paracellulaire, ainsi que de la taille des pores des TJs (44). Il s'agit donc d'une méthode quantitative complémentaire à la valeur de TEER. Ainsi un modèle étanche devrait posséder une haute valeur de TEER et un P_e bas.

Le critère le plus important dans le choix du marqueur permettant de mesurer la perméabilité paracellulaire ou jonctionnelle est le fait qu'il ne doit pas être un ligand pour les transporteurs d'influx ou d'efflux, des récepteurs endothéliaux du cerveau ou un substrat pour une enzyme endothéliale (45).

Les marqueurs de perméabilité sont soit conjugués avec une molécule fluorescente soit à un isotope radioactif. La conjugaison avec ^{14}C ou ^3H du sucrose, du mannitol ou de l'inuline constitue les marquages les plus fréquents. Les molécules radiomarquées fournissent des résultats très robustes, mais leur manipulation et stockage nécessitent des mesures de sécurité particulières. Les marqueurs hydrophiles fluorescents les plus utilisés sont la sodium

fluorescéine (NaFl) et les dextrans conjuguées à l'isothiocyanate de fluorescéine (47). Ces molécules ne révèlent pas avec une grande précision les changements qui se produisent dans la perméabilité de la monocouche, mais leur quantification par absorbance ou fluorescence est accessible à la plupart des laboratoires de recherche.

Le coefficient de perméabilité (Pe) est calculé selon la procédure suivante (48).

Tout d'abord, le volume clairé du compartiment apical vers le compartiment basal de la molécule testée est calculé selon l'équation 3:

$$\text{Volume clairé } (\mu\text{L}) = \frac{\text{Concentration basale} \times \text{Volume basal}}{\text{Concentration apicale}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Ensuite, la pente du volume clairé en fonction du temps correspond au produit : perméabilité \times surface (PS_{total}). La perméabilité du modèle est calculée selon l'équation 4 :

$$\frac{1}{\text{PS endothelial}} = \frac{1}{\text{PS total}} - \frac{1}{\text{PS insert}} \quad (\text{Eq. 4})$$

où: *PS endothelial* est le produit : coefficient de perméabilité \times surface de la monocouche de cellules; *PS total* est le produit coefficient de perméabilité \times surface du modèle au complet; *PS insert* est le produit coefficient de perméabilité \times surface du filtre seul, sans cellules.

Finalement, le coefficient de perméabilité Pe est calculé selon l'équation 5 :

$$\text{Pe} = \frac{\text{PS}_{\text{endothelial}} (\text{cm}^3/\text{s})}{\text{Surface du puits } (\text{cm}^2)} = \text{cm/s} \quad (\text{Eq. 5})$$

Les données de perméabilité recueillies de la littérature scientifique sont très diverses. Ainsi on considère généralement que les modèles *in vitro* sont utiles si les valeurs Pe sont supérieures d'un facteur 100 des valeurs *in vivo* (24).

3.3 L'évaluation de la présence des marqueurs spécifiques de la BHE

L'évaluation de la TEER et du coefficient Pe permettent de décrire la formation de la monocouche de CEs, mais n'évaluent pas la présence et la fonctionnalité des principaux TMBRs et des TJs. Ceci est particulièrement important à déterminer dans les modèles *in vitro* qui serviront pour le criblage des molécules utilisant ces voies de transport pour atteindre le cerveau. Les protéines des TJs, comme la CL-5, ZO-1 et OCL responsables de la régulation du transport paracellulaire, et les TMBRs, comme le GLUT-1, la Pgp, le LAT-1 impliqués dans le transport

transcellulaire, sont les protéines les plus souvent quantifiées. Les méthodes de quantification les plus utilisées sont la qPCR pour la quantification des gènes qui codent pour les protéines testées et le Western blot qui permet une analyse quantitative directe de ces protéines.

La qPCR est une méthode qui requiert peu d'optimisation, donc facile à implémenter comme évaluation de routine. Toutefois, cela permet de quantifier l'ARN messager (ARNm) qui code pour une protéine donnée, mais ne donne aucune indication si cet ARNm est traduit en protéine ou si cette protéine est fonctionnelle.

La méthode dite Western Blot quantifie les protéines présentes dans la cellule ou à sa surface. Cette méthode exige beaucoup plus d'optimisation pour la détermination de la quantité de protéines totales à analyser, l'anticorps et les dilutions à utiliser, etc. Toutefois, elle permet de quantifier directement la protéine traduite. Par contre, on ne peut pas obtenir d'informations sur la localisation des protéines dans la cellule, ou si le transporteur est fonctionnel.

L'immunocoloration est une méthode microscopique qualitative pour évaluer la localisation des protéines. Ainsi on l'utilise pour confirmer la localisation membranaire des transporteurs comme le GLUT-1, LAT-1 et la Pgp et la présence tout le long de la membrane des protéines de TJs. L'immunocoloration est aussi utilisée pour authentifier le type cellulaire isolé. Par exemple, le facteur von Willebrands est utilisé pour l'identification des CEs.

Il est maintenant évident et obligatoire d'attester la présence de ces protéines, analyse qui devrait compléter et soutenir les données de TEER et de perméabilité.

4. Modèles *in vitro* de la BHE

4.1 Les modèles statiques

La notion de « modèle statique » ou « modèle 2D » désigne les modèles qui sont construits dans une plaque de type Transwell®. Ce sont des plaques qui contiennent des inserts possédant des membranes en polycarbonate (PC) ou polyester (PET) perméables. La présence de l'insert permet de créer une barrière et ainsi former deux compartiments individuels distincts. L'intérieur de l'insert, qu'on appelle le côté apical, sert à mimer la lumière du capillaire sanguin, tandis que du côté basolatéral, le puits qui accueille l'insert simule le parenchyme cérébral. La structure poreuse de la membrane permet aux deux compartiments d'échanger leur composition. Ainsi, ces modèles sont utiles dans les études de perméabilité des médicaments et de migration

cellulaire à travers la BHE (49).

4.1.1 Les modèles monocultures

Dans le modèle monocellulaire, la BHE est représentée par une monocouche de CEs, cultivées sur la membrane de l'insert (Figure 1.7). Ces modèles présentent l'avantage d'être des modèles polyvalents, faciles à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche. Le fait qu'ils utilisent peu de matériel cellulaire les rend très abordables, ce qui facilite leur implémentation dans le processus haut débit, exigé dans l'industrie pharmaceutique. L'absence des ACs et des PCs dans la structure du modèle empêche de recréer complètement certains des aspects et la complexité de la BHE *in vivo*. Toutefois, plusieurs modèles monocouches ont été rapportés pour leur pertinence dans l'évaluation de la perméabilité des molécules au cerveau (50, 51).

L'utilisation d'agents qui augmentent l'AMP cyclique intracellulaire (52), l'emploi de l'hydrocortisone (53) ainsi que d'insuline, de transferrine et du sélénite de sodium dans le milieu de culture des modèles augmentent l'intégrité de la monocouche. Également l'utilisation d'un milieu de culture préalablement conditionné avec des ACs constitue une autre méthode d'optimisation des modèles monocouches (54).

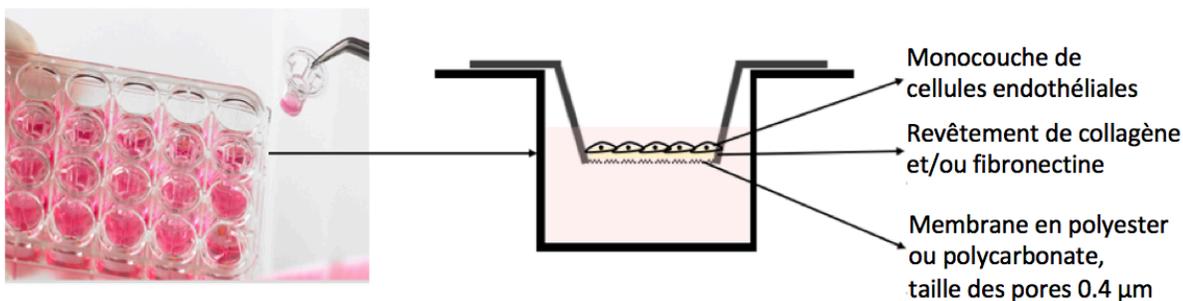


Figure 1.7. Construction d'un modèle monocouche des CEs.

4.1.2 Les modèles de co-culture en bicouche

Les modèles multicellulaires sont constitués de CEs auxquelles on ajoute un ou plusieurs types de cellules de soutien (Figure 1.8.). Dans le modèle de co-culture avec contact, les cellules de soutien sont cultivées sur la partie inverse de l'insert (Figure 1.8. a et b), tandis que, dans le modèle sans contact, les cellules sont cultivées sur le fond de la plaque du côté basal (Figure 1.8. c et d). Grâce à la porosité de la membrane de l'insert, la disposition des cellules dans le modèle avec contact permet aux cellules de communiquer entre elles par les projections cellulaires, tandis que dans les modèles sans contact, les cellules communiquent via les facteurs de croissance qui sont directement sécrétés dans le milieu de culture.

Les ACs sont les cellules qui sont employées le plus souvent dans la conception des modèles co-culture (Figure 1.8. a et c). Ainsi, le modèle co-culture avec contact de CEs de souris avec les ACs primaires de rat a donné une TEER de $130 \Omega \times \text{cm}^2$, valeur comparable à celle de la monocouche de CEs. Toutefois, le modèle sans contact a résulté dans une TEER de $190 \Omega \times \text{cm}^2$ (55). Pour un autre modèle issu de cellules primaires de rat, la co-culture a donné une TEER de $150 \Omega \times \text{cm}^2$ dans le modèle avec contact et de $130 \Omega \times \text{cm}^2$ pour celui sans contact. Les deux ont montré une augmentation de TEER par rapport à la monocouche, dont la TEER était de $90 \Omega \times \text{cm}^2$ (56).

L'évaluation de l'impact des PCs sur le développement de la BHE et leur impact sur l'étanchéité du modèle est plus récente. Dans une étude, la co-culture des CEs avec PCs, avec ou sans contact, a donné des TEER de $200 \Omega \times \text{cm}^2$, valeurs augmentées de 40 % par rapport à celle de la monocouche (48).

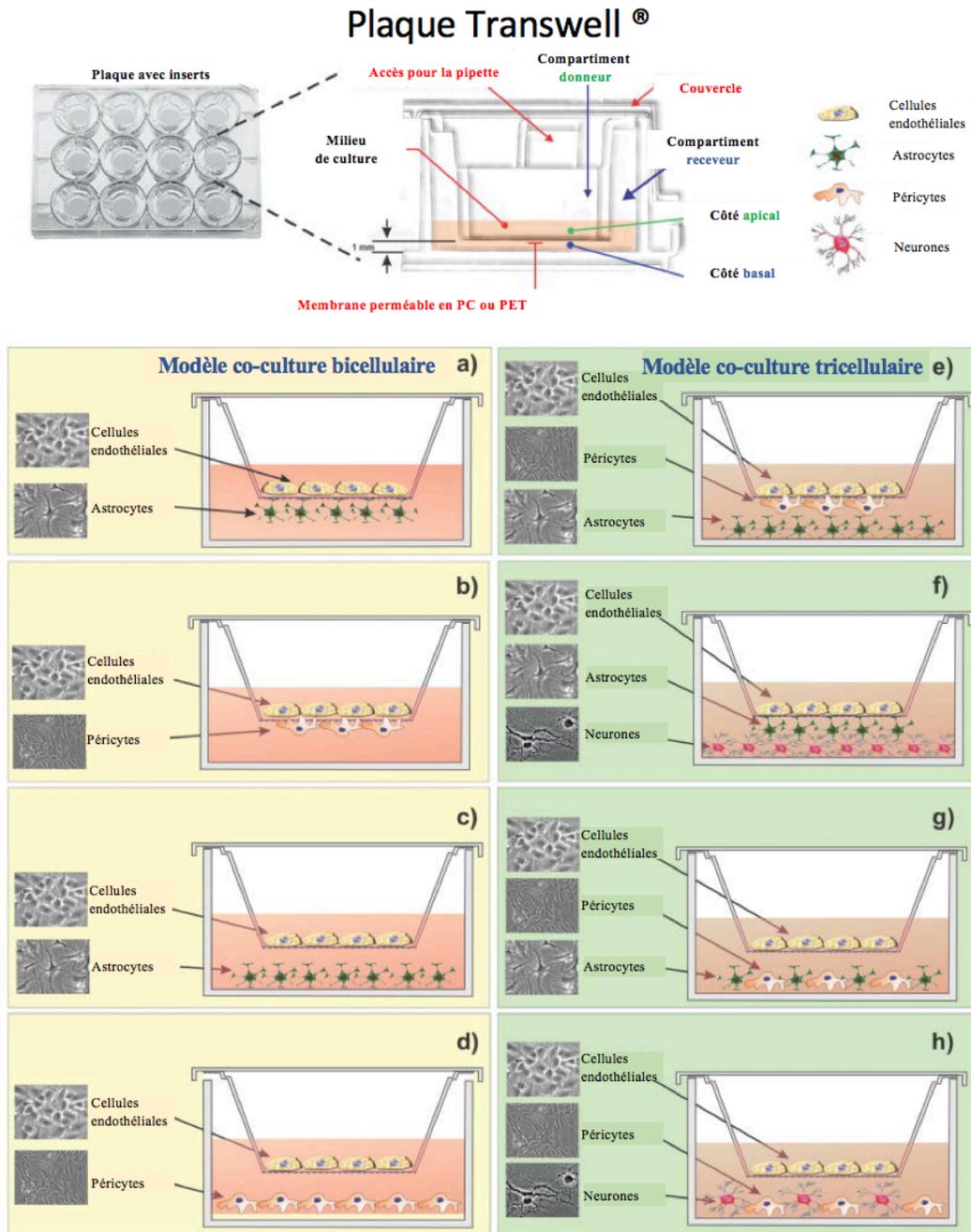


Figure 1.8. Modèles *in vitro* de la BHE de type Transwell® en bi- ou tri-culture. Modèles co-culture bicellulaire de CE avec les AC et les PC dans l'assemblage avec contact (a et b) et sans contact (c et d). Modèles co-culture tricellulaires des CE avec les PC, les AC et/ou les neurones (e, f, g, h). Repris, adapté et traduit avec permission de (57), disponible sur :

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17460441.2017.1253676>

4.1.3 Les modèles de co-culture tricellulaire

Le modèle tricellulaire permet d'atteindre un niveau plus important de ressemblance avec la structure *in vivo* de la BHE, dû à la présence de trois types cellulaires à l'assemblage du modèle. Ainsi, des ACs, PCs ou neurones sont cultivés soit sur la partie inverse de l'insert (Figure 1.8. e et f), soit au fond de la plaque (Figure 1.8. g et h).

L'emplacement des cellules dans le modèle *in vitro* ne doit pas être nécessairement celui retrouvé *in vivo*, mais plutôt celui qui donne les valeurs les plus hautes de TEER et les plus basses de perméabilité des marqueurs fluorescents. L'agencement idéal des cellules doit aussi avoir un impact sur la polarisation et l'expression des principaux TMBRs et des TJs. Les cellules peuvent provenir d'une seule source, comme le rat, ou des sources différentes. L'avantage de ces modèles est que toutes les cellules de la BHE sont incluses dans la structure du modèle. Ainsi l'impact de chaque type cellulaire sur la structure globale est pris en compte. Toutefois, même si attrayant, l'utilisation de ces modèles pour les études de perméabilité s'avère complexe, car le nombre élevé de type cellulaire réduit la faisabilité et la reproductibilité du modèle. Parallèlement, le coût de modèle augmente considérablement avec le nombre de types cellulaires utilisés. Un modèle primaire tricellulaire de rat a montré une valeur de TEER de $354 \Omega \times \text{cm}^2$ et a conclu que l'ajout des ACs et des PCs résultait en des TEER significativement plus grandes comparées à la monocouche et à la bicouche (56). Dans une autre étude, un modèle tricellulaire avec des CEs humaines a donné des valeurs d'environ $40 \Omega \times \text{cm}^2$, valeurs statistiquement plus élevées comparées à la monocouche, mais plus faibles que celles des modèles bicouche (58). Dans le cas d'un modèle tricellulaire primaire porcin, les valeurs de TEER étaient de $1052 \Omega \times \text{cm}^2$, statistiquement plus haute que celle de la monocouche, mais pas celle du modèle bicouche (59). Ainsi, les données des modèles tricellulaires semblent indiquer que l'utilisation de trois types cellulaires pourrait ne pas être indispensable pour étudier la perméabilité des actifs thérapeutiques ou diagnostiques.

4.2 Les modèles dynamiques

Les modèles dynamiques ont été développés pour prendre en compte l'importance de la force de cisaillement exercée par le sang sur les CEs des capillaires sanguins. *In vivo*, la force de cisaillement régule l'adhésion et la survie cellulaire, la formation des TJs et l'augmentation de

l'expression des protéines du cytosquelette, la production de substances vasoactives ainsi que la polarisation cellulaire (60). *In vitro*, la force de cisaillement contribue à la polarisation des cellules, augmente les niveaux d'expressions des protéines des TJs ainsi que celles des TMBRs (61). L'importance de la force de cisaillement a été montrée dans une étude qui comparait un modèle Transwell® avec un modèle DIV-BBB (dynamic *in vitro* - BBB model), les deux utilisant des lignées cérébrales humaines de CEs et d'ACs. Le DIV-BBB montrait une valeur TEER de $1200 \Omega \times \text{cm}^2$ stable pendant 21 jours, contrairement à une valeur de $70 \Omega \times \text{cm}^2$ pour le modèle Transwell® qui montrait des signes de sénescence vers le jour 14 (62).

Le modèle le plus connu est le DIV-BBB, qui utilise des fibres creuses poreuses en polypropylène pour reproduire la structure et la forme du capillaire. Dans ce modèle, les CEs sont cultivées à l'intérieur des fibres, tandis que les ACs sont cultivées sur leur surface extérieure. Le milieu de culture est pompé en continu à travers ces fibres avec un débit contrôlé, recréant ainsi l'écoulement du sang et la force de cisaillement qu'il exerce sur les CEs (63). Ce modèle a l'avantage de maintenir les cellules vivantes et fonctionnelles pendant des mois. Toutefois, l'accès aux cellules durant l'expérience est difficile et leur évaluation morphologique peut être réalisée seulement une fois l'essai terminé et le modèle démonté. De plus, le montage de ce modèle demande une habileté technique importante, du temps et une quantité considérable de cellules. L'implémentation de ce modèle dans un processus de criblage à haut débit est compliquée, son utilité étant plutôt valorisée dans les études des maladies cérébrales avec des troubles hémodynamiques.

4.3 Les modèles microfluidiques

Les modèles microfluidiques (μ BBB) permettent une réduction considérable de la taille des modèles BHE, diminuant ainsi la quantité cellulaire requise pour la construction du modèle. Dans ces modèles, les cellules sont également cultivées sur des membranes poreuses placées à l'interface de deux microcanaux, ce qui permet un flux du milieu de culture. Habituellement, ces modèles possèdent des électrodes intégrées pour une mesure continue de TEER. Le corps du modèle étant fait en polydiméthylsiloxane, cela permet une image claire de l'état des cellules intégrées dans le modèle. Parmi les modèles μ BBB, on peut retrouver des modèles 3D, intégrant

des fibres creuses dans l'assemblage, ainsi que des modèles plans (2D) dans lesquels les cellules sont cultivées sur des membranes en PET ou PC à la manière du modèle Transwell® (64).

Le modèle μ BBB plan en co-culture avec des ACs montre des valeurs de TEER de $250 \Omega \times \text{cm}^2$ et des valeurs de perméabilité plus faible comparativement au modèle endothélial monocouche (65). Dans les modèles μ BBB plans, la force de cisaillement est beaucoup plus basse que celle obtenue dans les modèles 3D dynamiques. De même, les valeurs de TEER et de perméabilité des marqueurs fluorescents se rapprochent de celles des modèles statiques. Le μ BBB tricellulaire 3D, qui utilise la co-culture avec des ACs et des PCs, a montré une TEER de $\sim 300 \Omega \times \text{cm}^2$, donc 2 fois plus élevée que celle du modèle monocouche (66). Le principal avantage de ce modèle reste la petite quantité de matériel cellulaire nécessaire. Toutefois, les modèles les plus complexes sont difficiles à construire et n'ont pas encore été adoptés par l'industrie pharmaceutique pour le criblage des bibliothèques de molécules.

4.4 Le modèle PAMPA-BBB

Le modèle non cellulaire PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) a été introduit pour la première fois en 1998 comme modèle à haut débit pour prédire l'absorption gastro-intestinale des médicaments (67). Le test de perméabilité PAMPA se développe généralement dans une plaque 96 puits. Chaque puits dispose d'un compartiment donneur contenant un insert et d'un compartiment receveur. Les inserts possèdent une membrane poreuse sur laquelle une couche de lipides est déposée sous forme d'une solution dont le solvant est volatil. Pour les modèles PAMPA-BBB, les lipides incorporés sont extraits du cerveau du porc et dissous dans du dodécane. Les études de perméabilité sont généralement réalisées et maintenues au pH=7,4, mimant ainsi le pH physiologique du sang (68). Actuellement, le modèle PAMPA est reconnu comme une méthode reproductible de criblage à haut débit et à faible coût. Elle sert à l'évaluation de la perméabilité des composés qui diffusent vers le cerveau par transport passif. Étant donné que le modèle est dépourvu de présence de TMBRs et de TJs, il peut principalement classer les molécules testées selon leur lipophilie et leur coefficient de partage (43).

Finalement, malgré la disponibilité de plusieurs modèles *in vitro*, il n'en existe pas un qui soit globalement reconnu comme substitut aux études animales. Ainsi une combinaison d'essais est toujours employée pour l'évaluation de la perméabilité des NTCs au cerveau (Figure 1.9.).

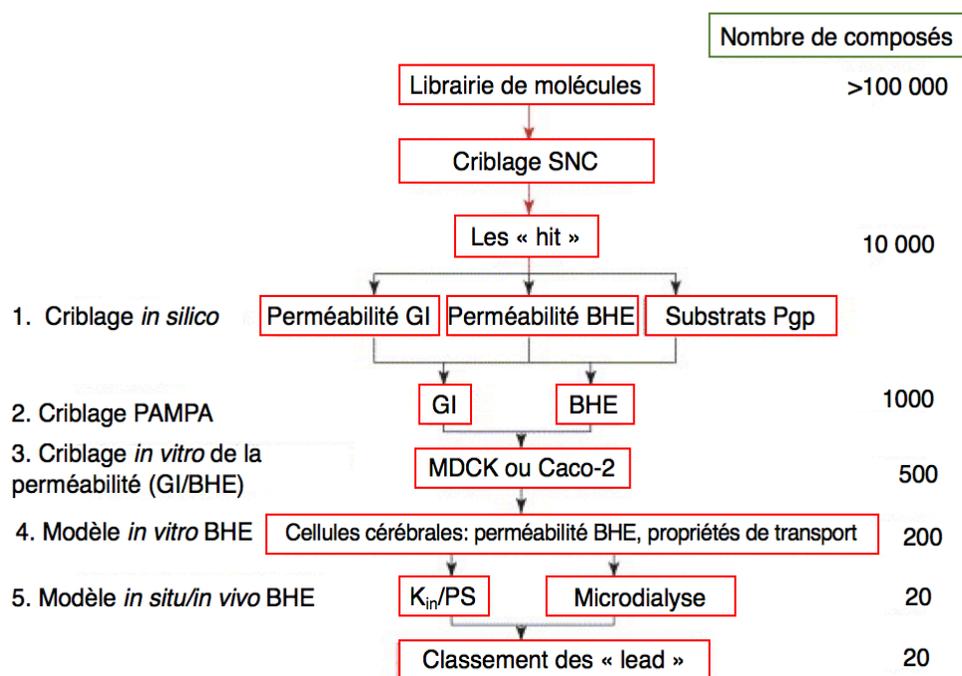


Figure 1.9. Stratégie proposée pour la prédiction de la perméabilité des NTCs à la BHE. Organigramme illustrant la séquence de criblage des « hits » du SNC pour aboutir au classement des principaux composés pour un passage optimal de la BHE. Repris, adapté et traduit avec permission de (69).

4.5 Les cellules utilisées dans la construction des modèles *in vitro*

4.5.1 Les cellules primaires

Les cellules primaires sont isolées directement des cerveaux frais. L'isolation des CEs est amorcée à partir du cerveau entier dépourvu des méninges. La matière grise subit plusieurs étapes de digestions mécaniques et enzymatiques qui résultent dans l'isolation des capillaires; ceux-ci sont mis en culture et donnent des CEs en 5 à 7 jours (70). Les cellules sont cultivées dans des plaques recouvertes de collagène/fibronectine utilisant un milieu de culture enrichi, composé de facteurs de croissance, de modulateurs d'expression des TJs et de substances servant à enrichir la culture en CEs. L'identité des cellules est vérifiée par immunocoloration du facteur VIII/von Willebrand (71).

Les ACs sont isolés des cortex cérébraux dépourvus de méninges, qui généralement sont soumis à une seule digestion mécanique. L'enrichissement en ACs est réalisé par des passages successifs de la culture obtenue. La confirmation de l'identité des ACs se fait par immunocoloration de la protéine acide fibrillaire gliale (ang. Glial fibrillary acidic protein ou GFAP) (56).

Les PCs sont obtenus à partir de la même préparation que les CEs. L'enrichissement de la culture en PCs se fait par des passages cellulaires successifs pendant deux semaines et leur croissance sur une plaque non recouverte de collagène, contrairement aux cultures des CEs. Une coloration positive pour le facteur bêta de croissance dérivé des plaquettes (ang. Beta type Platelet-derived growth factor receptor (PDGFRB)) est indicatrice d'une culture de PCs (48).

Des cellules primaires ont été obtenues à partir de cerveaux des bovins (72), des porcs (59), rats (56), souris (73), ou encore humains (74). L'isolation de CEs des cerveaux de bovins et de porcs aboutit à un très grand nombre de cellules primaires et les modèles *in vitro* construits à partir de ces cellules présentent de hautes valeurs de TEER (59, 75). Toutefois, ce ne sont pas des animaux couramment utilisés dans la recherche, ce qui rend leur disponibilité complexe.

Dans le cas du rat et de la souris, le rendement d'isolation est beaucoup plus bas (~ 2 millions de cellules/cerveau) (45). Ces petits animaux de laboratoire, bien connus dans la recherche, présentent un très grand intérêt dû à leur disponibilité. Fait important, les modèles bâtis avec des cellules de rats ou souris peuvent être validés avec les données obtenues chez l'animal vivant, ainsi établissant la corrélation *in vitro-in vivo*. Ceci contribue à transférer une partie des essais précliniques sur des modèles *in vitro* et réduire ainsi le nombre d'animaux sacrifiés, tout en conservant une recherche rigoureuse avec des résultats reproductibles.

L'accès limité au tissu cérébral humain réduit la possibilité d'isoler des CEs humaines primaires saines. Ainsi, les cellules primaires humaines proviennent souvent de tissus extraits lors des interventions chirurgicales sur le cerveau malade (cas d'épilepsie grave, par exemple).

Les cellules primaires sont des outils très précieux pour la construction des modèles *in vitro* de la BHE. Ces cellules possèdent les caractéristiques *in vivo* de la BHE qui ne sont pas perdues, lors du processus de transformation qui mène à l'obtention des lignées cellulaires. Toutefois, l'isolation est un processus qui exige du temps et des milieux de culture spécifiques. Ceci est donc plus coûteux et n'aboutit pas toujours à des cultures suffisamment enrichies. De plus, les

cellules obtenues se différencient rapidement, limitant leur usage à des passages inférieurs à 5.

4.5.2 Les lignées cellulaires

Les lignées cellulaires sont généralement des cellules qui ont été génétiquement transformées afin d'empêcher le raccourcissement du télomère et ainsi augmenter le nombre de passages cellulaires possibles. La majorité d'entre elles sont offertes commercialement, leur croissance rapide et leur culture ne requièrent pas des conditions spécifiques. L'utilisation de ces cellules dans les laboratoires de recherche permet l'exploration rapide et à faible coût des hypothèses de recherche. Toutefois, les résultats obtenus doivent être interprétés avec précaution, car les lignées cellulaires peuvent perdre des fonctions spécifiques aux tissus et acquérir un phénotype moléculaire différent des cellules originelles *in vivo* (76, 77)

Les lignées cellulaires utilisées dans le montage des modèles de la BHE peuvent être classifiées en deux catégories : les cellules d'origine cérébrale et les cellules d'origine non cérébrale.

Les lignées de CE cérébrales les plus utilisées sont : la lignée humaine hCME /D3, la lignée de rat RBE4 et celle de souris bEnd.3 (78). Étant donné que la modélisation *in vitro* de la BHE a pour but de créer un modèle prédictif de la perméabilité des médicaments chez l'humain, il est impératif d'avoir des lignées bien caractérisées. De plus, l'accès aux cellules primaires humaines étant très limité, la disponibilité d'une lignée cellulaire dérivée du cerveau humain est primordiale. Actuellement, les monocouches des lignées humaines sont connues pour développer des modèles plus perméables comparativement aux autres lignées animales (58, 79). Les lignées cellulaires de rat et de souris ont le grand avantage de fournir des données qui peuvent être corrélées avec celles obtenues *in vivo* chez le même animal. Effectivement, dans l'industrie pharmaceutique, les études *in vivo* de la phase préclinique se déroulent chez au moins une espèce de rongeurs, le plus souvent chez la souris ou le rat. Les modèles *in vitro* validés permettraient donc d'obtenir des résultats préliminaires prédictifs qui se compareraient avec les valeurs obtenues chez l'animal vivant. L'accès facile à un grand nombre de cellules primaires de bovins et de porcs rend l'utilisation de lignées cellulaires de ces animaux moins avantageuse. On peut en nommer la lignée bovine t-BBEC-117 et la lignée porcine PBMEC/C1-2 (43). La lignée cellulaire d'ACs de gliome de rat C6 (45) et la lignée cellulaire humaine U87 dérivée de glioblastome (80) servent souvent à remplacer les ACs primaires dans la construction des

modèles *in vitro* de la BHE.

Les lignées non cérébrales les plus connues employées dans la construction des modèles pour l'évaluation de la perméabilité à travers la BHE sont la Caco-2 et la MDCK-MDR1. Ces modèles représentent les tests de perméabilité de routine dans les phases précoces du développement du médicament de l'industrie pharmaceutique (81). Caco-2, lignée épithéliale humaine d'adénocarcinome colorectale, est la lignée de référence pour les tests de perméabilité. Elle est particulièrement intéressante car ces cellules expriment un grand nombre de Pgp humaine, un transporteur d'efflux qui s'oppose au passage transcellulaire des médicaments. Elles expriment également des TMBRs humains. Les monocouches de Caco-2 montrent des hautes valeurs de TEER $\sim 1000 \Omega \times \text{cm}^2$ pouvant aller jusqu'à $\sim 2000 \Omega \times \text{cm}^2$ pour la vinblastine-Caco-2 (VB-Caco-2), lignée exprimant plus de transporteurs Pgp que la Caco-2 régulière (82). Le grand inconvénient des cellules Caco-2 est que la monocouche prend environ trois semaines pour se développer, contrairement aux autres lignées cellulaires qui prennent 2 à 5 jours (83). La lignée MDCK-MDR1 est une lignée de rein de chien transfectée avec le gène codant pour la Pgp humaine (MDR1). Les cellules donnent des monocouches avec des TEER relativement basses ($\sim 100 \Omega \times \text{cm}^2$) (82), mais elles ont l'avantage d'exprimer le transporteur d'efflux Pgp et de développer des monocouches en 2-3 jours.

Les cellules non dérivées du cerveau, bien qu'utilisées couramment dans l'industrie pharmaceutique, ne possèdent pas l'expression phénotypique des cellules cérébrales et donc peuvent refléter seulement partiellement le profil de perméabilité des molécules testées.

De plus, ces cellules viennent avec leur bagage phénotypique caractéristique aux cellules épithéliales du côlon ou de reins. Par exemple, la Caco-2 et la MDCK-MDR1 n'expriment pas la CL-5, une protéine-clé des TJs de la BHE, impliquée dans la régulation du transport paracellulaire (9).

4.5.3 Les cellules souches

Les CE dérivées des cellules souches pluripotentes humaines ont été proposées comme une source renouvelable de cellules saines pour la conception des modèles *in vitro* de la BHE. Elles sont présentées comme solution au manque de cellules humaines nécessaires pour la construction des modèles de criblage de médicaments (84). Deux types de cellules souches pluripotentes sont offerts actuellement : les cellules souches embryonnaires et les cellules

souches pluripotentes induites (iPSC), qui peuvent se différencier dans tous les types de cellules de l'organisme (85). Une fois transformées en CEs cérébrales, elles sont positives pour l'immunocoloration de tous les marqueurs spécifiques à ces cellules. De plus, les valeurs de TEER pour un modèle co-culture avec les ACs donnaient $1450 \Omega \times \text{cm}^2$ (86). L'avantage des cellules souches comparativement aux cellules primaires est leur capacité de croissance théoriquement illimitée, tout en conservant un phénotype uniforme tout au long de la différenciation cellulaire. De plus, il est possible de dériver, à partir des mêmes cellules souches, des CEs, des PCs et des ACs. Dû au fait que l'origine des trois types cellulaires est la même, leur utilisation dans le développement d'un modèle BHE permettrait de recréer un microenvironnement cérébral synergique (87). Toutefois, les cellules souches embryonnaires sont prélevées d'un embryon de 5-7 jours post-fécondation, ce qui implique la destruction de l'embryon viable, un enjeu éthique majeur. Les iPSC proviennent des cellules adultes qui ont été ramenées à l'état non différencié. Ce processus implique l'utilisation des vecteurs viraux qui peuvent potentiellement mener à la formation des tumeurs dans la culture des CEs dérivées. Ensuite, l'obtention des cellules différenciées et leur purification subséquente nécessitent des milieux de culture dispendieux et complexes. L'optimisation du processus ainsi que la réduction du temps d'obtention de ces cellule permettraient leur plus vaste utilisation dans la recherche fondamentale (85).

5. Validation des modèles de BHE

Une étape importante dans le développement d'un nouveau modèle est sa validation. Ceci a pour but d'évaluer le pouvoir prédictif du modèle et ultimement sa capacité à servir comme substitut aux animaux vivants. La validation est réalisée par la comparaison des données obtenues *in vitro* avec les données obtenues *in vivo*, idéalement chez la même espèce, et la détermination statistique de la corrélation *in vitro-in vivo* (IVIVC).

L'IVIVC a été définie par la FDA comme « un modèle mathématique prédictif décrivant la relation entre une propriété *in vitro* d'une forme posologique et une réponse *in vivo* ». Généralement, la propriété *in vitro* est la vitesse, l'ampleur de la dissolution ou de la libération du médicament, tandis que la réponse *in vivo* est la concentration plasmatique du médicament ou la quantité de médicaments absorbée. L'IVIVC est utilisée dans le développement des NTCs

dans le but de réduire le nombre des participants humains dans les études d'optimisation des formulations du NTCs (88).

Quantitativement, cette corrélation est représentée par le coefficient de détermination r^2 , qui estime à quel point l'équation de régression linéaire décrit la distribution des points. Sa valeur se situe entre 0 et 1 et un $r^2=1$ signifie que la droite de régression est capable de déterminer 100% de la distribution des points.

Dans les étapes précoces du développement du médicament, l'IVIVC permettrait de remplacer partiellement le nombre des animaux utilisés pour les tests de criblage des bibliothèques de NTCs. Habituellement, les études précliniques se déroulent chez la souris ou le rat. Ainsi, un modèle *in vitro* de la BHE de souris ou de rats a l'avantage d'être corrélé avec des données facilement obtenues *in vivo* et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés. Étant donné que la perméabilité de la BHE chez l'humain est l'objectif ultime de ce type de recherche, les données peuvent aussi être corrélées avec des données *in vivo* obtenues chez l'homme, lorsqu'elles existent, ou avec les modèles de souris humanisées.

5.1 Évaluation *in vivo* de la perméabilité de la BHE

Les données *in vivo* peuvent être obtenues selon les méthodes suivantes :

1) Le ratio cerveau/sang (plasma) ou logBB évalue l'ampleur de la pénétration au cerveau d'un NTC. Le ratio se calcule en divisant la concentration en actif retrouvée dans le cerveau par celle déterminée dans le sang (ou plasma) au même temps d'analyse. La détermination du logBB basée seulement sur un temps unique de prélèvement dépend grandement du temps de prélèvement choisi, contrairement à la pharmacocinétique de la molécule évaluée. La détermination de l'aire sous la courbe de la concentration de la molécule dans le cerveau et dans le sang est plus utile, mais requiert plusieurs animaux par temps de prélèvement, ce qui augmente les coûts de l'expérience. Le logBB n'est pas considéré comme une méthode pure pour l'évaluation de la perméabilité à travers la BHE, car la distribution de molécules au cerveau est affectée par des facteurs comme le métabolisme et la liaison aux protéines plasmatiques (69).

2) La détermination du K_{in} évalue la vitesse de la pénétration de la molécule dans le tissu cérébral. Cela est considérée la méthode de référence, ou « gold standard », pour l'évaluation de la perméabilité de la BHE. Cette méthode est réalisée en perfusant *in situ* le cerveau avec de

la solution physiologique. La composition de cette solution peut être contrôlée de manière à évaluer la liaison aux protéines plasmatiques. Les valeurs obtenues peuvent être comparées entre différents tissus et peuvent être suivies durant les changements pathologiques (69).

Parmi d'autres méthodes pour l'évaluation de la perméabilité BHE *in vivo*, on compte la microdialyse qui évalue la quantité d'actifs libres dans le liquide extracellulaire du parenchyme cérébral, l'évaluation de la perméabilité chez les animaux knock-out (69), ainsi que l'évaluation de l'index d'absorption dans le cerveau suite à l'injection des molécules conjuguées à des isotopes radioactifs (87).

Toutefois, les méthodes *in vivo* sont surtout efficaces pour les petites molécules et ne permettent pas toujours de discriminer entre le composé parent et son métabolite. De plus, l'homogénéisation du cerveau pour l'analyse ne permet pas différencier entre la teneur en actif dans le compartiment vasculaire, cérébral, extracellulaire ou intracellulaire. En outre, il est impossible de faire plusieurs échantillonnages du même animal, ce qui implique une variabilité des résultats obtenus (87).

5.2 Choix des molécules

Généralement, l'évaluation du coefficient P_e *in vitro* et du $\log BB$ ou K_{in} *in vivo* est réalisée avec des petites molécules, dont le profil de passage est connu. Les molécules choisies doivent posséder des propriétés physicochimiques différentes. Ainsi il est important de considérer leurs masses molaires, le coefficient de partition octanol/eau ($\log P$), la surface polaire et le nombre d'hydrogènes donateurs et accepteurs. Il est impératif de choisir des molécules qui sont des substrats des transporteurs d'efflux, notamment la Pgp, et des substrats d'influx (89). Ainsi, le modèle *in vitro* validé pourrait être utilisé pour le criblage des molécules qui utilisent différentes voies de transport pour passer la BHE. L'utilisation d'un grand nombre de molécules avec de différentes caractéristiques pour la validation du modèle augmente son pouvoir prédictif.

5.3 Classement des molécules

Généralement, les molécules choisies pour l'IVIVC font parties de 3 groupes :

- SNC⁺ - les molécules qui se rendent facilement au cerveau,
- SNC^{+/-} - les molécules qui passent moyennement au cerveau,
- SNC⁻ - les molécules qui ne passent pas au cerveau.

Le classement des molécules testées permet d'établir des zones de performance du modèle testé. Par exemple, si suite à la corrélation des données *in vitro* d'un modèle avec les données *in vivo*, le r^2 est relativement bas, l'interprétation des résultats devrait se faire par catégorie de molécules. Ainsi un modèle pourrait être capable de prédire la perméabilité des molécules SNC⁺, mais non de la SNC⁻. La classification des molécules selon leurs propriétés physicochimiques ou selon quel mécanisme elles utilisent pour atteindre le cerveau est une autre méthode de classification des molécules testées.

6. Mise en place du projet de recherche

Initialement, le travail pour ce projet de recherche a commencé avec le concept de développer un modèle *in vitro* de la BHE tricellulaire à partir de cellules primaires. Le modèle primaire, qui est dénommé PrimB3, se proposait d'être composé de CEs, de PCs et d'ACs, tous isolés de cerveaux de souris C57BL/6. Ce modèle se voulait conçu pour le criblage des molécules, rapide et reproductible d'usage. L'utilisation de cellules avec la même origine, ainsi que de cellules de soutien, devait se traduire en un modèle possédant des caractéristiques *in vivo* comme l'expression des TJs et les TMBRs propres aux cellules cérébrales. De plus, ce modèle devait montrer un plus haut degré d'étanchéité comparé aux modèles mono- et bi-couches.

Les résultats préliminaires ont changé l'approche du projet et nous ont incité à nous intéresser davantage au montage et à la caractérisation d'un modèle monocouche.

Globalement, le projet s'appuie sur des résultats préliminaires du candidat au doctorat Florian Bernard, qui a développé et validé des protocoles d'isolation à partir des souris et caractérisé les trois types cellulaires composant la BHE : les CEs, les PCs et les ACs.

6.1 Hypothèse de recherche

L'hypothèse de recherche supposait que l'utilisation de CEs primaires de souris pour le développement et la construction d'un modèle *in vitro* de la BHE se traduirait par un modèle adéquat pour le criblage des médicaments du SNC, avec une forte corrélation avec les données *in vivo*.

Dans l'ensemble, ce projet de recherche avait pour but de développer, caractériser et valider un modèle multicouche de la BHE construit à partir de cellules primaires. Dans ce contexte, il a été proposé de développer un modèle monocouche préliminaire, à partir de CEs primaires, rapide et reproductible d'usage. Ce modèle devait posséder des caractéristiques *in vivo* majeures comme l'expression des jonctions cellulaires et des TMBRs propres aux CEs cérébrales. La validation du modèle serait effectuée avec des données de perméabilité d'un groupe de composés chimiques et obtenues chez la souris. En parallèle, un modèle monocouche de la BHE, bâti à partir de la lignée cellulaire de CEs murines b.End3, serait étudié. La performance et la pertinence des cellules primaires dans la construction d'un modèle pour l'évaluation de la perméabilité des composés chimiques à travers la BHE seraient comparées au modèle des b.End3. Ceci permettrait de mettre en valeur les avantages et les limitations de l'utilisation des cellules primaires par opposition aux cellules issues d'une lignée cellulaire.

6.2 Objectifs de recherche

Pour vérifier l'hypothèse de recherche, différents objectifs ont été établis.

Objectif I: Assembler les modèles monocouches et évaluer leurs caractéristiques.

1. Maîtriser le protocole d'isolation et d'enrichissement des CEs primaires.
2. Vérifier l'expression des transporteurs, des TJs et des TMBRs des CEs primaires et des b.End3 en culture et dans les systèmes Transwell®.
3. Évaluer l'étanchéité des modèles des systèmes Transwell®.

Objectif II: Valider les modèles par la comparaison *in vitro/in vivo* de la perméabilité de substances actives de référence.

1. Établir les formulations optimales pour chaque molécule à tester choisie pour les essais *in vitro* et *in vivo* :
 - a. Molécules SNC⁺ : chlorpromazine, caféine, midazolam
 - b. Molécules SNC⁻ : aténolol, théophylline, ténoxicam, vérapamil
2. Évaluer le coefficient de perméabilité (P_e) des substances actives *in vitro* dans chacun des modèles.
3. Évaluer le ratio de distribution cerveau-plasma ($\log BB$) *in vivo* chez la souris C57BL/6.
4. Comparer statistiquement les deux modèles et conclure sur la pertinence des modèles pour prédire la perméabilité à travers la BHE des molécules testées.

Chapitre 2 : Essais préliminaires sur le modèle tricellulaire

PrimB3 : mise en place des modèles bicouches

1. Introduction

Le modèle PrimB3 est un modèle *in vitro* primaire tricellulaire de la BHE. Il est composé de CEs, des PCs et des ACs, tous isolées de cerveaux de souris C57BL/6. Les modèles tricellulaires ont été présentés à la section 3.1.3 du Chapitre 1. Ce projet de maîtrise a commencé avec l'objectif de construire et d'évaluer le modèle PrimB3 pour son utilisation dans le criblage des médicaments et des nanoparticules. Principalement, le projet visait à exploiter les avantages d'un modèle tricellulaire, plus représentatif de la structure *in vivo* de la BHE, comparativement aux modèles mono- ou bi- couches. De plus, l'assemblage du modèle était entièrement réalisé avec des cellules ayant la même origine, ce qui devrait mener à un modèle synergique, comparativement aux modèles qui utilisent des cellules de différentes espèces. Le projet s'appuyait sur des résultats préliminaires du candidat au doctorat Florian Bernard, qui a développé et validé des protocoles d'isolation et caractérisé les trois types cellulaires composant la BHE : les CEs, les PCs et les ACs.

Avant de passer à la construction du modèle tricellulaire optimal et de déterminer l'emplacement des PCs et des ACs dans le montage final du modèle, les cellules ont été cultivées et observés en systèmes bicouches. Ceci avait pour but de vérifier la compatibilité des co-cultures, d'évaluer la faisabilité du modèle et de vérifier la vitesse de construction du modèle qui, dès le début, se voulait rapide à monter et reproductible. À cette étape, l'évaluation du modèle était basée sur les valeurs de TEER et sur le coefficient de perméabilité effective Peff.

2. Hypothèse de recherche

L'utilisation d'un modèle *in vitro* tricellulaire primaire de souris de la BHE se traduirait par un modèle synergique étanche et intègre avec la présence des principaux TMBRs et des TJs responsables du transport des molécules au cerveau. Ce modèle offrirait un outil adéquat pour le criblage des médicaments du SNC.

3. Objectifs de recherche

L'objectif principal a été d'assembler les modèles mono-, bi- et tri-couches (Figure 2.1.) et de les caractériser.

Ceci prévoyait :

- L'isolation des trois types cellulaires primaires des cerveaux de souris;
- L'évaluation de l'étanchéité des modèles basée sur les valeurs de TEER et Peff;
- La vérification de l'expression des TMBRs et des TJs des CEs primaires.

Ultimement, le modèle devait être validé par le calcul du coefficient de corrélation établi entre les valeurs de Peff obtenues *in vitro* et les valeurs de perméabilité logBB obtenues chez la souris vivante.

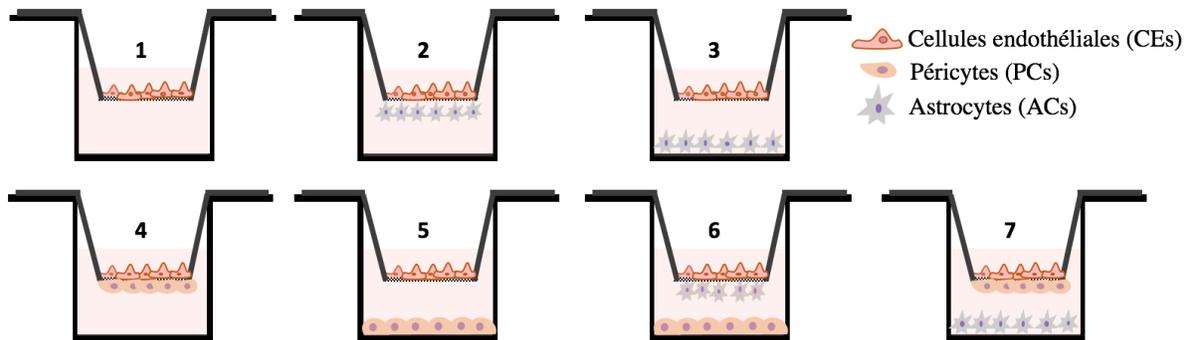


Figure 2.1. Les modèles 2D Transwell® à assembler: 1. Monocouche de CEs; 2. Co-culture avec contact CEs/ACs; 3. Co-culture sans contact CEs/ACs; 4. Co-culture avec contact CEs/PCs; 5. Co-culture sans contact CEs/PCs; 6. Tri-culture en contact CEs/ACs et sans contact CEs/PCs; 7. Tri-culture en contact CEs/PCs et sans contact CEs/ACs.

4. Matériel et méthodes

4.1 Isolation des cellules primaires

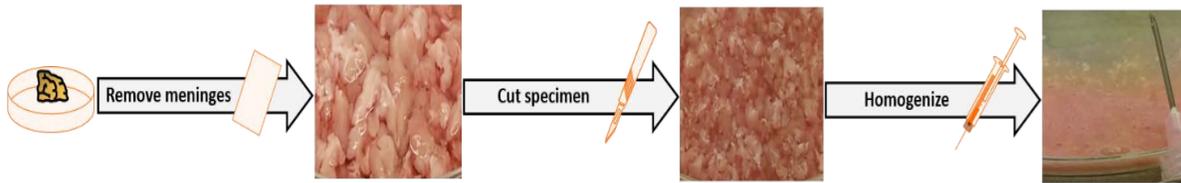
Les trois types cellulaires nécessaires pour la construction du modèle PrimB3 ont été extraits des cerveaux de souris C57BL/6 adultes (CEs) et nouveau-nées (PCs et ACs).

L'isolation des CEs (Figure 2.2.), ainsi que le matériel nécessaire, sont décrits en détails dans la section 2.2.1 de l'article présenté au chapitre 3.

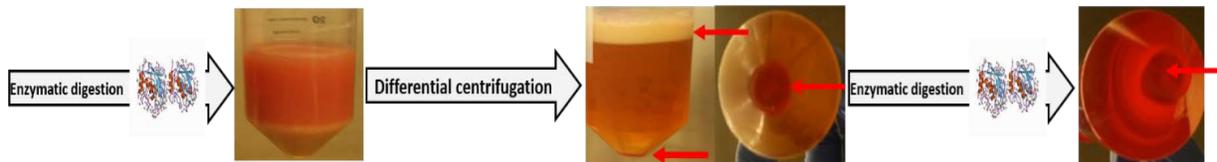
L'isolation des ACs a été réalisée à partir des cerveaux des souris nouveau-nées de 1 à 3 jours (typiquement 10 cerveaux par isolation). Les méninges ont été retirées des cerveaux extraits puis seulement les cortex ont été sélectionnés pour l'isolation. Ceux-ci ont été soumis à une digestion mécanique (passage au travers d'une aiguille de 22G) suivie d'une digestion enzymatique avec une solution de collagénase type II (1.05 mg/mL). Le broyat obtenu a été mis en culture dans des flasques de 25 ml préalablement recouverts de Poly-L-ornithine à 100 mg/L pendant 2 heures. La sélection et l'enrichissement ont été obtenus par la mise en culture dans un milieu DMEM low glucose, 20%FBS/ Pénicilline/Streptomycine 1× contenant 15 mM HEPES.

L'isolation des PCs a été réalisée à partir de cerveaux de souriceaux âgés de 1 à 3 jours. Les cerveaux entiers, dépourvus de méninges, ont été utilisés (typiquement 10 cerveaux par isolation). Le protocole d'isolation appliqué est identique à celui des CEs. La sélection et l'enrichissement se fait par la mise en culture dans un milieu DMEM low glucose, 20%FBS/ Pénicilline/Streptomycine 1× contenant du ITS (100× ITS, 5 mL per 500 mL DMEM), 100 µg/mL héparine et 1× Smooth Muscle Growth Supplement (20×, 25 mL per 500 mL DMEM). Les PCs sont cultivées dans une flasque de 25 mL sans recouvrement.

1. Mechanical reduction



2. Biochemical reduction



3. Gradient based centrifugation

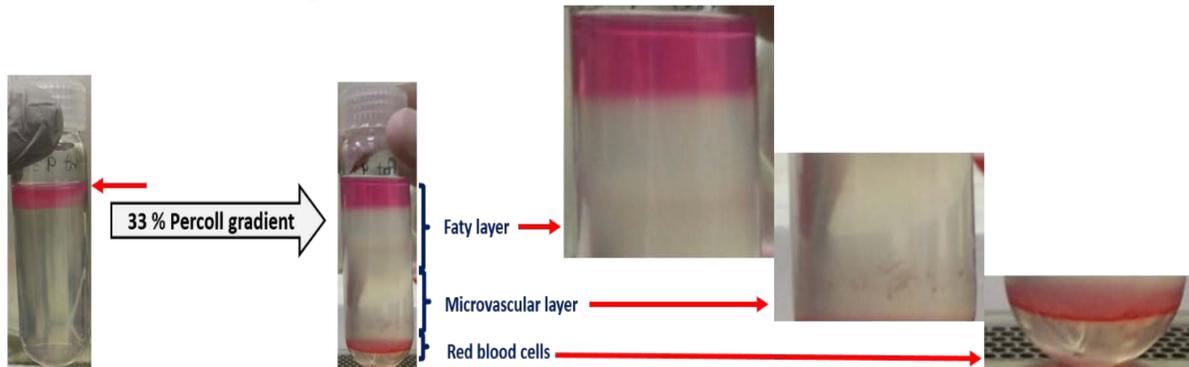


Figure 2.2. Schéma des trois grandes étapes du protocole d'isolation des capillaires cérébraux de souris (Protocole développé par Florian Bernard).

4.2 Construction des modèles

La construction des modèles a été réalisée dans des plaques Transwell® de 24 puits. Les CEs ont été toujours cultivées à une concentration de 2×10^5 cellules/cm² sur la membrane de l'insert préalablement recouverte de collagène 5 µg/cm² durant 4 heures. Les ACs et le PCs ont été utilisés à une concentration de 2×10^4 cellules/cm².

Pour les modèles avec contact, les cellules étaient laissées adhérer pendant 2 heures et ensuite les inserts étaient retournés du bon côté dans la plaque Transwell®.

Les modèles étaient toujours cultivés dans le milieu spécifique de culture des CEs, qui était changé tous les 2 jours.

4.3 Mesure de l'étanchéité des modèles

Pour ce début de projet seul, les mesures de TEER et de perméabilité ont été réalisées. La résistance a été mesurée avec les baguettes de type « STX2/chopsticks » ou les électrodes concentriques Endohm® et la TEER a été calculée comme indiqué à la section 4.1 du chapitre 1.

Les tests de perméabilité ont été réalisés avec 1 mg/mL du FITC-Dextran (150 kDa) dissout dans le milieu Extreme-DMEM, avec des prélèvements entre 0 et 3 h. Le test de perméabilité est décrit en détail dans l'article du Chapitre 3 à la section 2.1.3.2.

Le coefficient P_{eff} a été calculé selon l'équation suivante (Éq. 5) (90):

$$\text{Eq. (5)} \quad P_{eff} = V \times dC / A \times C_0 \times dT,$$

où : V- le volume du compartiment receveur (0,6 mL), A- la surface de l'insert (0,33 cm²), C₀ – la concentration dans le compartiment donneur, dC/dT - la vitesse de variation de la concentration en fonction du temps dans le compartiment receveur.

5. Résultats

5.1 L'isolation des cellules

La mise en culture des capillaires cérébraux (Figure 2.3., Jour 0) a abouti à la croissance des CEs qui émergeaient de ces capillaires (Figure 2.3., Jours 1 et 2). L'isolation a permis la formation de tapis cellulaires confluent de CEs entre 5 et 7 jours (Figure 2.3., Jour 6). Les cultures obtenues étaient hautement enrichies en CEs, grâce à l'utilisation de la puromycine (environ 90%, Bernard *et al.* soumis). Les CEs se sont développées en restant en contact les unes avec les autres. Le tapis cellulaire obtenu était composé des cellules ovales avec une membrane cellulaire peu visible contrastant avec leur noyau dense.

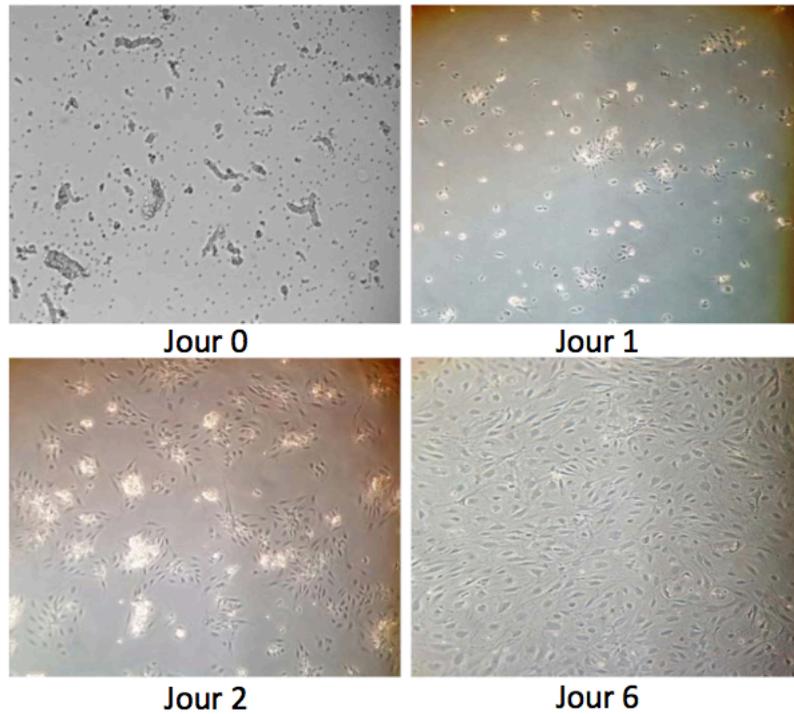


Figure 2.3. Les étapes de la croissance cellulaire des CEs extraites des capillaires cérébraux de souris. Microscopie en champs clair, grossissement $\times 100$. (Source : Florian Bernard)

L'isolation des ACs a permis d'obtenir un mélange d'ACs et d'autres cellules de la microglie (Figure 2.4.). La culture est enrichie au bout de 2 semaines avec l'utilisation d'un milieu de culture spécifique aux ACs et le passage conséquent des cellules sur des flasques recouvertes de poly-L-ornithine. Les ACs obtenues avaient une forme caractéristique d'étoiles avec des projections cellulaires très fines. Une culture enrichie en ACs (environ 87%, Bernard *et al.* soumis) est obtenue en 1 à 2 semaines.

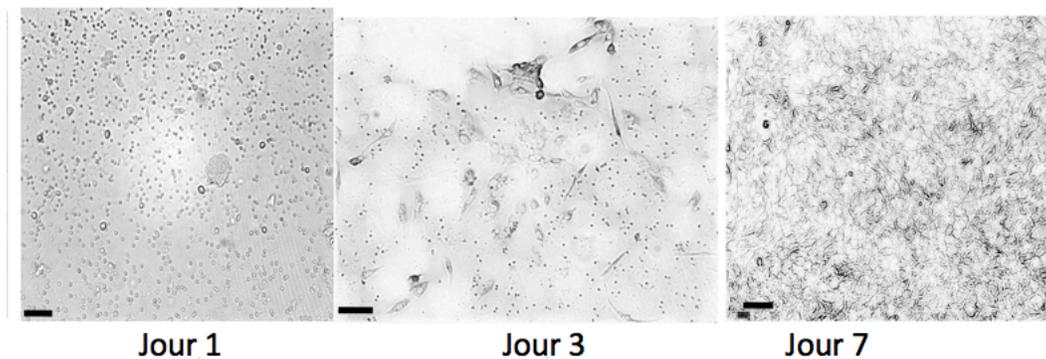


Figure 2.4. Les étapes de la croissance cellulaire des ACs extraits des cerveaux de souris. Microscopie en champs clair, barre d'échelle : 120 μm . (Source : Florian Bernard)

L'isolation des PCs a abouti à une culture cellulaire au bout de 7 jours (Figure 2.5.). Par contre, cette culture n'était pas pure et l'enrichissement s'est réalisé par des passages consécutifs pendant 2 semaines. Lors des passages cellulaires, les cellules détachées à l'aide de la Trypsine/EDTA 0,5% et diluées dans le milieu de culture étaient laissées adhérer pendant une heure. Ensuite, seul le milieu de culture avec les cellules non adhérentes étaient mis en culture pour l'enrichissement des PCs. Les cellules qui avaient adhéré pendant la première heure, c'est-à-dire les cellules de la microglie, étaient éliminées.

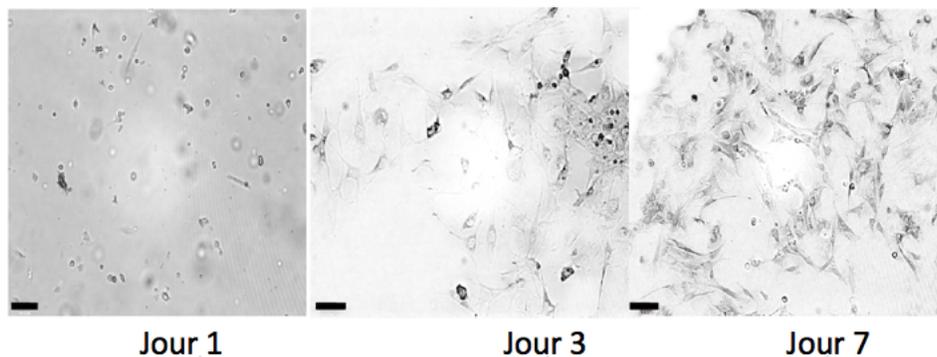


Figure 2.5. Les étapes de la croissance cellulaire des PCs extraits des cerveaux de souris. Microscopie en champs clair, barre d'échelle : 120 μm . (Source : Florian Bernard)

5.2 Construction et caractérisations des modèles

Les cellules primaires isolées ont été utilisées pour la construction des différents modèles BHE. Initialement, une plaque Transwell®, avec une surface d'inserts de 1,12 cm², a été utilisée pour la construction des modèles en co-culture. Trois modèles ont été construits : la monocouche des CEs (EC) et les bicouches EC/AC avec (R) ou sans (B) contact. Ces modèles-là ont été évalués seulement sur la valeur de TEER (Figure 2.6.), basée sur la résistance mesurée avec les électrodes « STX2/chopsticks ». Il n'y a pas eu de différence statistique entre les valeurs de TEER des différents modèles comparés par jour de mesure. Le maximum des valeurs moyennes atteintes par jour de mesure était :

- 68 $\Omega \times \text{cm}^2$ (EC/AC(R)) au jour 2,
- 102 $\Omega \times \text{cm}^2$ (EC/AC(R)) au jour 3,
- 105 $\Omega \times \text{cm}^2$ (EC/AC(R)) au jour 6,
- 115 $\Omega \times \text{cm}^2$ (EC/AC(B)) au jour 7 et
- 107 $\Omega \times \text{cm}^2$ (EC/AC(R)) et (EC/AC(B)) au jour 8.

Toutefois, on remarque que la TEER commençait à baisser vers le jour 8.

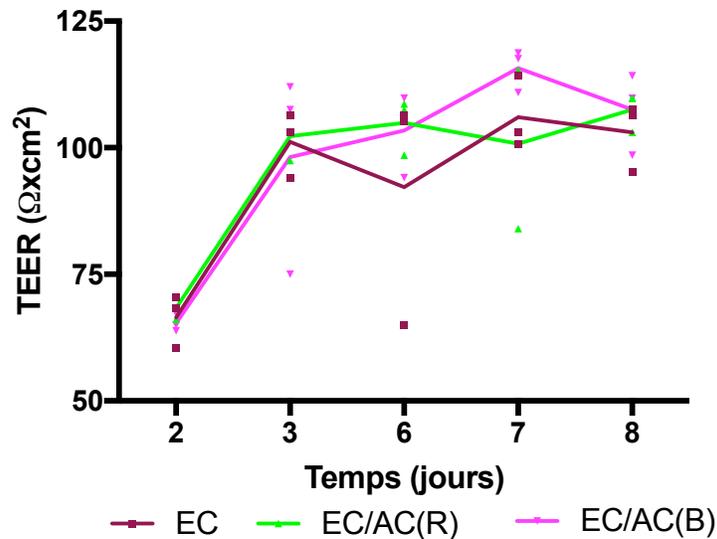


Figure 2.6. Résistance électrique transendothéliale (TEER, exprimée en $\Omega \times \text{cm}^2$) de la monocouche de cellules endothéliales (EC), des modèles avec les astrocytes avec contact (EC/(AC(R))) et sans contact (EC/(AC(B))). Toutes les données sont présentées en tant que moyenne \pm SD (n = 3). Test statistique: unpaired t test avec Kruskal-Wallis test (ns: $p \geq 0.0332$, * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$).

Ensuite, des modèles bicouches EC/AC primaires et EC/U138 (avec la lignée cellulaire de glioblastome humaine U-138) ont été construits dans des plaques Transwell® présentant une surface d'insert de 0,33 cm². La réduction de la surface de l'insert a considérablement diminué le nombre de cellules utilisées dans le montage des modèles. Ce même modèle a été caractérisé par des mesures de perméabilité du FITC-D avec des prélèvements à 75, 140 et 235 min. Le filtre sans cellules a montré les plus hautes valeurs de perméabilité ($2,2 \pm 0,2 \times 10^{-7}$ cm/s) et le modèle monocouche EC a montré la valeur la plus basse ($2,3 \pm 0,7 \times 10^{-8}$ cm/s) (Figure 2.7.). Des différences statistiquement significatives ont été observées entre le filtre sans cellules et le EC et EC/AC(B). Il n'y a pas eu d'impact sur la perméabilité du marqueur fluorescent selon l'utilisation des ACs primaires ou issues d'une lignée U-138.

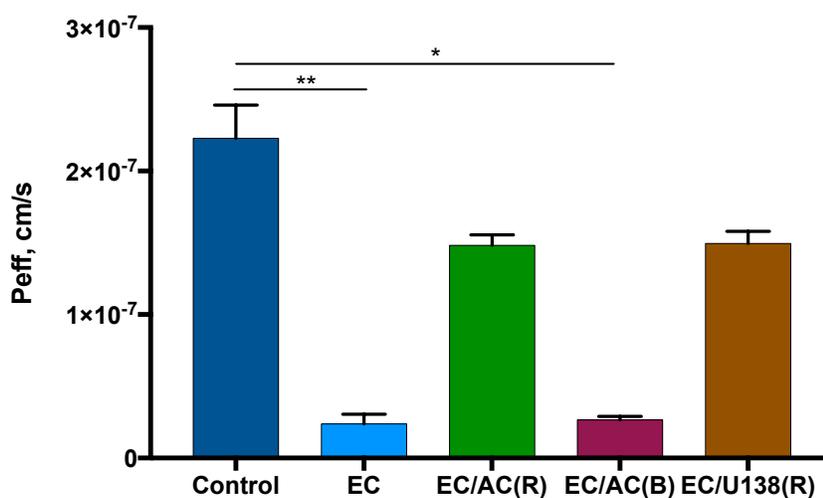


Figure 2.7. Coefficient de perméabilité P_{eff} du FITC-D (P_{eff} , exprimé en cm/s) à 235 min des modèles sans cellules (Control), de la monocouche de CE (EC), des modèles avec les astrocytes avec contact (EC/AC(R)), sans contact (EC/AC(B)) et en contact avec la lignée cellulaire U-138 (EC/U138(R)). Toutes les données sont présentées en tant que moyenne \pm SD ($n = 4$). Test statistique: unpaired t test avec Kruskal-Wallis test (ns: $p \geq 0.0332$, * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$).

Un autre modèle bicouche EC/AC de surface 0,33 cm² a ensuite été construit. Il a été évalué par le test de perméabilité FITC-D à 1, 2, 3 h et la valeur de TEER a été calculée sur la résistance mesurée avec les électrodes « STX2/chopsticks ». Tous les modèles ont donné de valeurs de

perméabilité très proches l'une des autres (Figure 2.8. A): $6,0 \pm 2,5 \times 10^{-6}$ cm/s pour EC, $1,5 \pm 0,3 \times 10^{-6}$ cm/s pour EC/AC(R) et $6,2 \pm 10 \times 10^{-5}$ cm/s pour EC/AC(B).

Les valeurs de TEER ont montré des tendances inattendues du contrôle qui a connu une baisse de valeur au jour 3, ce qui a été aussi le cas de EC et de EC/AC(R). Toutefois les CEs du modèle monocouche ont commencé à développer une monocouche plus étanche vers le jour 6. Le modèle EC/AC(B) a maintenu la même valeur le long des 6 jours (autour de $34 \Omega \times \text{cm}^2$) (Figure 2.8. B).

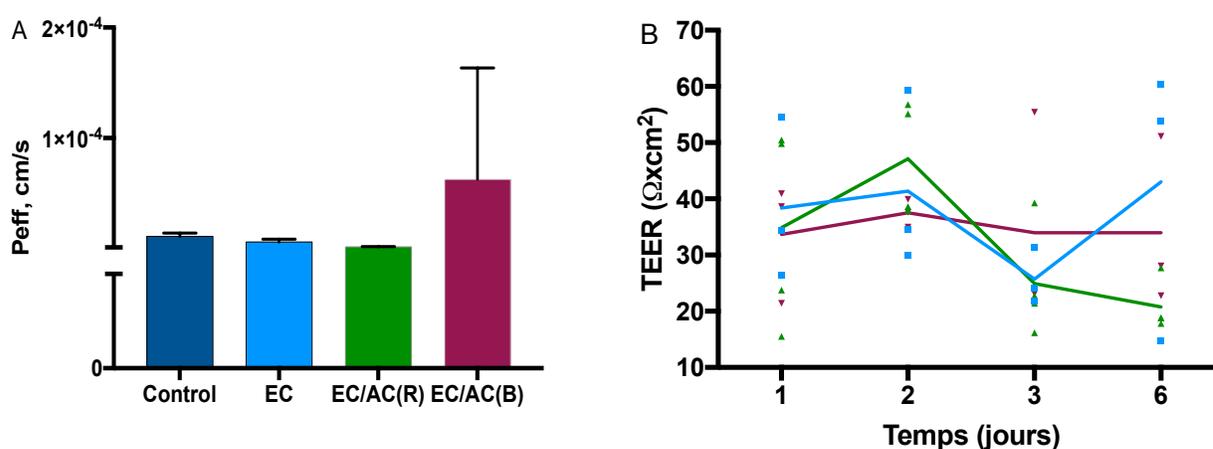


Figure 2.8. (A) Coefficient de perméabilité Peff du FITC-D (Peff, exprimé en cm/s au jour 6 du modèle) et résistance électrique transendothéliale (TEER, exprimée en $\Omega \times \text{cm}^2$) des modèles sans cellules (Control, n=2), de la monocouche de CEs (EC, n=3), du modèle avec les astrocytes avec contact (EC/(AC(R), n=4) et sans contact (EC/(AC(B), n=3). Toutes les données sont présentées en moyenne \pm SDT. Test statistique: unpaired t test avec Kruskal-Wallis test (ns: $p \geq 0.0332$, * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$).

Pour les modèles co-culture avec les PCs, neuf modèles avec contact (EC/PC(R)) et sans contact (EC/PC(B)) ont été construits. Les valeurs obtenues provenaient de trois expériences indépendantes avec trois répétitions par expériences. Les résultats de perméabilité du marqueur fluorescent FITC-D ont été calculés après 200 min de test au jour 7 du modèle. Les valeurs de TEER ont été calculées avec les mesures des résistances obtenues avec les électrodes concentriques Endhom® au jour 7 des modèles.

La situation contrôle (filtre seul) a montré des valeurs de perméabilité statistiquement plus hautes que le modèle EC, EC/PC(B), EC/PC(R) (Figure 2.9. A). Toutefois, il n'y a pas eu de différences entre les valeurs de perméabilité des modèles cellulaires. Pour les valeurs de TEER, nous n'avons pas observé de différences entre les modèles, et seulement une différence significative entre les situations contrôle et EC/PC(R) (Figure 2.9. B).

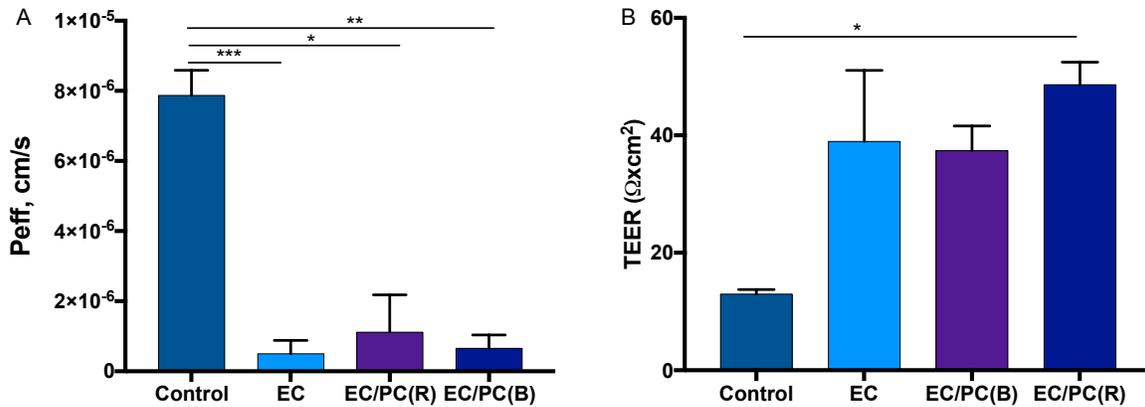


Figure 2.9. (A) Coefficient de perméabilité Peff du FITC-D (Peff, exprimé en cm/s) et résistance électrique transendothéliale (TEER, exprimée en $\Omega \times \text{cm}^2$) des modèles sans cellules (Control), de la monocouche de CEs (EC), du modèle avec les péricytes avec contact (EC/(PC(R)) et sans contact (EC/(PC(B)). Toutes les données sont présentées en tant que moyenne \pm SD ($n = 12$ pour Peff et TEER). Test statistique : unpaired t test avec Kruskal-Wallis test (ns: $p \geq 0.0332$, * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$, **** $p < 0.0001$).

6. Discussion

Les résultats et les observations recueillies à la suite de ces expériences ont mené à l'optimisation des quelques paramètres importants pour la construction des modèles.

Pour le modèle de EC/AC (Figure 2.6.), des plaques Transwell® 1,12 cm² ont été utilisées. La valeur de TEER étant calculée en $\Omega \times \text{cm}^2$, les modèles avec l'insert 1,12 cm² ont l'avantage de générer des valeurs plus hautes comparativement aux inserts de 0,33 cm² (45). Toutefois, l'assemblage de ces modèles demande plus de cellules. Ceci est particulièrement important pour les cellules primaires qui sont isolées d'animaux vivants, et qui ne sont pas une source de cellules renouvelables. De plus, les modèles 0,33 cm², étant plus petits, sont plus compatibles avec le criblage à haut débit. Ces modèles ont montré aussi que la TEER maximale était atteinte

au jour 7 (Figure 2.6.) et qu'à partir de huitième jour, la viabilité cellulaire et la TEER diminuaient. Le temps de maturation d'un modèle a donc été fixé à 7 jours. Effectivement, la plupart des modèles murins rapportés dans la littérature ont été établis en 5 à 8 jours (51, 53, 56). Dans l'étude de Wuest *et al.*(91), l'objectif était d'établir la concentration de CEs optimale, entre 1 et 8×10^5 cellules/cm², pour la construction d'un modèle de 7 jours. La densité cellulaire de 2×10^5 cellules/cm², la même utilisée que dans ce projet, a montré une augmentation constante de TEER, comparativement aux concentrations plus hautes qui montraient une baisse de TEER après un maximum atteint au jour 5. Finalement, au jour 7, les 3 concentrations étudiées (2 , 4 et 8×10^5 cellules/cm²) avaient atteint relativement la même TEER, ce qui renforce notre hypothèse de construire un modèle de 7 jours avec une concentration cellulaire de 2×10^5 cellules/cm².

En fondant nos analyses sur les valeurs de TEER, nous n'avons pas noté de différence significative entre les modèles étudiés (Figure 2.6.). Cette observation a été confirmée avec d'autres modèles de co-culture EC/AC, pour lesquels la perméabilité du FITC-D n'a pas mené à des différences entre les modèles (Figures 2.7. et 2.8.). Toutefois, il a été observé des différences entre le contrôle (filtre seul) et les modèles EC et EC/AC(B). Ceci indique que les ACs agissent sur les CEs via les facteurs de croissance sécrétés dans le milieu de culture et que le contact n'est pas favorable à l'étanchéité du modèle. Les astrocytes sont les premières cellules de la NVU qui ont été étudiées et reconnues pour exercer un impact sur la modulation de la BHE. Habituellement la co-culture des CEs avec des ACs, avec ou sans contact, résulte dans un modèle avec des valeurs de TEER plus hautes comparativement à la monocouche de CEs (11). Nos résultats n'ont pas pu s'aligner avec ces affirmations. Toutefois on a vu une différence du modèle EC/AC(B) par rapport au contrôle (Figure 2.7.). Shayan *et al.* (51) ont comparé un modèle monocouche de CEs de souris avec les modèles co-cultures CEs avec ACs primaires de rat. Le modèle EC/AC(B) a montré une TEER statistiquement plus grande que le modèle EC, contrairement au modèle EC/AC(R). Ils ont également confirmé ces résultats par immunocytochimie. Leur conclusion mentionne que les projections astrocytaires dans le modèle avec contact bloquaient les pores de la membrane de PET et la libération des facteurs de croissance dans le milieu qui pourraient agir sur la modulation des CEs. Cette hypothèse pourrait expliquer l'intérêt de l'utilisation de ACs dans un modèle sans contact, ce qui a été le cas dans le projet présent.

L'utilisation d'ACs primaires n'a pas révélé d'avantages particuliers pour les caractéristiques du modèle avec contact par rapport à l'utilisation de la lignée U-138 (Figure 2.7.). Ceci confirmerait encore une fois que les projections des ACs, primaires ou de lignée, bloquent la libération des facteurs modulateurs de la BHE dans le milieu de culture. Toutefois, il a été démontré, dans un modèle porcin bicouche sans contact, que les ACs primaires augmentent l'intégrité de la monocouche de CEs comparativement à la lignée cellulaire (92), hypothèse qui devrait être investiguée dans les futures études. D'un autre part, *in vivo*, les cellules tumorales secrètent des facteurs angiogéniques qui augmentent la perméabilité de la BHE. Certaines lignées cellulaires astrocytaires auraient donc un effet négatif sur l'intégrité de la BHE (45). C'est probablement le cas de la lignée de glioblastome utilisée dans ce projet, U-138, ce qui expliquerait son Peff plus grand que le modèle EC.

La TEER et la perméabilité des modèles de la figure 2.8. ont montré encore une fois qu'il n'y a pas de différence significative entre différents modèles. Toutefois, dans cette expérience, la culture des ACs sur l'envers des inserts des modèles avec contact a été difficile. En effet, l'insert ne peut contenir seulement que 1- 2 gouttes de milieu de culture (~ 40 µL/goutte) dans lesquelles il faut resuspendre la quantité des cellules nécessaires. Cette étape est très laborieuse et le petit volume de milieu de culture s'évapore pendant les 2 heures nécessaires à l'adhérence des cellules au filtre, ce qui réduit la viabilité cellulaire. Pour cette raison, cette étape s'avèrerait probablement difficile à implanter dans un processus rapide de criblage des médicaments.

La figure 2.8. B montre qu'au jour 6 les CEs présentent une TEER qui augmente, donc le temps optimal de construction de modèle devrait être de plus de 6 jours, ce qui confirme notre hypothèse d'un modèle mature en 7 jours. Toutefois, les valeurs de TEER montrent une grande variabilité de mesure. Ceci peut être dû au fait que la mesure de la résistance a été réalisée avec les électrodes de type « chopsticks » qui sont connues de fournir des valeurs variables. Ultiment, les « chopsticks » ont été remplacés par les électrodes concentriques des chambres Endohm®.

Pour le modèle co-culture EC/PC, la perméabilité des différents modèles a été statistiquement différente de la situation contrôle (Figure 2.9. A), mais aucune différence significative par rapport au modèle monocouche EC n'a été notée. En se référant aux valeurs de TEER, seul le modèle EC/PC(R) a montré une valeur statistiquement augmentée par rapport au contrôle (Figure 2.9. B). L'étude de l'influence des péricytes sur l'étanchéité de la BHE est relativement

récente. Toutefois il a été déjà montré que l'utilisation des péricytes dans les modèles co-culture augmente les valeurs de TEER, passant de 50 à 200 $\Omega \times \text{cm}^2$, pour les modèles avec ou sans contact comparés à la monocouche, mais sans différence significative quand on comparait les deux modèles ensemble (48). Une autre étude montrait une valeur de ~ 20 et $97 \Omega \times \text{cm}^2$ respectivement pour les modèles EC/PC(B) et EC/PC(R), données qui renforceraient nos résultats en montrant que les PCs doivent se trouver en contact pour agir efficacement sur l'intégrité de la monocouche (93).

Tout au long des travaux effectués, plusieurs difficultés ont été rencontrées. Premièrement, l'utilisation de plus d'un type cellulaire augmente considérablement le temps d'attente pour l'obtention de cellules primaires après l'isolation (ACs et PCs > 2 semaines). Deuxièmement, l'assemblage des modèles de co-culture avec contact s'est avéré très laborieux, en particulier lorsqu'il s'agit de placer des cellules au revers d'un insert. L'évaporation rapide des volumes déposés, ainsi que le risque de pertes cellulaires, compliquent grandement les manipulations. Cela est plus spécifiquement vrai pour la culture des ACs qui nécessitent un recouvrement de poly-L-ornithine pour adhérer au filtre. De plus, dans le cas des ACs, l'adhérence des cellules aux filtres est moins efficace et la durée d'incubation devrait être révisée. Possiblement, un temps plus long d'incubation des ACs sur l'insert augmenterait leur taux d'adhésion. Tout ceci explique en grande partie le manque de reproductibilité et de confiance en ces résultats.

Un autre point important, qui n'a pas été investigué dans cette période d'optimisation de co-culture, est l'impact du milieu de culture des CEs sur la croissance des ACs et PCs. Effectivement, une réduction de la viabilité de ces deux types cellulaires aurait un impact direct sur le développement du modèle BHE et sur son intégrité.

7. Conclusion

L'isolation des cellules primaires a permis l'apprentissage de la manipulation des animaux ainsi que l'isolation des trois types cellulaires de la BHE : les CEs, les ACs et les PCs. Le temps d'isolation et d'obtention des cultures enrichies de chaque type cellulaire nous a permis d'évaluer la faisabilité et la durée d'obtention d'un modèle *in vitro* cellulaire. Toutefois, ce premier objectif a été atteint qu'en partie, car seulement l'isolation des CEs donnait des bons rendements et des cultures enrichies à 99%. Il s'ensuit que pour la construction d'un modèle tricellulaire, l'optimisation de protocoles d'isolation des ACs et des PCs devrait être revue afin de réduire le temps d'enrichissement des cultures, sans pour autant perdre en qualité de la culture.

La construction des modèles de co-culture EC/ACs et EC/PC n'a pas révélé de différences importantes avec le modèle monocouche EC en termes de TEER et de coefficient de perméabilité du marqueur. De plus, le modèle avec contact s'est avéré difficile à mettre en œuvre et a augmenté le temps d'assemblage du modèle. Toutefois, il semble que les ACs ne devraient pas être cultivés en contact avec les CEs, contrairement aux PCs qui pourraient l'être. Dans un éventuel modèle tricellulaire, c'est cet emplacement des trois types cellulaires qui serait probablement optimal. En conclusion, l'hypothèse de recherche n'a pas pu être validée, car le modèle tricellulaire n'a pas été construit et son étanchéité n'a été évaluée. La difficulté d'assemblage, le nombre d'animaux sacrifiés, les coûts associés aux cultures primaires ainsi que l'absence d'une supériorité nette des modèles de co-cultures ont été les causes pour la révision de la faisabilité du projet. Ainsi, il a été décidé, comme étude préliminaire, de caractériser plutôt un modèle primaire monocouche (Chapitre 3).

Néanmoins, suite à ces expériences préliminaires, quelques paramètres ont été fixés pour la construction des modèles subséquents. Ainsi, le modèle *in vitro* devrait être construit sur une membrane de polyester de $0,33 \text{ cm}^2$ et devrait être établi sur 7 jours. La concentration de travail des CEs a été fixée à $2 \times 10^5 \text{ cellules/cm}^2$, et les cellules doivent être cultivées sur un recouvrement de collagène type IV à $5 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$.

Chapitre 3: Modèle primaire monocouche

L'article « Blood–brain barrier permeability assays: which one is the more reliable for drug screening between mouse primary endothelial cells, bEnd.3 endothelial cells or PAMPA-BBB? » constitue le cœur du travail de maîtrise sur le modèle monocouche des CE primaires de souris.

Résumé en français

Actuellement, parmi les modèles *in vitro* de la BHE, on compte des modèles mono- et co-culture, disposés en systèmes 2D ou 3D et basés sur un large éventail de types cellulaires. Cependant, la détermination des groupes de recherche à reproduire correctement les propriétés de la BHE augmente la complexité des modèles développés et réduit leur compatibilité avec le processus de criblage à haut débit. Dans ce travail de recherche, nous avons comparé le pouvoir prédictif de la perméabilité des molécules au cerveau de deux modèles cellulaires et d'un modèle acellulaire (PAMPA-BBB) avec des données de perméabilité *in vivo*. Tout d'abord, la morphologie et l'expression des ARNm des protéines membranaires spécifiques des CE primaires et de la lignée bEnd3, ont été comparées. Les modèles monocouches de type Transwell® ont été caractérisés en ce qui concerne l'étanchéité et le niveau d'expression de ARNm des protéines. Ensuite, en utilisant sept médicaments de propriétés physicochimiques différentes, les données de perméabilité *in vitro* (P_e) ont été corrélées avec les valeurs de $\log BB$ obtenues chez la souris. Le modèle primaire de souris a montré une intégrité des monocouches et des niveaux de ARNm plus élevée des TMBRs et des TJs de la BHE, notamment pour le transporteur d'efflux Pgp. La classification de sept molécules, ainsi que l'IVIVC, ont souligné la supériorité du modèle primaire ($r^2 = 0,765$) par rapport aux modèles PAMPA-BBB ($r^2 = 0,391$) et de la lignée cellulaire bEnd.3 ($r^2 = 0,019$). Nos résultats indiquent que le modèle primaire monocouche de souris est un outil simple et fiable pour la prédiction de la perméabilité des médicaments à travers la BHE.

Blood–brain barrier permeability assays: which one is the more reliable for drug screening between mouse primary endothelial cells, bEnd.3 endothelial cells or PAMPA-BBB?

Ina Puscas^{#1}, Florian Bernard-Patrzynski^{#1}, Martin Jutras¹, Marc-André Lécuyer^{2,3}, Lyne Bourbonnière², Alexandre Prat², Grégoire Leclair^{*1} and V Gaëlle Roullin^{*1}

these authors equally contributed to this work.

1 Faculty of pharmacy, Université de Montréal, CP6128, succursale Centre-ville, Montreal QC, H3C 3J7, Canada.

Puscas Ina ina.puscas@umontreal.ca, Bernard Florian florian.bernard@umontreal.ca, Jutras Martin martin.jutras@umontreal.ca, Leclair Grégoire gregoire.leclair@umontreal.ca, Roullin Valérie Gaëlle vg.roullin@umontreal.ca

2 Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Université de Montréal, and Centre de Recherche du CHUM (CRCHUM), Montréal, QC, H2X 0A9, Canada.

Lécuyer Marc-André marc-andre.lecuyer@mail.mcgill.ca, Bourbonnière Lyne lyne.bourbonniere.chum@ssss.gouv.qc.ca, Prat Alexandre a.prat@umontreal.ca

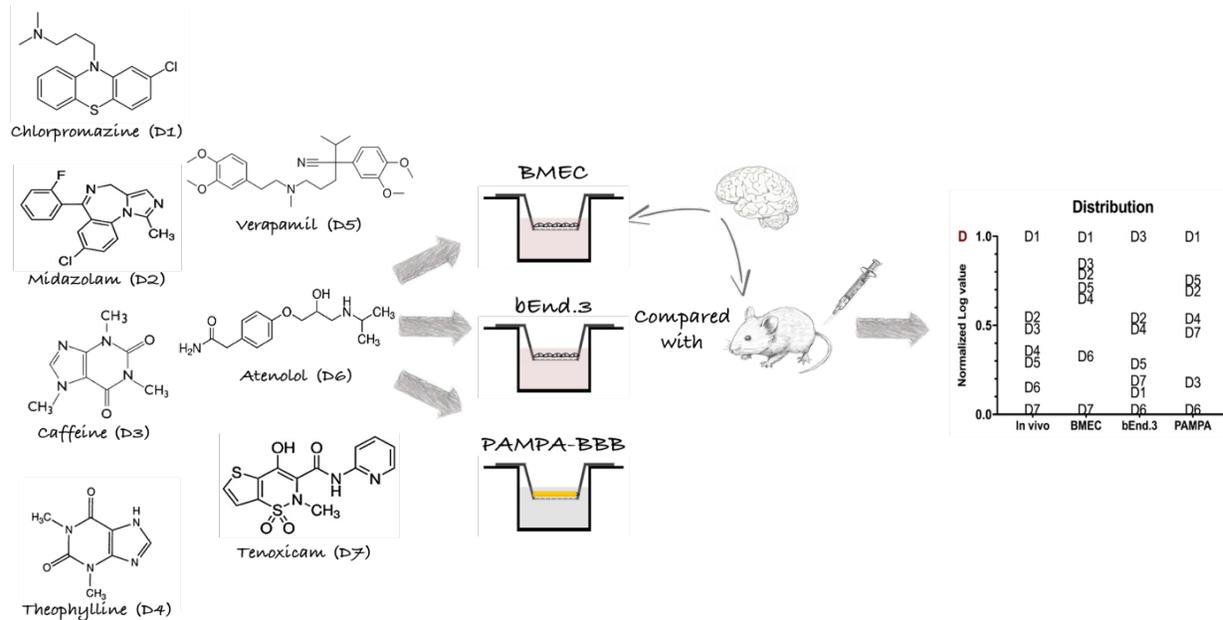
3 Current address: Institute for Multiple Sclerosis Research and Neuroimmunology, University Medical Center Göttingen, Center for Biostructural Imaging of Neurodegeneration, Göttingen, Germany. marc-andre.lecuyer@med.uni-goettingen.de

Corresponding authors

Grégoire LECLAIR, gregoire.leclair@umontreal.ca ; Valérie Gaëlle ROULLIN vg.roullin@umontreal.ca

Declarations of interest: none.

Graphical abstract



Abstract

Currently, *in vitro* models of the blood-brain barrier (BBB) consist in numerous mono- and co-culture models, arranged in 2D or 3D systems, based on a wide range of cell types. However, the strive to correctly reproduce BBB properties increases model complexity and reduces compatibility with high-throughput drug screening. We compared the predictive power of two cellular and one acellular (PAMPA-BBB) models with *in vivo* permeability data. First, the morphology and mRNA expression of key feature membrane proteins of primary and bEnd.3 mouse brain endothelial cells were compared. Monolayer systems placed in Transwell® chambers were further characterized in terms of tightness and mRNA gene expression. Then, using seven drugs of various physicochemical properties, *in vitro* permeability data (P_e) were correlated with log BB values obtained in mice. The mouse primary model showed higher monolayer integrity and mRNA gene expression of BBB tight junction (TJ) proteins and membrane transporters (MBRT), especially for the efflux transporter Pgp. The IVIVC and drug ranking underlined the superiority of the primary model ($r^2= 0.765$) when compared to the PAMPA-BBB ($r^2=0.391$) and bEnd.3 cell line ($r^2=0.019$) models. Our results point out to the primary monolayer mouse model as a simple and reliable candidate for the prediction of drug permeability across the BBB.

Keywords

Mouse brain microvascular endothelial cells; Primary cell culture; bEnd.3 cell line; Drug permeability; PAMPA-BBB; log BB; drug screening; Blood-brain barrier

Abbreviations

BBB - blood-brain barrier

BCRP- Breast cancer resistance protein

bEnd.3 - mouse brain microvascular endothelial cell line

BMEC - brain mouse endothelial cells

Caco-2 - human epithelial colorectal adenocarcinoma cell line

CL-5 - Claudin-5

CNS - central nervous system

DAPI- 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride stain

ddPCR - Droplet digital polymerase chain reaction

EDTA - Ethylenedinitrilotetraacetic acid

FITC-Dextran - fluorescein isothiocyanate-dextran

GLUT-1- Glucose transporter-1

hCMEC/D3 - human microvascular endothelial cell line

HPRT- mouse hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase

iPSC – induced pluripotent stem cells

IVIVC - *in vitro* - *in vivo* correlation

LAT-1 - L-type amino acid transporter

LC-MS/MS - liquid chromatography-mass spectrometry coupled with mass spectrometry

LD50 - median lethal dose

Log BB - logarithm value of brain-to-blood concentration ratio

logP - logarithm value of the partition coefficient

MBRT - membrane transporter

MDCK-MDR1 - Madin Darby canine kidney cell line transfected with the human gene (MDR-1) encoding for the P-glycoprotein.

mRNA – messenger ribonucleic acid

NaFl - sodium fluorescein

OCL – Occludin

OD - optical density

PAMPA-BBB - blood-brain barrier specific parallel artificial membrane permeability assay

P_e - endothelial permeability coefficient

Pgp - P-glycoprotein

qPCR - quantitative polymerase chain reaction

R&D - research and development

RBE4 - rat endothelial cell line

RT – room temperature

TEER - transendothelial electrical resistance

TJ - tight junction

ZO-1 - Zonula occludens-1

1. Introduction

Research and drug discovery programs for the central nervous system (CNS) therapeutics are the most challenging and expensive pharmaceutical research fields. This is due to the high complexity of the brain, the side effects caused by CNS drugs and their poor BBB penetration [1]. The BBB consists mainly of endothelial cells (ECs) tightly embedded in a continuous and uniform monolayer, forming a physical, transport and metabolic barrier to all blood-borne molecules [2]. Thus, 100% of the passage of large drug molecules and more than 98% of smaller ones are blocked at the BBB [3]. As such, in the early stages of drug discovery, the identified leads undergo *in silico*, *in vitro* and *in vivo* testing to select the best drug candidates and to enhance their odds of success [4].

In silico models are computational mathematical simulations based on physicochemical properties such as molecular weight, lipophilicity, solubility and number of hydrogen bonds [5]. These models constitute an excellent initial screening, enabling a rapid selection of drug candidates suitable for *in vitro* testing [6]. The advent of machine learning and efforts to take into account efflux and uptake transports will definitely enhance the reliability of these models [7].

On the other hand, *in vitro* models offer a rapid, non-expensive high-throughput drug screening. These models are designed using primary, immortalized cell lines or even stem derived cells in mono-, bi- or tri-culture set-up made from astrocytes, pericytes, neurons or microglia (for reviews, see [8, 9]).

3D microfluidic dynamic models [10], 3D collagen matrix models [11], 3D flow systems [12] or BBB spheroids [13] are designed to reproduce the BBB microenvironment and cell-cell communication. However, the complexity and difficulty to reproduce these model designs compromise their suitability as BBB drug screening platforms. On the contrary, static monolayer *in vitro* models represent a fair compromise between availability of cell material and expression of BBB membrane transporters (MBRT) and tight junction (TJ) proteins. Thus, development and adoption of *in vitro* models as alternative to animal testing in pharmaceutical drug development offer new opportunities to improve success rates while remaining committed to the 3Rs [14].

Permeability assays are important not only for CNS leads but for all newly synthesized chemical

entities, as peripherally active compounds could affect the CNS and cause unwanted neurological side effects [15]. Consequently, a reliable *in vitro* model for the screening of large libraries of chemical compound is needed. Currently the pharmaceutical industry mostly uses the parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) and the cellular *in vitro* models Caco-2 and MDCK-MDR1 for BBB drug screening [16]. PAMPA, although a high throughput low cost technique, only predicts drug permeation mediated by passive diffusion [17]. Caco-2 and MDCK-MDR1 cell models, known for their high TEER and expression of Pgp protein, are not brain-derived, thus morphologically different from endothelial cerebral cells. Indeed, drug transport across the BBB is determined by specific TJ and specialized MBRT proteins, which should be present in the *in vitro* models meant for BBB drug screening.

As far as brain cells are concerned, the most used cell lines for designing *in vitro* BBB models are the human microvascular endothelial cell line hCMEC/D3, the rat endothelial cell line RBE4 and the mouse brain microvascular endothelial cell line bEnd.3 [18]. These immortalized cell lines are commercially available tools, they proliferate well and are easy to handle. On the other hand, primary BBB ECs, stemmed from brain microvessels, are thought to preserve most of *in vivo* characteristics that could be lost during the immortalization process. Primary cells are often isolated from bovine [19], porcine [20] rat [21], mice [22] or human brain [23, 24]. Human primary cells are not readily available, especially from healthy brain tissues. Bovine and porcine EC isolations yield a large amount of cell material, but the availability of these large animals for research is quite limited, due to their more complicated and costly housing and maintenance. Rat and mice are ubiquitous, well-established small laboratory animals, readily available to most labs worldwide. Due to their rapid reproduction and maturation to adulthood, they are both choice models to retrieve primary cells.

In this study, three *in vitro* models were evaluated for their relevance as BBB drug screening models. Two of them were set up from mouse ECs, using primary and immortalized bEnd.3 cells, respectively. The third one, the PAMPA-BBB, was a non-cellular model consisting of a polymeric membrane soaked with porcine brain phospholipids. Cellular models were designed in a static, two-compartment monolayer model. The mRNA gene expression coding for MBRT and TJ proteins were assessed and compared between the cellular models. Ultimately, the permeability data of seven drugs obtained in the three models were correlated with the *in vivo*

permeation coefficient obtained in mice in order to determine which model best fitted the *in vitro/in vivo* correlation (IVIVC).

2. Materials and methods

2.1 Chemicals and supplies

Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose (DMEM), bovine serum albumin fraction V (BSA), Dulbecco's Phosphate Buffered Solution (DPBS), Fetal Bovine Serum (FBS), Penicillin Streptomycin 100× (Pen/Strep) and Extreme-DMEM (X-DMEM) were purchased from Wisent (Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada). Type II collagenase and type I deoxyribonuclease (DNase) were purchased from Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ, USA). Collagenase/dispase, type IV collagen from human placenta (type IV collagen), hydrocortisone, Insulin/Transferrin/Sodium Selenite supplement 100 × (ITS), puromycin dihydrochloride from Streptomyces alboniger, sodium fluorescein (NaFl), fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-Dextran) and metoclopramide hydrochloride were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Basic Fibroblast Growth factor (bFGF), trypsin-EDTA 0.25 % and 0.5% were purchased from Thermo Fisher Scientific (Burlington, ON, Canada). Zonula occludens-1(ZO-1) and Claudin-5 (CL-5) polyclonal antibodies, goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with Alexa Fluor® 488 and Slow Fade Diamond Antifade Mountant with DAPI were purchased from Invitrogen™ (Burlington, ON, Canada). Sodium heparin were purchased from Fisher Scientific (Ottawa, ON, Canada). Percoll was purchased from GE HealthCare Bio-Sciences (Baie-d'Urfé, QC, Canada) and blank mouse (cd-1) plasma EDTA K2 were purchased from BioIVT (NY, USA). Transwell® Costar 24-well plates (Costar®: 3470; 6.5 mm inserts; polyester membrane; pore size: 0.4 µm; pore density, 4×10^6 pores/cm²) were purchased from Corning Inc. (Kennebunk, ME, USA). Brain mouse endothelial cell line bEnd.3 (ATCC®CRL-2299) was purchased from Cedarlane (ON, Canada).

2.2 Animals and cell culture

All animals (C57BL/6 mice) were obtained from Charles River and thereafter bred at the Marcelle-Coutu animal facility, Université de Montréal; they were treated in compliance with the institutional requirements set out by the Comité de Déontologie de l'Expérimentation sur les Animaux (CDEA) of Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada (Protocols N°17-078

and -079). The animal protocols further complied with the health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

2.2.1 Primary cell isolation and culture

Primary brain mouse endothelial cells (BMEC) were isolated from 5 to 8-week-old C57BL/6 mice, according to the protocol reported by Lécuyer *et al.*[25] . Typically, 20 female and male mice were euthanized under CO₂. Brains were surgically removed and meninges were removed prior mechanical digestion. The obtained homogenates were digested in DMEM containing 1.05 mg/mL type II collagenase and 58.5 U/mL type I DNase for 1 h 15 min at 37°C on a benchtop shaker incubator (200 rpm). Collected pellets were then incubated with 20 % (w/v) BSA diluted in DMEM and then twice centrifuged (1,000 × g, 20 min) in order to remove the neuronal myelin sheath. A second pellet digestion was performed in DMEM containing 1 mg/mL collagenase/dispase and 39 U/mL type I DNase for 1 h 15 min at 37°C on a benchtop shaker incubator (200 rpm). The cluster separation and cellular contaminant removal were performed by the centrifugation of the pellet on 33 % continuous Percoll gradient at 1,000 × g for 10 min, 4°C. Percoll residues were removed by capillaries centrifugation in DMEM at 800 × g for 8 min. Afterwards, recovered capillaries were seeded on 6-well plates previously coated for 4 h with type IV collagen 5 µg/cm² reconstituted in DPBS. On the day one of the isolation, the capillaries were cultured in BMEC specific medium consisting in DMEM medium supplemented with 20% FBS, 1×Pen/Strep, 1 ng/mL bFGF, 100 µg/mL sodium heparin, 1.4 µM hydrocortisone, 0.2 % ITS and 10 µg/mL puromycin. Afterwards, cells were cultured in BMEC medium containing 4 µg/mL puromycin and the medium was changed every two days. Once cells reached 90-95 % confluency, ECs were harvested by using trypsin-EDTA 0.5 %. All experiments were performed with cells at passage 1.

2.2.2 Cell line culture

bEnd.3 mouse endothelioma cell line was cultured in DMEM/10% FBS/1×Pen/Strep at 37°C in a humidified 5% CO₂ incubator (Forma™ Steri-Cycle™ CO₂, Thermo Fisher Scientific, ON, Canada). The culture medium was changed every two days. When confluent, the cells were harvested using trypsin-EDTA 0.25 %. All experiments were performed on cells at passages 8 to 20.

2.2.3 Morphological cell characterization

Cell status, rate growth and purity were routinely observed under an optical microscope, with $\times 10$ and $\times 20$ magnifications. Images were recorded using a ZEISS AXIOVERT S100 microscope (Carl Zeiss Microscopy LLC, MA, USA) equipped with a Moticam 3+ camera (Moticam, Kowloon, Hong Kong) and processed with ImageJ software (version 1.51).

2.2.4 Puromycin cell viability assay

Cell proliferation ability in presence of increasing puromycin concentrations was investigated on BMEC and bEnd.3 cells by a MTS assay. Briefly, 5×10^3 cells were seeded in each well of a 96-well plate, in a final volume of 200 μL /well. Cells were allowed adhering 24 h prior replacing all culture media with 100 μL of media containing puromycin at concentrations ranging from 0.01 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cells were then incubated at 37°C in a humidified 5% CO_2 incubator for 24 h. Thereafter, 11 μL of the MTS reagent were added in each well and left to incubate for 3 h at 37°C in standard culture conditions. The reduction of the MTS tetrazolium compound by viable cells generated a colored formazan product, soluble in cell culture media, which was quantified by measuring the absorbance at 490 nm (Safire spectrophotometer, Tecan, Canada). Negative controls were untreated cells, whereas positive controls were cells treated with 0.1 % of triton 100x 1 h prior adding MTS. Cell viability was calculated as follows (Eq. (1)):

$$\text{Eq. (1)} \quad \% \text{ viable cells} = (\text{OD}_{\text{assay}} - \text{OD}_{\text{medium}}) / (\text{OD}_{\text{untreated cells}} - \text{OD}_{\text{medium}}) \times 100$$

where: OD_{assay} : absorbance in sample well; $\text{OD}_{\text{medium}}$: absorbance of medium alone;
 $\text{OD}_{\text{untreated cells}}$: absorbance of untreated cells.

2.3 Model construction

To build ECs models, cells were seeded inside the upper inserts of the Transwell® 24-well plates. Prior seeding, the 6.5 mm polyester membranes [26] were coated with a type IV collagen solution ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). After 4 hours, excess collagen was removed. Cells were then seeded at $2 \times 10^5 \text{ cells}/\text{cm}^2$ [21]. Primary ECs models were maintained in their specific culture medium and bEnd.3 models were maintained in DMEM/10% FBS/1 \times Pen/Strep at $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$. Media were changed every two days. Under these conditions, the *in vitro* models were ready within 7 days.

2.3.1 Evaluation of the model integrity

2.3.1.1 Transendothelial electrical resistance (TEER) measurement

TEER measurements were used as a non-invasive and quantitative technique to evaluate the TJ dynamics, and thus the barrier formation [27]. Prior measurements, Transwell® plates were equilibrated for 20 min at room temperature (RT). Then inserts were transferred in the Endohm-6 cup (World Precision Instruments, FL, United States) and the ohmic resistance was measured using the Millicell® ERS voltmeter (Millipore, MA, United States). Model resistances were measured in their respective growing medium. $TEER_{total}$ values were calculated by multiplying the obtained resistance (ohm) by the insert area (S, cm^2), as in Eq. (2). To calculate the TEER of the monolayer, the mean TEER value of cell-free inserts was subtracted to the $TEER_{total}$, as in Eq. (3).

$$\text{Eq. (2)} \quad TEER_{total} = \text{Resistance } (\Omega) \times S_{insert} (cm^2)$$

$$\text{Eq. (3)} \quad TEER_{monolayer} = TEER_{total} - TEER_{cell-free insert}$$

2.3.1.2 Fluorescent marker permeability assay

Two fluorescent markers were used to evaluate model permeabilities: sodium fluorescein (NaFl, MW= 376 g/mol) and fluorescein isothiocyanate-dextran (FITC-Dextran, MW = 150 kDa). Monolayer inserts were transferred to a 24-well plate containing 600 μ L of X-DMEM in the lower compartments. Media from the upper compartments were replaced by either 100 μ L of 10 μ g/mL NaFl or 1 mg/mL of FITC-Dextran in X-DMEM. Five time points were realized at 15, 30, 45, 60 and 75 min. Following each time sampling, inserts were transferred to a new 24-well plate containing fresh X-DMEM (600 μ L/well). Samples concentrations were determined by fluorescence (Saffire, Tecan, Canada). Excitation/emission wavelengths were 485/520 nm and 492/518 nm for NaFl and FITC-Dextran, respectively. The fluorescent marker endothelial permeability coefficient (P_e) was calculated as fully detailed in section 2.3.3.

2.3.2 *In vitro* drug permeability assay

In order to validate the primary cell and the bEnd.3 models, seven drug molecules with various physicochemical properties were chosen (Table 3.1).

Table 3.1 List of the drugs selected for the validation of BMEC and bEnd.3 model monolayers.

Abbreviation	Name	MW (g/mol)	log P^a
D1	Chlorpromazine hydrochloride (Enzo life Sciences, USA)	355.3	5.41
D2	Midazolam (TRC, ON, Canada)	325.8	4.33
D3	Caffeine, anhydrous (Medisca, QC, Canada)	194.2	-0.07
D4	Theophylline, anhydrous (Medisca, QC, Canada)	180.2	-0.02
D5	Verapamil hydrochloride (Sigma-Aldrich, ON, Canada)	491.1	3.79
D6	Atenolol (Acros Organics, PA, USA)	266.3	0.16
D7	Tenoxicam (Alfa Aesar, MA, USA)	337.4	1.90

^a - information source: PubChem

Inserts containing monolayer models were transferred to a 24-well plate containing 600 μ L of X-DMEM in the lower compartments. Media from the upper compartments were replaced by 100 μ L of the tested drug solubilized in X-DMEM (10 μ M, n=4/drug). Five time points were sampled at 15, 30, 45, 60 and 75 min. Collected samples were analyzed by LC-MS/MS, with metoclopramide hydrochloride as the internal standard. Details of the LC-MS/MS analysis are summarized in Table 3.2 and section 2.6. P_e values were calculated as indicated in section 2.3.3.

Table 3.2. Summary of mass spectrometry conditions

HPLC	Agilent 1100 series			
MS/MS	AB Sciex 4000 Qtrap			
Software	Analyst® (version 1.6.2)			
Ionisation source, mode	Turbo electrospray, positive ionisation			
Scan mode	Multiple reaction monitoring (MRM)			
Analyte parameters	Compounds	DP (V)	MRM	CE (eV)
	verapamil	110	455.3 > 165.0	60
	midazolam	90	326.2 > 291.1	42
	chlorpromazine	65	319.2 > 86.0	28
	caffeine	90	181.1 > 124.2	28
	atenolol	41	267.1 > 145.0	45
	theophylline	70	194.1 > 138.2	27
	tenoxicam	71	337.3 > 121.0	33
metoclopramide (ISDT)	70	300.1 > 184.3	44	
Source parameters	Gas temp (°C)		550	
	Gas flow (L/min)		50	
	Curtain gaz (psi)		25	
	Capillary (V)		5500	
Mobile phase	Composition		A: 0.1 % FA+ H ₂ O B: 0.1 % FA + ACN	
	Gradient		2 to 98 % B in 3.5 min	
Flow rate	0.75 mL.min ⁻¹			
Column temperature	45°C			
Injection volume	4 µL			
Injection temperature	5°C			
Column	YMC-Pack ODS-AQ, (50 x 3.0 mm, 5 µm)			

2.3.3 Permeability coefficient (P_e) calculation

The P_e was calculated as previously stated in the work of Deli *et al.* (2005) [28] and Nakagawa *et al.* (2009) [21].

First the cleared volume (μL), corresponding to the tested molecule transport from the upper compartment to the lower compartment, was calculated from Eq. (4):

$$\text{Eq. (4)} \quad \text{Cleared volume } (\mu\text{L}) = (C_{\text{lower compartment}} \times V_{\text{lower compartment}}) / C_{\text{upper compartment}}$$

where: $C_{\text{lower compartment}}$ being the concentration of tested molecule in the lower compartment, $V_{\text{lower compartment}}$ the volume of the lower compartment (i.e. 600 μL), $C_{\text{upper compartment}}$ the concentration of the tested molecule in the upper compartment.

Then, the cumulative cleared volume for each time point was calculated. The product (PS) of the drug permeability by the insert area (0.33 cm^2) was calculated as the slope of the plotting of cumulative volumes against time. The PS of the ECs monolayer were calculated using Eq. (5).

$$\text{Eq. (5)} \quad 1/PS_{\text{endo}} = 1/PS_{\text{total}} - 1/PS_{\text{insert}}$$

where: PS_{endo} is the product between the P_e of the ECs monolayer and the insert area (cm^3/s); PS_{total} is the product between the P_e of the tested model and the insert area (cm^3/s); PS_{insert} is the product between the P_e of the cell-free insert and the insert area (cm^3/s).

Finally, the P_e of the ECs monolayer was calculated as shown in the Equation 6.

$$\text{Eq. (6)} \quad P_e (\text{cm}^2/\text{s}) = PS_{\text{endo}} / S_{\text{insert}}$$

2.3.4 Model characterization

2.3.4.1 Immunostaining

To characterize the monolayer model integrity, 7-day old ECs monolayers were stained for junctional proteins with ZO-1 and CL-5 polyclonal antibodies. All antibody dilutions were performed in X-DMEM (primary antibodies 1:100 dilution; secondary antibody: 1:200 dilution). First, inserts were washed in DPBS and cell monolayers were fixed and permeabilized with methanol -20°C for 15 min RT. To reduce background interference, the excess protein-binding sites in cells were blocked with 3% BSA for 1 h at RT or overnight at 4°C . Incubations with the anti-ZO-1 and anti-CL-5 primary antibodies were performed in the same conditions as the BSA blocking step. Finally, cells were incubated with the secondary antibody Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit for 1 h at RT. Between incubations, inserts were washed thrice, 5 min each, with PBS on a benchtop shaker incubator (100 rpm). Next, membranes with the

monolayers were cut off from the inserts and placed on lamellae for microscopic examination, with the cell monolayer facing up. Nuclei were stained with Slow Fade Diamond Antifade Mountant with DAPI and samples were examined using a fluorescence microscope Olympus IX81 (Olympus, MA, USA), equipped with a Retiga 2000R CCD camera (QImaging, BC, Canada). Images were acquired with a MetaMorph Advanced software (version 7.8.9.0) and processed with ImageJ software (version 1.51).

2.3.4.2 Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Total RNA was extracted from lysed BMEC and bEnd.3 cells. Cells were either obtained from culture dishes (cell characterization) or inserts (monolayer characterization).

First, samples were purified from genomic DNA on cDNA eliminator mini spin columns (Qiagen, Germany). Then mRNA was extracted on RNase mini spin columns (Qiagen, Germany) following the manufacturer guidelines. The obtained RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high-capacity cDNA Reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, ON, Canada) and amplified in a thermocycler (Analytic Jena, Germany). All primers used in this study are listed in Table 3.3. The mouse hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) enzyme gene was used as the endogenous control. Each sample was prepared in triplicate, while non-reversed RNA and no DNA template served as negative controls. The qPCR reactions were performed by 40 cycles of 95°C for 5 sec and 60°C for 30 sec, using the ViiA7 or QuantStudio 7 Flex QPCR system (Thermo Fisher Scientific, ON, Canada). The comparative C_T method ($2^{-\Delta\Delta C_T}$ method) was used to calculate the relative expression level of each target gene. Data were analyzed as the fold change in gene expression using the GraphPad Prism® software (version 7.01).

Table 3.3. Primers sequences and their parameters used in this study for the analysis of the mRNA expression of main transporters and tight junction proteins.

Target protein/Abbreviation/ Gene symbol	Function	Reference sequence	Forward/Reverse primers
P-glycoprotein/Pgp/Abcb1a	Efflux transporter	NM_011076.2	gggcatttacttcaaacttgca/ tttacaagctcatttctcaattcaa
Breast cancer resistance protein/BCRP/Abcg2	Efflux transporter	NM_011920.3	aggctctggaaaaagtagcagatt c/ctccatccctatgcttgcc
Glucose transporter-1/ GLUT-1/Slc2a1	Uptake transporter	NM_011400.3	gtatcctgttgcccttctgc/ tcgaagcttcttcagcacac
L-type amino acid transporter/ LAT-1/Slc7a5	Uptake transporter	NM_011404.3	tcagcttcttcaactggctgt/ ggagggccagattcacct
Zonula occludens-1/ZO-1/Tjp1	Tight junction	NM_009386.2, NM_001163574	cgcgagagagacaagatgt/ gaagcgtcactgtgtgctgt
Occludin/OCL/Ocln	Tight junction	NM_008756.2	gtccgtgaggccttttga/ ggtgcataatgattgggttg
Claudin-5/CL-5/Cldn5	Tight junction	NM_013805.4	ttaaggcacgggtagcactc/ atgttggcgaaccagcag
Hypoxanthine - guanine phosphoribosyltransferase/ HPRT/Hprt	Endogenous protein	NM_013556.2	tcctcctcagaccgctttt/ cctggttcatcatcgctaac

2.3.4.3 Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)

ddPCR was performed on cDNA. The ddPCR system QX200 Droplet Digital PCR (Bio-rad, CA, USA) was used to fractionate samples into ~20,000 droplets. Amplification was performed in a 20- μ L multiplex reaction containing 1 ng of purified cDNA, 800 nM of primers and 250 nM of probes, 2 \times ddPCR Supermix for probes (no UTP). Samples were subjected to droplet generation by an automated droplet generator and later end-point PCR was performed. Cycling steps for the ddPCR were as follows: initially an enzyme activation at 95°C for 10 min followed by 50 cycles of denaturation and annealing (each cycle at 95°C for 30 s; 58°C for 1 min; 72°C

for 30 s) and finally enzyme deactivation at 98°C for 10 min. Finally, droplets were read on a droplet reader and data were analyzed using the QuantaSoft™ Software which determines the numbers of droplets being positive and negative for each fluorophore in each sample. The fraction of positive droplets was then fitted to a Poisson distribution in QuantaSoft™ Software to determine the absolute number of copies in units of copies per μL .

2.4 PAMPA-BBB model

Twenty mg of Porcine Brain Lipids (PBL) were added in a round-bottom flask and allowed to evaporate for 10 min on a rotary evaporator. Resulting lipid film was then solubilized with 1 mL of dodecane as to reach a PBL concentration of $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. The PAMPA-BBB assay was performed in a 96-well plate, similar to previous reports [30]. Model set-up consisted of two parts: a disposable top equipped with $0.45 \mu\text{m}$ PVDF filters and a bottom 96-well plate. To perform the PAMPA-BBB assay, PVDF filters were coated with $10 \mu\text{L}$ of the $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ PBL solution and then dried for 10 min at RT.

Phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4, was prepared according to USP specifications [29]. Stock solutions of verapamil 15 mM, midazolam 53 mM and tenoxicam 50 mM were prepared in DMSO, thus allowing complete solubilization. Stock solutions of chlorpromazine 28 mM, caffeine 26 mM, atenolol 3.7 mM and theophylline 46 mM were prepared in PBS. Thereafter, drug solutions were combined and further diluted with PBS, thus obtaining a pooled working solution. Internal standard (ISTD) stock solution, metoclopramide 10 mM, was prepared following the same procedure. All stock solutions were stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$ and protected from light as verapamil is photosensitive.

All drug stock solutions were diluted in PBS in order to reach an intermediate concentration of 1 mM and then a working concentration of $50 \mu\text{M}$ (0.23% DMSO), thereafter named the cassette. Its stability was established at $5 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ and at $-80 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ for 16 and 31 days, respectively [31]. The cassette ($300 \mu\text{L}$) was added to each donor well of the bottom plate, while receiver wells were filled with $300 \mu\text{L}$ of PBS. When placed on top of the donor plates, they created a ‘sandwich’ in which the two compartments were separated by the PBL-coated filters. These set-ups were then incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 18 h under shaking at 50 rpm (MaxQ 4000, Barnstead/Lab-line® Melrose Park, USA). After incubation, sandwich setups were disassembled. Donor and

receiver compartments were diluted with the ISTD (final concentration 250 nM) and analyzed by LC-MS/MS (section 2.6).

Drug permeability on the PAMPA-BBB model, namely P_{app} , was calculated with Eq. (7), according to Balimane *et al.* [32]:

$$\text{Eq. (7)} \quad P_{app} = V \times dC/A \times C_0 \times dt = Q/t \times A \times C_0 = rC_r \times V_r/t \times A \times rC_0$$

where P_{app} : apparent permeability ($\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$); Q : quantity of diffused drugs at the end of the assay (mol); t : duration of the assay (s); A : membrane surface (cm^2); rC_0 : relative concentration (signal ratio of the AUC_{drug} on the AUC_{ISTD}) in the donor compartment; rC_r : relative concentration (signal ratio of the AUC_{drug} on the AUC_{ISTD}) in the receiver compartment; V_r : volume of the receiver compartment (cm^3).

The P_{app} calculation according Eq.7 is limited to the permeability assays performed under sink conditions. These requirements are fulfilled when the drug flow rate is low, hence neither the receiver nor donor drug concentration will change considerably with time. Conventionally, a maximum receiver concentration less than 10% of the donor concentration is accepted. (94). The seven drugs receiver to donor ratio employed in this particular PAMPA-BBB assay ranged from 0.1 to 1%, thus complied with the sink conditions.

2.5 Animal studies

In vivo studies of drug brain permeability were performed in 5 to 8-week-old C57BL/6 mice, weighting between 17 and 33 g. Each drug was formulated in an adequate vehicle in order to ensure total dissolution and a safe, non-painful injection (Table 3.4). Drug solutions were passed through a sterile 0.22- μm filter to warranty sterility, prior to being administered intravenously as a bolus in the tail vein at a dosage of 5 mL/kg. Animals ($n=4$ mice/drug) were injected and sacrificed 2 hours later. To that purpose, mice were first anesthetized under isoflurane. Then total blood was withdrawn intracardiacally and brains were removed after decapitation. The plasma separation was performed by centrifugation at 3,000 rpm/4°C/ 20 min. Plasma samples were either immediately analyzed or stored at - 80 °C until further analysis. Prior the LC-MS/MS analysis, fresh brains were crushed using a Polytron homogenizer (Kinematica GMBH, Luzern, Switzerland) and underwent protein precipitation by adding a mixture of acetonitrile/water (50:50). Finally, brains were diluted with a blank brain suspension and plasma

samples were diluted with blank mouse (cd-1) plasma EDTA K2 (BioIVT, NY, USA). Collected samples were analyzed by LC-MS/MS, with metoclopramide as the ITSD (Table 3.2 and section 2.6). The log of the brain-to-blood ratio (2 hours post-injection) was calculated according to Bickel's report [33], as in Eq. 8:

$$\text{Eq. (8)} \quad \log \text{BB} = [\log (C_{\text{brain}}/ C_{\text{blood}})]$$

where: C_{brain} is the concentration quantified in the brain and C_{blood} the concentration quantified in the plasma.

Table 3.4. Drug formulation (*in vivo* and *in vitro*) and dosage (*in vivo*) used for the permeability studies.

Molecule name	Molecule formulation (%)	Administered dose (mg/kg)^a
Chlorpromazine hydrochloride	PEG 400/Water (30:70)	2.0
Midazolam	PEG 400/Water (30:70)	3.0
Caffeine anhydrous	NaCl 0.9% (100)	12.4
Theophylline anhydrous	DMSO/PEG 400/Water (10:30:60)	27.2
Verapamil hydrochloride	PEG 400/Water (30:70)	1.52
Atenolol	DMSO/PEG 400/NaCl 0.9% (10:30:60)	10.0
Tenoxicam	DMSO/Solutol HS15 10% in phosphate buffer (10:90)	5.0

^a the administered dose was calculated as 20% of the LD₅₀ injected IV in mice and then adjusted if necessary.

2.5.1 *In vitro* / *in vivo* correlation (IVIVC)

The correlation between log BB and log P_{app} or log P_e was established using the GraphPad Prism® software (version 7.01) by plotting the average log P_{app} or log P_e value of each drug against its mean *in vivo* counterpart (log BB). Coefficient of determination (r^2) was then calculated using linear regression.

In order to establish the drug ranking for a given model, each drug log value ($\log \text{value}_{\text{drug}}$) was subtracted by the lowest drug log value ($\log \text{value}_{\text{min}}$) and then divided by the difference between the highest ($\log \text{value}_{\text{max}}$) and lowest ($\log \text{value}_{\text{min}}$) values in the distribution, as in Eq. (9).

$$\text{Eq.9} \quad \text{normalized log value}_{\text{drug}} = (\log \text{value}_{\text{drug}} - \log \text{value}_{\text{min}}) / (\log \text{value}_{\text{max}} - \log \text{value}_{\text{min}})$$

2.6 LC-MS/MS drug analysis

The gradient LC-MS/MS system consisted of an Agilent Technologies HPLC 1100 Series (Mississauga, ON, Canada) equipped with a degassing system (G1379A), a binary pump (G1312A), a refrigerated autosampler (G1367A) and a column oven (G1316A). The detector was an API4000 Q TRAP™ hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (AB Sciex, MA, USA) with a turbo electrospray ionisation source (ESI). Chromatographic and detection conditions are detailed in Table 3.2. Mass spectrometry (MS) conditions for all drugs were set at infusing 1 μM of the pooled test solutions at 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ while the dwell times were set at 70 ms. Chromatography was performed using a YMC-Pack ODS-AQ column (5 μm , 3.0 x 50 mm; YMC America Inc., PA, USA). Sample injection volume was 4 μL and the LC flow rate was 0.75 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Mobile phase (A) was milliQ water with 0.2 % formic acid (FA) and mobile phase (B) was acetonitrile with 0.1% FA. The gradient elution started with a 20-s hold at 2 % mobile phase (B), followed by a 3.5 min ramp to 100 % mobile phase (B). Next, there was a 1.1 min of stabilisation at 100 % (B) and a fall in 10 s at 2 % (B) followed by a re-equilibration at 2% (B) for 2 min. The mass spectrometer and peripherals (pumps and autosampler) were all controlled by Analyst® software (version 1.6.2; AB Sciex).

2.7 Statistical analysis

All data are presented as means \pm standard deviations and differences were considered statistically significant at $p < 0.0332$ using the unpaired t-test with Welch's correction ($p \geq 0.0332$: non-statistically significant (ns), * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$, ND: not detected).

The puromycin cell viability assay data were analyzed using a 2-way ANOVA test and differences were considered statistically significant at $p < 0.0332$.

3. Results

3.1 Endothelial cells - basal characterization

3.1.1 Morphology of mouse brain endothelial cells

Primary brain endothelial cell isolation from mice provides cellular confluent layers in 5 to 8 days. ECs were identifiable by their spindle shape and by their specific proliferating pattern in a dense homogeneous monolayer. Their nuclei were well-defined, in contrast with their membranes which were more difficult to observe. When proliferating, they multiplied while remaining in contact with other ECs, but no overlapping phenomenon was observed. A concentric pattern was observed around the brain capillaries from which duplicated cells emerged (Figure S1. A).

Culture of the bEnd.3 cell line (passages 8 to 20) allowed obtaining confluent monolayers in 2 to 4 days. As for primary cells, the monolayers were composed of spindle-shaped cells, with visible dense nuclei and cell membranes difficult to detect. These cells also grew in a dense, non-overlapping monolayer. Thus, it was difficult to differentiate the two cell types according to their origin by a simple microscopic observation of their morphology (Figure S1. B).

3.1.2 mRNA expression for brain mouse ECs specific proteins

Gene expression of main MBRT and TJ proteins was quantified using the qPCR technique. Thus, the mRNA expression of two efflux transporters (Pgp and BCRP), two nutrient transporters (GLUT-1 and LAT-1) and three TJ proteins (ZO-1, OCL, CL-5) was analyzed. Prior qPCR, the mRNA quality was assessed using the Agilent 2100 bioanalyzer system and RIN for all samples were within 8.9-9.9.

Since cells were grown in specific media according to their origin, the first step consisted in comparing gene expressions of primary BMEC grown in their own specialized culture medium to that of bEnd.3 cells grown in DMEM/10% FBS/1×Pen/Strep medium. In these conditions, and after normalizing results, BMEC showed significantly higher gene expression levels for most of the tested proteins compared to bEnd.3 cells (955-fold increase for Pgp, 12-fold for GLUT-1, 6-fold for LAT-1, 4-fold for ZO-1, 7-fold for OCL and 6-fold for CL-5, respectively). No significant difference was noticed for BCRP mRNA coding gene (Figure 3.1. A).

Next, we compared the influence of the growth medium (richer for BMEC) on the mRNA expression of the BMEC to that of bEnd.3 cells, both grown in the specialized BMEC culture medium. Relative mRNA gene expression levels were statistically greater in BMEC than in bEnd.3 (6576-fold increase for Pgp, 4-fold for BCRP, 69-fold for GLUT-1, 22-fold for LAT-1, 3-fold for ZO-1 and 13-fold increase for OCL respectively). No significant difference was noticed for CL-5 (Figure 3.1. B).

The same tendency was observed when the samples were analyzed by ddPCR: (2319-fold for Pgp, 3-fold for BCRP, 11-fold for GLUT-1, 12-fold for LAT-1, 2-fold for ZO-1 and 9-fold for OCL and 0.3-fold increase for CL-5), as shown in Figure S2. Overall, the mRNA gene expression for the tested proteins were higher for the primary BMEC, when compared with bEnd.3 either grown in their own growth medium or the rich supplemented one used for the primary culture.

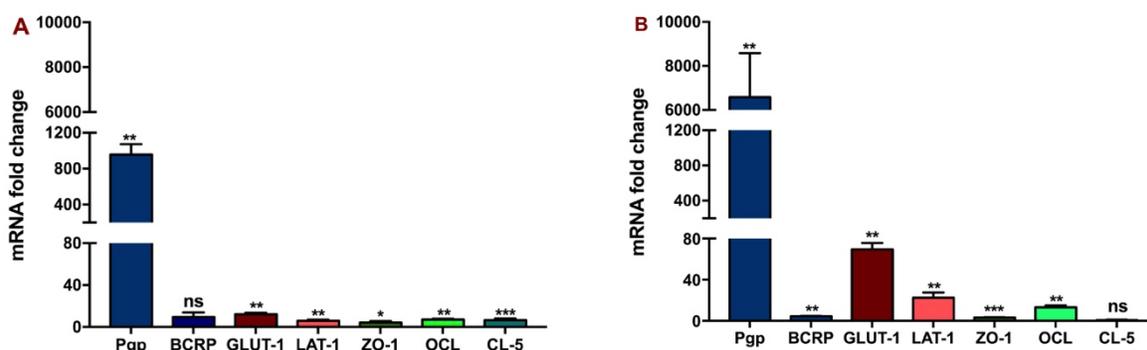


Figure 3.1. mRNA expression fold-change between BMEC and bEnd.3 cell line grown in (A) DMEM medium and in (B) specialized BMEC medium. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with HPRT as the housekeeping gene and the bEnd.3 cell line as the calibrator. The bars indicate the average mRNA fold change \pm SD (n=3). Data were analyzed using an unpaired t test with Welch's correction (non-statistically significant (ns): $p \geq 0.0332$, * $p < 0.0332$, ** $p < 0.0021$, *** $p < 0.0002$).

3.1.3 Puromycin viability assay

Puromycin is a Pgp substrate used for ECs selection from freshly-isolated brain capillaries [34]. Used at 4-10 $\mu\text{g/mL}$, cell cultures are progressively enriched in ECs, as only these cells display enough Pgp to protect themselves from puromycin toxicity. In order to confirm the huge difference between the mRNA levels for Pgp of the two ECs types, a cell viability assay was

performed in the presence of increasing puromycin concentration (0-100 $\mu\text{g/mL}$). From puromycin concentrations as low as 0.05 $\mu\text{g/mL}$, the bEnd.3 cell viability was significantly reduced (by ~40-50 %) compared to untreated cells, whereas BMEC viability remained between 80-110%, whatever the tested concentration (Figure 3.2.). This confirmed the superior expression of the Pgp functional protein present at the primary BMEC membrane surface.

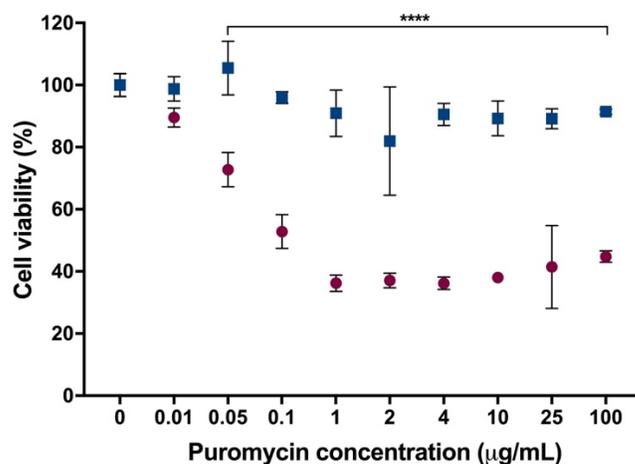


Figure 3.2. Effect of puromycin on BMEC (blue) and bEnd.3 cell (red) viability. Data were analyzed using a 2-way ANOVA test (**** $p < 0.0001$). Points represent the average cell viability \pm SD (n=6).

3.2 Monolayer models and subsequent characterization

3.2.1 TEER and P_e of fluorescent markers

Primary BMEC and bEnd.3 cells were used to establish the two-compartment, monolayered, models in Transwell® plates, with confluence observed at day 7. Two techniques were used to assess the model integrity and tightness. First, ohmic resistance and TEER calculation were performed at days 2, 3, 4 and 7. Then the permeability of two fluorescent markers was determined at day 7 for both models.

TEER for the BMEC model showed 2-fold higher values compared to those calculated for the bEnd.3 model. This significant difference was observed from day 2 to 7 (Figure 3.3. A). Thus, on day 7, the primary model displayed a TEER value of $80 \pm 10 \Omega \times \text{cm}^2$ while the bEnd.3 model showed a TEER of $40 \pm 4.5 \Omega \times \text{cm}^2$.

NaFl permeability assay resulted in a similar P_e for the BMEC model ($8.1 \pm 1.1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) and the bEnd.3 one ($8.5 \pm 0.4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) (Figure 3.3. B). FITC-dextran was not detected in the

lower compartment of the bEnd.3 monolayer after 75 min, while the BMEC model yielded a P_e of $3.8 \pm 0.1 \times 10^{-6}$ cm/s.

As compared to the bEnd.3 model, the BMEC monolayer showed higher TEER and lower P_e values, thus forming a tighter monolayer more relevant for the BBB drug screening.

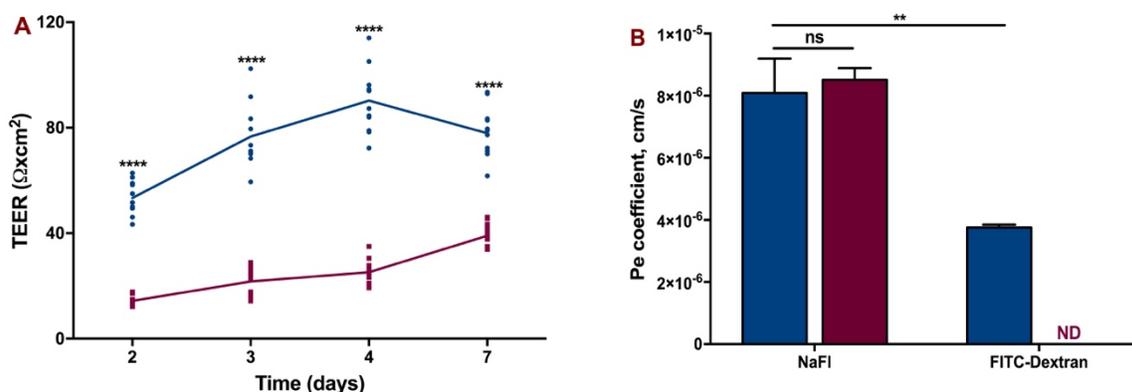


Figure 3.3. (A) Transendothelial electrical resistance (TEER, expressed as $\Omega \times \text{cm}^2$) and (B) endothelial P_e for sodium fluorescein (NaFl) and FITC-dextran (P_e , expressed in cm/s) of the blood–brain barrier models built from mouse primary brain endothelial cells (BMEC, blue) and from mouse brain endothelial cell line (bEnd.3, red). All data are presented as means \pm SD ($n = 12$ for TEER, $n = 4$ for P_e). Statistical analysis: unpaired t test with Welch’s correction (ns: $p \geq 0.0332$, **** $p < 0.0001$, ND- not detected).

3.2.2 Influence of the support material on the gene expression of brain endothelial monolayers

In order to ensure that the differences observed between both types of ECs were not related to any specific affinity for their culture support, the qPCR technique was used to compare their mRNA gene expression levels for the specific proteins.

First, brain ECs grown in a culture flask were compared to those grown on the permeable polyester membrane of the Transwell® inserts (as used in the BBB model set-up).

Primary BMEC grown on the polyester membrane insert filter displayed statistically significant mRNA fold change expression for BCRP (1.4-fold increase) and LAT-1, ZO-1 and CL-5 (4-, 2- and 1.5-fold decreases, respectively) compared to BMEC grown in a culture flask. There were no significant differences for Pgp, GLUT-1 and OCL mRNA expression (Figure 3.4. A).

The complementary ddPCR analysis highlighted that mRNA expression for ZO-1 and CL-5 was decreased by 1.5- and 1.2-fold, respectively, when cells were cultured on the polyester membrane, while no difference was noticed for Pgp, GLUT-1 and OCL mRNA expression (Figure S3. A).

For bEnd.3 cells grown on the polyester membrane insert filter, the mRNA fold change expression for the BCRP, ZO-1, CL-5 showed a 1.8-, 2.3- and 6.6-fold increase, respectively. For GLUT-1, OCL and LAT-1, the gene expression presented a 1.4-, 1.4- and 2.5-fold decrease, respectively, compared to cells grown in a culture flask. There were no significant differences for the Pgp mRNA expression (Figure 3.4. B). The complementary ddPCR analysis highlighted that the mRNA expression of TJ proteins was greater (for ZO-1 and CL-5 by 1.2-fold, and for OCL by a 1.4-fold change increase, respectively). A 1.2-fold decrease was noticed for the GLUT-1 transporter in the cells grown on the polyester membrane, while no difference was noticed for Pgp mRNA expression (Figure S3. B).

In conclusion, only ZO-1 and CL-5 mRNA expression for the bEnd.3 model was affected by the support growth material. As so, the ECs mRNA quantification prior the model construction already gave a fair indication on the model quality and performance.

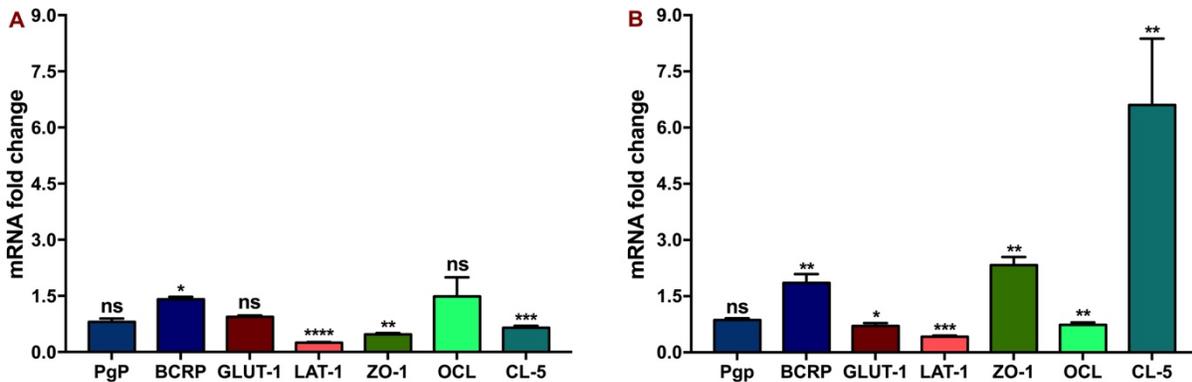


Figure 3.4. Differences in the fold-change of gene expression between (A) BMEC and (B) bEnd.3 cells grown on a polyester membrane insert filter compared to cells grown on plastic cell culture flask. Relative gene expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, with HPRT as the housekeeping gene and cells grown on the plastic cell culture flask as the calibrator. Data were analyzed using an unpaired t test with Welch's correction (ns : $p \geq 0.0332$, $*p < 0.0332$, $**p < 0.0021$, $***p < 0.0002$, $****p < 0.0001$). The bars indicate the average mRNA fold change \pm SD (n=3).

3.2.3 Immunostaining of TJ proteins

A qualitative identification of the TJ proteins CL-5 and ZO-1 was obtained by immunostaining. ECs monolayer models were stained just after the permeability assay by directly incubating them with anti-CL-5 and anti-ZO-1 antibodies. The resulting fluorescent images revealed the formation of a continuous ECs monolayer, still undamaged after a 75-min permeability assay. Furthermore, the correct localization of the TJ proteins was verified (Figure S4).

3.3 *In vivo* / *in vitro* correlation and validation

Performance of the *in vitro* established models was compared to a PAMPA-BBB assay which discriminates drug permeabilities according to their partition coefficient between a simple lipid layer (mimetic of brain tissues) and a buffered medium (mimetic of blood but deprived of proteins) [35]. To that extend, seven drugs presenting a wide range of physicochemical properties (Table 3.1) were tested *in vitro* on the three different models. Furthermore, the *in vivo* permeability of these drugs (log BB) was also determined in C57BL/6 mice.

First, P_{app} or P_e coefficients were calculated for each of the seven drugs, in each of the three *in vitro* models. Obtained values were then plotted against the logarithm value of the brain-to-blood concentration ratio (log BB) (Figure 3.5. A-C).

For each model, a correlation coefficient (r^2) was calculated by linear regression. This r^2 value was used to assess the reliability of each model to predict *in vivo* permeability. The correlation coefficient for the PAMPA-BBB model was found to be $r^2=0.391$ (Figure 3.5. A) whereas for the bEnd.3 model, $r^2=0.019$ (Figure 3.5. B) and for BMEC model, $r^2=0.765$ (Figure 3.5. C).

Permeability values were then normalized to determine drug ranking from ‘best ability to cross the BBB’ to ‘worst ability to cross the BBB’, based on each model. The *in vivo* results were used as a reference and each *in vitro* model was challenged for its capacity to rank drugs in the same order as observed in mice. For the most lipophilic tested drug, *i.e.* chlorpromazine, only the BMEC and PAMPA-BBB models properly classified it as ‘best ability to cross the BBB’. As for the most hydrophilic drug, namely tenoxicam, only the BMEC model ranked it correctly as ‘worst ability to cross the BBB’. Globally, out of the three *in vitro* models, only the BMEC one displayed an overall adequate ranking for the 7 drugs. Both the PAMPA-BBB and bEnd.3 models proved their inability to correctly discriminate these seven drugs.

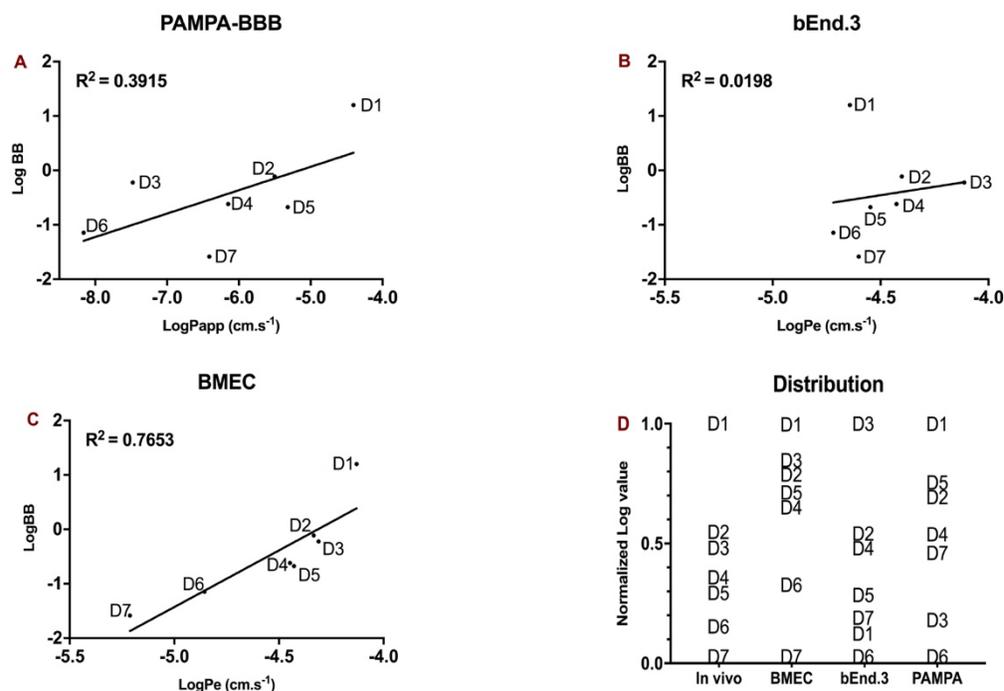


Figure 3.5. Linear regression plots for *in vitro* P_e – *in vivo* log BB correlation (IVIVC) using different models for seven drugs: (A) PAMPA-BBB, (B) bEnd.3 model and (C) BMEC. (D) Distribution of drug ranking according to the selected model. D1: chlorpromazine; D2: midazolam, D3 caffeine, D4: theophylline, D5: verapamil, D6: atenolol, D7: tenoxicam.

4. Discussion

4.1 Although morphologically identical, primary and immortalized brain ECs display different genomic patterns.

BBB primary cells are generally criticized because their isolation is expensive, laborious and the resulting culture is often contaminated with other BBB cells, such as pericytes or astrocytes [36]. However, this issue is currently partially addressed since recent cell isolation protocols are easier to perform [37, 38]. Moreover, the use of puromycin leads to an enriched culture in 5-7 days [34], as in the case of the primary ECs we isolated from the adult brains of C57BL/6 mice. The isolation process took six hours for 10 to 30 mice, yielding around two million cells. The time-lapse from seeding the extracted capillaries to observing a confluent ECs monolayer was maximum 7 days, only one third of the time needed to establish a Caco-2 monolayer [39].

Despite their longer time to confluency, these latter cells are currently widely used in the pharmaceutical R&D for the drug screening.

On the other hand, immortalized brain endothelial cell lines are readily available and their fast proliferation rates lead to a confluent cell monolayer in 2 to 4 days. Immortalized cells theoretically preserve most of their original characteristics, but some are diminished or even lost when passaged. Herein, we used the bEnd.3 cells, an immortalized cell line obtained by infecting primary cultures of brain ECs from BALB/c mice with the middle T-expressing N-TK_{mT} retrovirus [40]. The bEnd.3 cell line, the most used mouse brain endothelial cell line [18], was proposed as a model for the evaluation of BBB function [36], especially the paracellular barrier [41], and as a BBB model for drug uptake and transport studies [42, 43].

In order to establish the validity of the studied models, we first examined the cell features for their known ECs morphology and characteristics. The microscopic observation showed similar spindle-shape morphology, typical of ECs [42] for both primary and bEnd.3 cells (Figure S1.). As the BMEC model established in this work was designed for drug screening, evaluation of the presence of main MBRT and TJ proteins, implicated in drug passage across the BBB, was mandatory.

Based on comparative qPCR analyses, mRNA gene expression of Pgp, BCRP, GLUT-1, LAT-1, ZO-1, OCL and CL-5 was confirmed in BMEC and bEnd.3 cells, both grown in their own culture medium. Relative expression of all tested genes, except BCRP, was statistically increased in BMEC (Figure 3.1. A). As only the BMEC medium contained growth factors and puromycin, substances known to increase the expression of certain proteins [44], we compared the expression of the same genes from BMEC and bEnd.3 cells both grown in the richer BMEC medium. In that case, Pgp, BCRP, GLUT-1, LAT-1 and OCL relative mRNA expressions became even higher, in favor of the primary cells (Figure 3.1. B). The lower mRNA expression of these genes in bEnd.3 cells, as compared to primary cells, stand out as an unavoidable transformation due to immortalization, as previously reported for other cell lines [45]. The Western blot analysis of TJ proteins performed by Watanabe *et al.* showed comparable tendencies, *i.e.* similar protein expression levels for OCL, an increased level for ZO-1 and a decrease for CL-5 when comparing primary mouse ECs with the bEnd.3 cell line [41]. However, primary cells used in their study were isolated from ICR mice, as opposed to C57BL/6 mice used in ours.

Pgp, an efflux protein transporter, is another BBB highly-expressed protein to be found in a valid BBB model. Pgp relative mRNA expression was more than 3-log increased in primary compared to bEnd.3 cells. To ascertain this yet unreported result, we performed a MTS viability assay in presence of increasing concentrations of puromycin, a Pgp substrate. Results showed that, only in BMEC, the Pgp transporter was effective enough to maintain a high cell viability, as opposed to bEnd.3 in which only 50% of cells survived after a 48-h exposure (Figure 3.2.). Consequently, BMEC not only expressed more Pgp mRNA, but this mRNA was translated into a higher number of functional, active Pgp proteins present at the cell membrane.

4.2 Primary cells form a tighter, more impermeable monolayer model than immortalized cells

Cells were turned into *in vitro* models when they were cultured on porous polymeric membranes separating two compartments (Transwell® plates). When evaluating a BBB model, two basic characteristics must be retrieved: its electrical resistance, by calculating the TEER, and its P_e for paracellular markers [28]. Both parameters were therefore used to compare the effectiveness of the BMEC and the bEnd.3 models to form a tight monolayer.

First of all, TEER values reflect the monolayer integrity and the ability of cells to form TJ between them. From our protocol, the primary BMEC monolayer displayed a TEER value of about $80 \pm 10 \Omega \times \text{cm}^2$ at day 7, using electrode chambers to measure the electrical resistance (Figure 3.3. A). In order to establish its relevance, we sought to compare this value with those reported by others for similar models. Results were very disparate, ranging from $20\text{-}30 \Omega \times \text{cm}^2$ [37, 46] to $140 \Omega \times \text{cm}^2$ [26], with most common values around $120\text{-}125 \Omega \times \text{cm}^2$ [47, 48]. Those discrepancies could be linked to various time-to-confluency (from 5 to 7 days), electrode formats (chopstick-like, chambers or automated systems), insert surface (12- or 24-well plates) or cell seeding density. As for the bEnd.3 model, the observed TEER values were twice smaller ($\approx 40 \pm 4.5 \Omega \times \text{cm}^2$) than those of the BMEC model (Figure 3.3. A). Once again, values retrieved from various research articles showed divergences, ranging from $17 \Omega \times \text{cm}^2$ [8] to $140 \Omega \times \text{cm}^2$ [49], with most of the reported values in the $20\text{-}40 \Omega \times \text{cm}^2$ range [26, 42, 50].

The electrical resistance measurement of static monolayer models is usually performed using voltmeters, equipped either with chopstick-like electrodes or electrode chambers, and more

rarely continuous automated systems. The chopstick-like electrodes give higher and variable resistance values in comparison with electrode chambers resulting in smaller but steadier values [51]. Besides, such factors as seeding density [46], time-to-confluency, as well as medium composition [52], insert membrane properties and their commercial source have been reported to impact TEER values [26]. Accordingly, TEER values cannot be used alone as markers for model tightness and must be backed by permeability studies.

The BMEC model showed no statistical difference in P_e for the paracellular hydrophilic marker NaFl when compared with the bEnd.3 model (Figure 3.3.B), as previously reported [41]. Additionally, the BMEC model showed statistically different permeability values when using either 376-Da NaFl or FITC-D, a higher molecular weight marker with lower permeability. On the contrary, no permeability was detected for bEnd.3 model for FITC-Dextran. Kutuzov *et al.* demonstrated that the permeability of hydrophilic molecules depended on their molecular weight [53] and that the endothelium negatively-charged glycocalyx was implicated in the process when the molecular weight of tested molecules was over 600 kDa [54]. The presence of the glycocalyx at the bEnd.3 cell surface [55], but less in BMEC [56], could have reduced the passage of the 150 kDa FITC-D in the bEnd.3 model, thus preventing its quantification. The extent of glycocalyx involvement in drug permeation through the BBB is still unknown and should warrant further investigations.

As the setup of the *in vitro* models implied growing cells on polyester membrane inserts instead of plain polystyrene plates, we evaluated whether changes in mRNA gene expression for specific proteins occurred when shifting from one support material to another. Wuest *et al.* reported an impact of the support material on cell growth [26]. However, their study was limited to TEER values and P_e . In our case, we assessed the relative quantification of MBRT and TJs mRNA as well.

For the BMEC model, even if the transfer to the polyester membrane showed a statistically significant increase in the mRNA expression of CL-5 and ZO-1, the biological relevance was disputable (< 2-fold increase, Figure 3.4. A). For the bEnd.3 model, the mRNA expressions of CL-5 and ZO-1 were increased by 6.6 and 2.3-fold (Figure 3.4. B). A previous study regarding the bEnd.3 model showed no change in the mRNA expression for those proteins when grown on permeable Transwell® supports [36]. However, the study used bEnd.3 cells with passages between 25-35 and information on the Transwell® membrane material was omitted. An

interesting fact is that CL-5 level is not proportional with TEER values, as cells like Caco-2, VB-Caco-2 and MDCK-MDR1 do not express CL-5 but show high values of TEER [57]. However, CL-5 and ZO-1, along with OCL, are the hallmark of brain ECs, even if their implication in the BBB permeability is not fully understood. Furthermore, CL-5 and ZO-1 immunostaining (Figure S4.) allowed confirming the accurate localization of these proteins found at the cell membranes and the cell-cell points sealing the ECs in a tight, continuous monolayer.

Apart from ZO-1 and CL-5 for the bEnd.3 model, all other mRNA expression levels were not significantly altered from a biological standpoint ($0.5 < \text{change factor} < 2\text{-fold}$). According to these results, mRNA quantification from flask-cultured cells already gave a fair indication of the established model. The change of support material appeared to have only a slight impact on the ability of both cell types to comply with adequate model properties. Nonetheless, based on electrical resistance and permeability assays, the primary BMEC model was found superior to the bEnd.3 one.

4.3 Primary cells allow a better predictability of drug permeation across the BBB

In vitro models are extremely valuable tools in the early stage of CNS drug discovery. Although the scientific community agrees to their limited capacity to accurately reproduce the *in vivo* BBB properties, those models are needed because they allow a rapid screening between various molecules at a lower cost than animal studies. In this context, an *in vitro* mouse model displays the great advantage, compared to other animal models, of being readily paralleled with *in vivo* data found in numerous publications.

The ultimate step of this study was thus to test the permeability of seven drugs on three *in vitro* models and compare the results with *in vivo* data obtained in mice. The comparison was achieved on two levels: the conventional IVIVC based on the linear correlation between $\log BB$ and $\log P_{app}$ ou $\log P_e$ and a second approach consisting in comparing the normalized ranking of the 7 drugs with their *in vivo* ranking based on normalized $\log BB$.

The IVIVC results of the 3 *in vitro* models yielded quite unexpected observations. The best correlation coefficient ($r^2 = 0.765$, Figure 3.5. C) was achieved by BMEC model. However, the second best was the PAMPA-BBB model ($r^2 = 0.39$, Figure 3.5. A), an acellular assay mainly based on the partition coefficient between an aqueous phase and a polar phospholipid one.

PAMPA-BBB is known as a suitable model to evaluate the passive permeability of small lipophilic drugs [15]. The least reliable model, in our conditions, was the bEnd.3 model ($r^2 = 0.019$, Figure 3.5. B). Due to its nature, the PAMPA-BBB assay results ($\log P_{app}$) best correlated with $\log P$ values ($r^2 = 0.7570$). When removing from the analysis the two drugs with the highest water solubilities, *i.e.* atenolol (D6) and theophylline (D4), the correlation was even greater ($r^2 = 0.9692$). However, $\log BB$ did not correlate well with $\log P$ ($r^2 < 0.36$), demonstrating that the presence of cells in the *in vitro* models was mandatory to correctly predict drug passage *in vivo*. The two cellular models, surprisingly, gave very dissimilar correlation with *in vivo* results. Therefore, drug ranking was also analyzed to offer the better possible predictability (Figure 3.5. D). The distribution pattern of the drug rankings appeared very comparable between normalized $\log BB$ and $\log P_e$. Nonetheless, the drug ranking was utterly wrong with the bEnd.3 model, as it was for the PAMPA-BBB model. On the contrary, the BMEC model alone was capable to discriminate between high-, moderate- and low-permeability drug groups. Based on the work of Vilar *et al.* [58], drugs can be divided into three distinct groups according to their $\log BB$: CNS⁺⁺ or CNS⁺ (both displaying CNS activity) if $\log BB \geq 0.3$ or $-1 < \log BB < 0.3$, respectively, and CNS⁻ (no known CNS activity) if $-1 \leq \log BB$. Thus, D6 and D7 could be qualified as CNS⁻, D2 to D5 as CNS⁺ and D1 as CNS⁺⁺. The BMEC model generated a correct ranking, distinguishing correctly between the most brain-permeable molecule (chlorpromazine, D1) and the two least brain-permeable molecules, namely atenolol (D6) and tenoxicam (D7). The four CNS⁺ drugs were also correctly ranked as moderately permeable, with D2/D3 (midazolam/caffeine) and D4/D5 (theophylline/verapamil) grouped as close pairs.

To the best of our knowledge, this study is the first to design and validate a primary mouse model, correlated with *in vivo* data obtained at the same time. Previously published by Nakagawa *et al.*, the validation of a rat triple BBB model with 19 drugs yielded a $r^2=0.89$ [21]. However, the *in vivo* data was obtained only after 5 min post drug injection. Another study reported the screening of 10 molecules on different *in vitro* models with various successes: a primary rat model ($r^2=0.79$), a Caco-2 model ($r^2=0.6$), a VB-Caco-2 model ($r^2=0.72$) and a MDCK-MDR1 model ($r^2=0.77$) [57]. This work correlated their results with the *in vivo* data by Nakagawa *et al.* [21].

Limitations of this study involve the number of tested molecules, which could be increased, and the fact that the $\log BB$ was calculated in a standardized manner, *i.e.* 2 h post-injection. This

latter point could be improved by taking into account pharmacokinetics parameters for each individual drug. For instance, different elimination half-lives could contribute differently to brain accumulation [59]. A way to eliminate such variability, especially for drugs under development, would be to quantify the brain-blood ratio at 3 different time points, in order to encompass quantifications at brain equilibrium half-life [60]. Nonetheless, whenever in needs for a predictive tool for BBB passage of small molecules, the BMEC model appears far more effective than the bEnd.3 model and the conventional PAMPA-BBB model. It also offers the unique possibility to easily study the underlying mechanisms involved in the passage of drug molecules into the brain compartment.

5. Conclusion

In the present study, we compared two *in vitro* cellular models of the BBB with *in vivo* permeability data. To achieve this comparison, we examined those models on three different stages. At the cellular level, although morphologically very similar, the BMEC model displayed higher relative mRNA expression levels of junctional and transporter proteins than the immortalized bEnd.3 cells, especially the crucial P-gp efflux protein. When assembled into a two-compartment model, the BMEC model demonstrated both higher TEER values and more discriminating capabilities than the bEnd.3 model. Taken together, these favorable features translated into a better IVIVC for a panel of seven drugs displaying a wide range of blood-brain distribution.

An ideal BBB model intended for drug screening should enable low-cost, rapid and reproducible assessment of a drug capability to overcome or not the BBB natural barrier characteristics. Among all proposed static cell models, the mouse BMEC model, based on 0.33-cm² Transwell® inserts, requires less cell material, and therefore fewer animal sacrifices, than *in vivo* permeability studies. The mouse remains the most polyvalent and well-studied animal model in research studies. Given the wide variety of specific mouse knockout-strains and the well-studied mouse genome, the design of a validated BBB model from mouse primary brain cells appears an invaluable asset to early-phase drug screening. The BMEC model evaluated in this study, although not ideal in all aspects, can nevertheless provide precious information on BBB permeability and is therefore a worthwhile tool in CNS drug discovery

Acknowledgements

IP is thankful for her scholarship from Fonds de Recherche du Québec- Nature et Technologies. FB was supported by scholarships from Université de Montréal (FESP, GRUM). The authors wish to thank Raphaëlle Lambert for her technical assistance with PCR experiments.

Funding

This work was supported by the Fonds de Recherche du Québec- Nature et Technologies [FQR-NT, grant number 191486] and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada [NSERC, grant number RGPIN/06506-2014]

References

- [1] M.S. Alavijeh, M. Chishty, M.Z. Qaiser, A.M. Palmer, Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery, *NeuroRx*, 2 (2005) 554-571.
- [2] N.J. Abbott, Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery, *J Inher Metab Dis*, 36 (2013) 437-449.
- [3] W.M. Pardridge, Blood-brain barrier delivery, *Drug Discov Today*, 12 (2007) 54-61.
- [4] D.B. Stanimirovic, M. Bani-Yaghoub, M. Perkins, A.S. Haqqani, Blood-brain barrier models: in vitro to in vivo translation in preclinical development of CNS-targeting biotherapeutics, *Expert Opin Drug Discov*, 10 (2015) 141-155.
- [5] Z. Rankovic, CNS drug design: balancing physicochemical properties for optimal brain exposure, *J Med Chem*, 58 (2015) 2584-2608.
- [6] R. Narayanan, S.B. Gunturi, In silico ADME modelling: prediction models for blood-brain barrier permeation using a systematic variable selection method, *Bioorg Med Chem*, 13 (2005) 3017-3028.
- [7] Z. Wang, H. Yang, Z. Wu, T. Wang, W. Li, Y. Tang, G. Liu, In Silico Prediction of Blood-Brain Barrier Permeability of Compounds by Machine Learning and Resampling Methods, *ChemMedChem*, 13 (2018) 2189-2201.
- [8] A. Wolff, M. Antfolk, B. Brodin, M. Tenje, In Vitro Blood-Brain Barrier Models-An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches, *J Pharm Sci*, 104 (2015) 2727-2746.
- [9] J. Bicker, G. Alves, A. Fortuna, A. Falcao, Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review, *Eur J Pharm Biopharm*, 87 (2014) 409-432.
- [10] R. Booth, H. Kim, Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (μ BBB), *Lab Chip*, 12 (2012) 1784-1792.
- [11] W. Koh, A.N. Stratman, A. Sacharidou, G.E. Davis, In vitro three dimensional collagen matrix models of endothelial lumen formation during vasculogenesis and angiogenesis, *Methods Enzymol*, 443 (2008) 83-101.
- [12] L. Cucullo, M.S. McAllister, K. Kight, L. Krizanac-Bengez, M. Marroni, M.R. Mayberg, K.A. Stanness, D. Janigro, A new dynamic in vitro model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier, *Brain Res*, 951 (2002) 243-254.
- [13] C.F. Cho, J.M. Wolfe, C.M. Fadzen, D. Calligaris, K. Hornburg, E.A. Chiocca, N.Y.R. Agar, B.L. Pentelute, S.E. Lawler, Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents, *Nat Commun*, 8 (2017) 15623.
- [14] J.-Y. Goh, R.J. Weaver, L. Dixon, N.J. Platt, R.A. Roberts, Development and use of in vitro alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980–2013, *Toxicol Res*, 4 (2015) 1297-1307.
- [15] J. Bicker, G. Alves, A. Fortuna, P. Soares-da-Silva, A. Falcao, A new PAMPA model using an in-house brain lipid extract for screening the blood-brain barrier permeability of drug candidates, *Int J Pharm*, 501 (2016) 102-111.
- [16] D.A. Volpe, Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines, *Future Med Chem*, 3 (2011) 2063-2077.

- [17] J. Mensch, A. Melis, C. Mackie, G. Verreck, M.E. Brewster, P. Augustijns, Evaluation of various PAMPA models to identify the most discriminating method for the prediction of BBB permeability, *Eur J Pharm Biopharm*, 74 (2010) 495-502.
- [18] N.A. Rahman, A. Rasil, U. Meyding-Lamade, E.M. Craemer, S. Diah, A.A. Tuah, S.H. Muharram, Immortalized endothelial cell lines for in vitro blood-brain barrier models: A systematic review, *Brain Res*, 1642 (2016) 532-545.
- [19] M. Culot, S. Lundquist, D. Vanuxeem, S. Nion, C. Landry, Y. Delplace, M.P. Dehouck, V. Berezowski, L. Fenart, R. Cecchelli, An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening, *Toxicol In Vitro*, 22 (2008) 799-811.
- [20] L.B. Thomsen, A. Burkhardt, T. Moos, A Triple Culture Model of the Blood-Brain Barrier Using Porcine Brain Endothelial cells, Astrocytes and Pericytes, *PLoS One*, 10 (2015) e0134765.
- [21] S. Nakagawa, M.A. Deli, H. Kawaguchi, T. Shimizudani, T. Shimono, A. Kittel, K. Tanaka, M. Niwa, A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes, *Neurochem Int*, 54 (2009) 253-263.
- [22] C. Coisne, L. Dehouck, C. Faveeuw, Y. Delplace, F. Miller, C. Landry, C. Morissette, L. Fenart, R. Cecchelli, P. Tremblay, B. Dehouck, Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium, *Lab Invest*, 85 (2005) 734-746.
- [23] J.I. Alvarez, A. Dodelet-Devillers, H. Kebir, I. Ifergan, P.J. Fabre, S. Terouz, M. Sabbagh, K. Wosik, L. Bourbonniere, M. Bernard, J. van Horssen, H.E. de Vries, F. Charron, A. Prat, The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence, *Science*, 334 (2011) 1727-1731.
- [24] F. Luhder, H. Kebir, F. Odoardi, T. Litke, M. Sonneck, J.I. Alvarez, J. Winchenbach, N. Eckert, L. Hayardeny, E. Sorani, D. Lodygin, A. Flugel, A. Prat, Laquinimod enhances central nervous system barrier functions, *Neurobiol Dis*, 102 (2017) 60-69.
- [25] M.A. Lecuyer, O. Saint-Laurent, L. Bourbonniere, S. Larouche, C. Larochelle, L. Michel, M. Charabati, M. Abadier, S. Zandee, N. Haghayegh Jahromi, E. Gowing, C. Pittet, R. Lyck, B. Engelhardt, A. Prat, Dual role of ALCAM in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114 (2017) E524-e533.
- [26] D.M. Wuest, A.M. Wing, K.H. Lee, Membrane configuration optimization for a murine in vitro blood-brain barrier model, *J Neurosci Methods*, 212 (2013) 211-221.
- [27] B. Srinivasan, A.R. Kolli, M.B. Esch, H.E. Abaci, M.L. Shuler, J.J. Hickman, TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems, *J Lab Autom*, 20 (2015) 107-126.
- [28] M.A. Deli, C.S. Ábrahám, Y. Kataoka, M. Niwa, Permeability Studies on In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology, *Cell Mol Neurobiol*, 25 (2005) 59-127.
- [29] United States Pharmacopeia and National Formulary (USP42-NF37 - 6161). Rockville, MD: United States Pharmacopeial Convention; 2018, Accessed Decembre 13, in, 2018.
- [30] L. Di, E.H. Kerns, I.F. Bezar, S.L. Petusky, Y. Huang, Comparison of blood–brain barrier permeability assays: in situ brain perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB, *J Pharm Sci*, 98 (2009) 1980-1991.
- [31] X. Xu, W. Li, L. Francis, Quantitative Mass Spectrometry in Support of Pharmacokinetic Studies, *Mass Spectrometry Handbook*, 7 (2012) 171.

- [32] P.V. Balimane, E. Pace, S. Chong, M. Zhu, M. Jemal, C.K. Pelt, A novel high-throughput automated chip-based nanoelectrospray tandem mass spectrometric method for PAMPA sample analysis, *J Pharm Biom Anal*, 39 (2005) 8-16.
- [33] U. Bickel, How to measure drug transport across the blood-brain barrier, *NeuroRx*, 2 (2005) 15-26.
- [34] N. Perriere, P. Demeuse, E. Garcia, A. Regina, M. Debray, J.P. Andreux, P. Couvreur, J.M. Scherrmann, J. Temsamani, P.O. Couraud, M.A. Deli, F. Roux, Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties, *J Neurochem*, 93 (2005) 279-289.
- [35] G. Vizseralek, T. Balogh, K. Takacs-Novak, B. Sinko, PAMPA study of the temperature effect on permeability, *Eur J Pharm Sci*, 53 (2014) 45-49.
- [36] R.C. Brown, A.P. Morris, R.G. O'Neil, Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells, *Brain Res*, 1130 (2007) 17-30.
- [37] T. Ruck, S. Bittner, L. Epping, A.M. Herrmann, S.G. Meuth, Isolation of primary murine brain microvascular endothelial cells, *J Vis Exp*, (2014) e52204.
- [38] S.E. Navone, G. Marfia, G. Invernici, S. Cristini, S. Nava, S. Balbi, S. Sangiorgi, E. Ciusani, A. Bosutti, G. Alessandri, M. Slevin, E.A. Parati, Isolation and expansion of human and mouse brain microvascular endothelial cells, *Nat Protoc*, 8 (2013) 1680-1693.
- [39] S. Lundquist, M. Renftel, J. Brillault, L. Fenart, R. Cecchelli, M.P. Dehouck, Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo: a comparison between two in vitro cell models, *Pharm Res*, 19 (2002) 976-981.
- [40] R. Montesano, M.S. Pepper, U. Mohle-Steinlein, W. Risau, E.F. Wagner, L. Orci, Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle T oncogene, *Cell*, 62 (1990) 435-445.
- [41] T. Watanabe, S. Dohgu, F. Takata, T. Nishioku, A. Nakashima, K. Futagami, A. Yamauchi, Y. Kataoka, Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4, *Biol Pharm Bull*, 36 (2013) 492-495.
- [42] Y. Omid, L. Campbell, J. Barar, D. Connell, S. Akhtar, M. Gumbleton, 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 (2003) 95-112.
- [43] S.F. Tehrani, F. Bernard-Patrzynski, I. Puscas, G. Leclair, P. Hildgen, V.G. Roullin, Length of surface PEG modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells, *Nanomedicine*, 16 (2018) 185-194.
- [44] P. Demeuse, P. Fagner, C. Leroy-Noury, C. Mercier, L. Payen, O. Fardel, P.O. Couraud, F. Roux, Puromycin selectively increases *mdr1a* expression in immortalized rat brain endothelial cell lines, *J Neurochem*, 88 (2004) 23-31.
- [45] L. Hamadneh, M. Al-Majawleh, Y. Jarrar, S. Shraim, M. Hasan, B. Abu-Irmaileh, Culturing conditions highly affect DNA methylation and gene expression levels in MCF7 breast cancer cell line, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 54 (2018) 331-334.
- [46] D.M. Wuest, K.H. Lee, Optimization of endothelial cell growth in a murine in vitro blood-brain barrier model, *Biotechnol J*, 7 (2012) 409-417.
- [47] G. Shayan, Y.S. Choi, E.V. Shusta, M.L. Shuler, K.H. Lee, Murine in vitro model of the blood-brain barrier for evaluating drug transport, *Eur J Pharm Sci*, 42 (2011) 148-155.

- [48] M.S. Thomsen, S. Birkelund, A. Burkhart, A. Stensballe, T. Moos, Synthesis and deposition of basement membrane proteins by primary brain capillary endothelial cells in a murine model of the blood-brain barrier, *J Neurochem*, 140 (2017) 741-754.
- [49] X. Tian, O. Brookes, G. Battaglia, Pericytes from Mesenchymal Stem Cells as a model for the blood-brain barrier, *Sci Rep*, 7 (2017) 39676.
- [50] S. Yang, S. Mei, H. Jin, B. Zhu, Y. Tian, J. Huo, X. Cui, A. Guo, Z. Zhao, Identification of two immortalized cell lines, ECV304 and bEnd3, for in vitro permeability studies of blood-brain barrier, *PLoS One*, 12 (2017) e0187017.
- [51] K. Benson, S. Cramer, H.J. Galla, Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond, *Fluids Barriers CNS*, 10 (2013) 5.
- [52] C. Weidenfeller, S. Schrot, A. Zozulya, H.J. Galla, Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone, *Brain Res*, 1053 (2005) 162-174.
- [53] N. Kutuzov, H. Flyvbjerg, M. Lauritzen, Contributions of the glycocalyx, endothelium, and extravascular compartment to the blood-brain barrier, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115 (2018) E9429-e9438.
- [54] G. Sahagun, S.A. Moore, M.N. Hart, Permeability of neutral vs. anionic dextrans in cultured brain microvascular endothelium, *Am J Physiol*, 259 (1990) H162-166.
- [55] W. Yuan, G. Li, E.S. Gil, T.L. Lowe, B.M. Fu, Effect of surface charge of immortalized mouse cerebral endothelial cell monolayer on transport of charged solutes, *Ann Biomed Eng*, 38 (2010) 1463-1472.
- [56] J. Aman, E.M. Weijers, G.P. van Nieuw Amerongen, A.B. Malik, V.W. van Hinsbergh, Using cultured endothelial cells to study endothelial barrier dysfunction: Challenges and opportunities, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 311 (2016) L453-466.
- [57] E. Hellinger, S. Veszelka, A.E. Toth, F. Walter, A. Kittel, M.L. Bakk, K. Tihanyi, V. Hada, S. Nakagawa, T.D. Duy, M. Niwa, M.A. Deli, M. Vastag, Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models, *Eur J Pharm Biopharm*, 82 (2012) 340-351.
- [58] S. Vilar, M. Chakrabarti, S. Costanzi, Prediction of passive blood-brain partitioning: straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors, *J Mol Graph Model*, 28 (2010) 899-903.
- [59] A.S. Hanak, L. Chevillard, S. El Balkhi, P. Risede, K. Peoc'h, B. Megarbane, Study of blood and brain lithium pharmacokinetics in the rat according to three different modalities of poisoning, *Toxicol Sci*, 143 (2015) 185-195.
- [60] A.D. Kulkarni, H.M. Patel, S.J. Surana, V.S. Belgamwar, C.V. Pardeshi, Brain-blood ratio: implications in brain drug delivery, *Expert Opin Drug Deliv*, 13 (2016) 85-92.

Supplementary information

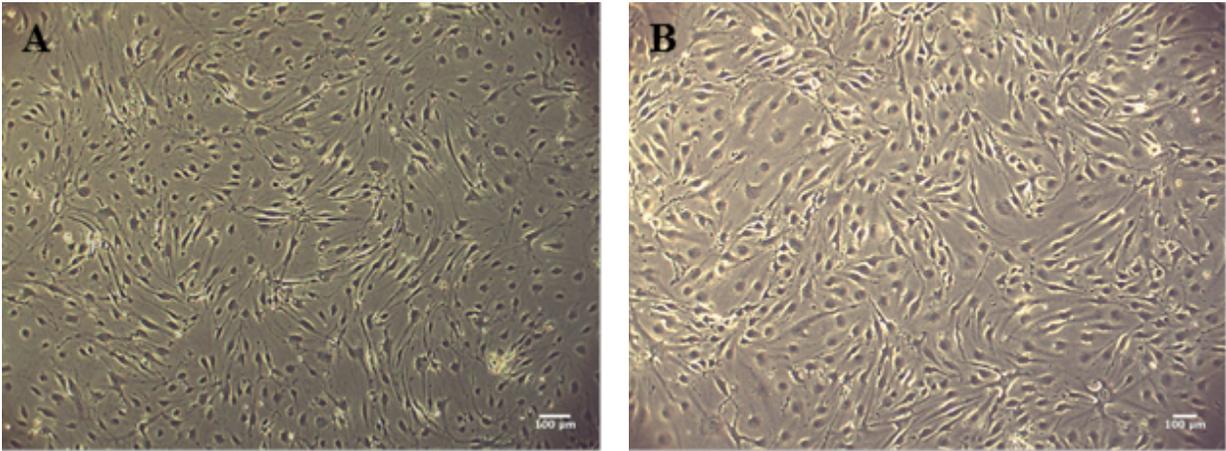


Figure S1: Morphology of (A) murine primary brain endothelial cells (BMEC, passage 1) and (B) murine bEnd.3 endothelial cell line (bEnd.3, passage 15) analyzed by optical inverted microscopy. Images were captured at a magnification of $\times 20$. Scale bar: 100 μm .

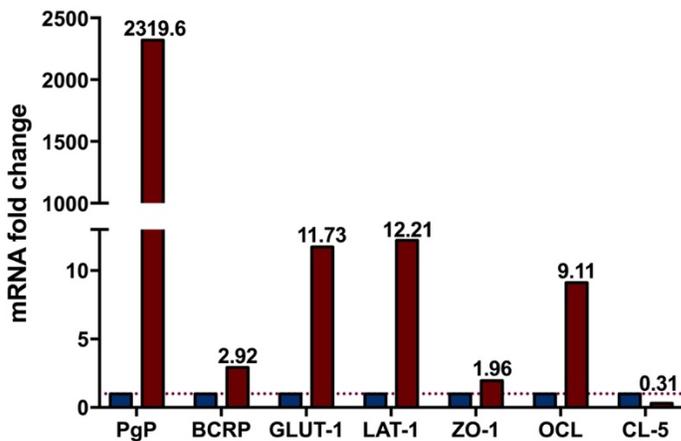


Figure S2. Differences in mRNA expression fold-change between BMEC (red) and bEnd.3 cell line (blue), both grown in specialized BMEC medium. Gene expression was quantified by ddPCR, using HPRT mRNA expression as the internal control gene and the bEnd3 cell line as the calibrator.

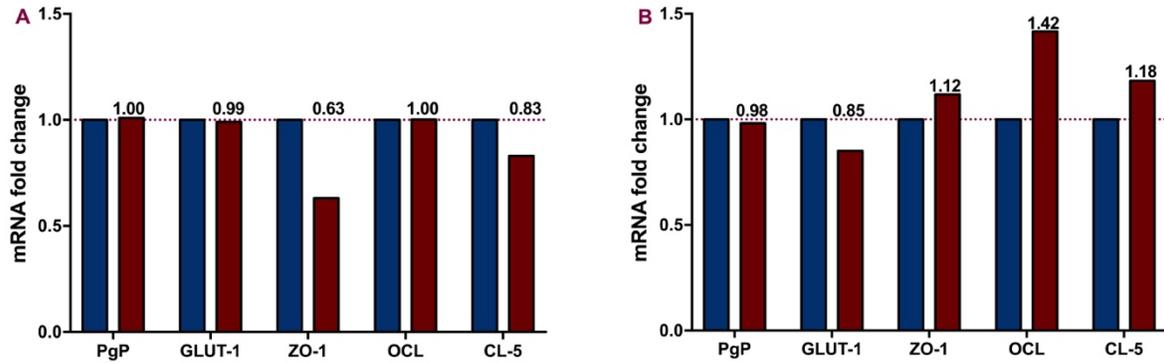


Figure S3. Differences in gene expression fold-change between (A) BMEC and (B) bEnd.3 cells grown on a polyester membrane insert filter (red) compared to cells grown on plastic cell culture flask (blue). Gene expression was quantified by ddPCR, using HPRT mRNA expression as the internal control gene and cells grown on the plastic cell culture flask as the calibrator.

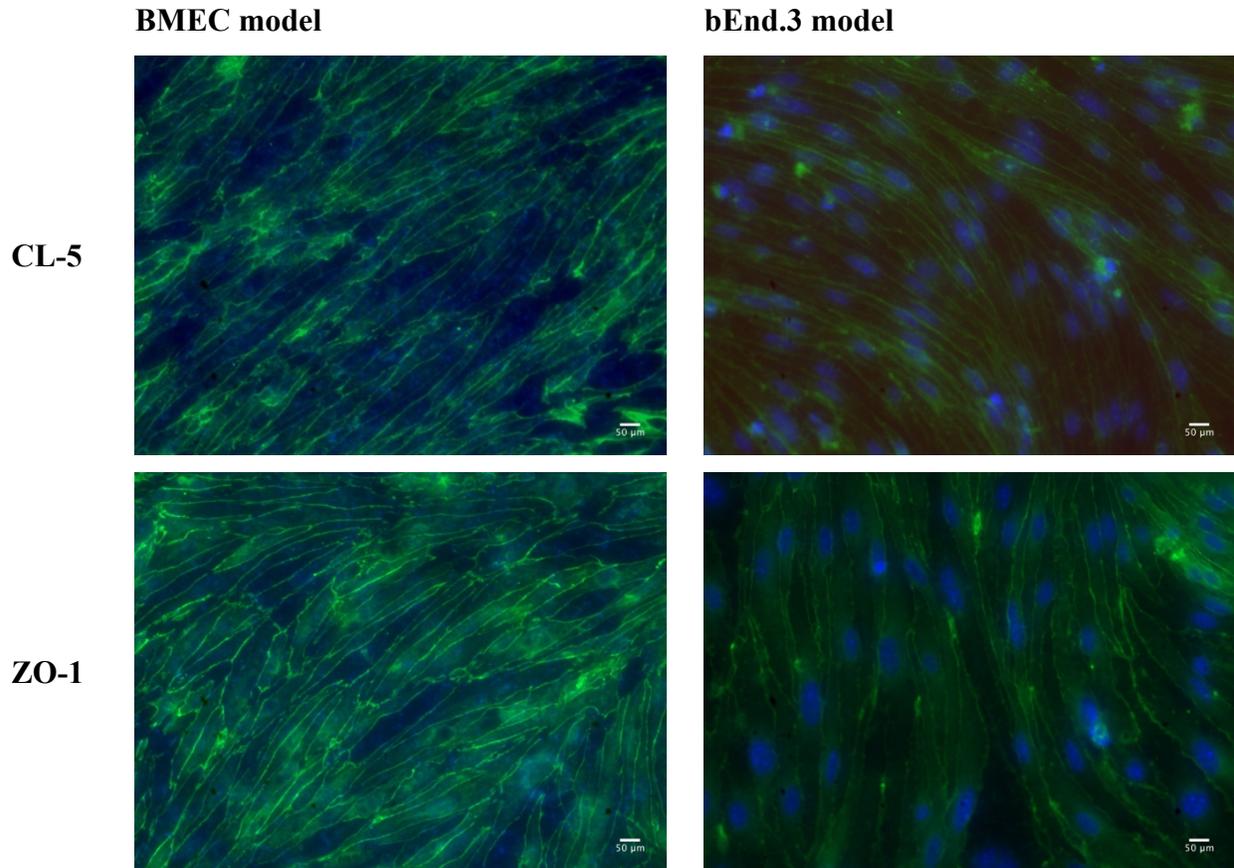


Figure S4: Immunocytochemistry of tight junctions (TJs) on BMECs and bEnd.3 *in vitro* cell monolayer models. The 7-day old cell monolayers were directly fixed on the insert membrane and then incubated with Alexa 488-labelled (green) anti-ZO-1 and anti-CL-5 antibodies. DAPI staining (blue) was used to show nuclei. Magnification in all images: $\times 20$. Scale bar 50 μm .

Discussion générale

La BHE est un frein majeur à la livraison des médicaments au cerveau. Ainsi, l'évaluation de la capacité de passage des molécules au SNC est réalisée précocement au cours du développement du médicament. Ceci permet d'apporter les changements nécessaires aux structures des molécules pour augmenter leur passage au cerveau. Une combinaison d'essais est toujours employée pour l'évaluation de la perméabilité des NTCs au cerveau (Figure 1.9.) (69).

Les modèles *in vitro* sont des outils extrêmement précieux dans les étapes de la découverte de médicaments précédant la phase préclinique. Bien que la communauté scientifique conteste encore leur capacité à reproduire avec précision les propriétés *in vivo* de la BHE, ces modèles sont nécessaires, car ils permettent un criblage rapide des diverses molécules à un coût économique et éthique inférieur aux études animales. De plus, ils sont indispensables dans les études des mécanismes impliqués dans la perturbation de l'étanchéité de la BHE, de son implication dans les maladies du SNC et dans les études de migration des cellules cancéreuses du corps vers le cerveau ou inversement (58).

L'avantage des modèles cellulaires est qu'ils sont un compromis entre les modèles non cellulaires (ex. PAMPA) et les animaux vivants. Les modèles constitués des cellules primaires conservent le phénotype cellulaire *in vivo* une fois isolé, contrairement au processus de transformation des lignées cellulaires qui mène à des changements ou à la perte d'expression des certains transporteurs impliqués dans le transport des médicaments au travers la BHE (95). Idéalement, un modèle cellulaire devrait être composé des cellules humaines, car le but principal est d'évaluer la perméabilité des médicaments chez l'humain. Cependant, le matériel cellulaire humain primaire est difficile à trouver, en particulier à partir de tissus cérébraux sains. Les cellules animales sont disponibles à partir de plusieurs espèces et peuvent être primaires ou des lignées cellulaires. La disponibilité des rats et des souris pour la recherche les rend très accessibles et intéressants pour le développement des modèles cellulaires primaires de la BHE. Ceci est d'autant plus vrai qu'ils sont les animaux les plus utilisés dans les phases précliniques et un modèle *in vitro* issu de la même espèce aiderait à prédire la perméabilité chez l'animal vivant.

Actuellement, les modèles non cérébraux Caco-2 et MDCK-MDR1 sont les modèles les plus employés pour les tests de perméabilité en raison de leur haute expression du transporteur

d'efflux Pgp. Toutefois, le transport des molécules au cerveau n'est pas seulement régi par la Pgp (96). C'est pourquoi, un modèle d'évaluation de la perméabilité à travers la BHE devrait posséder des caractéristiques propres aux CEs cérébrales. Ceci est d'autant plus important pour le criblage des molécules, car le transport à travers le BHE se fait majoritairement par les transporteurs et les mécanismes de transport présents à la surface des CEs.

Le projet « Développement d'un modèle *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique » a été conçu pour combler le besoin de l'industrie pharmaceutique et de la communauté de recherche pour un modèle *in vitro* primaire de souris de la BHE destiné au criblage des molécules de petites ou de grandes tailles ainsi que de nanoformulations.

Initialement, le modèle proposé était un modèle tricellulaire, le modèle PrimB3, composé des trois types cellulaires majeurs: CEs, ACs et PCs. Le temps d'isolation des trois types cellulaires, ainsi que le temps de construction du modèle était trop important pour se conformer avec l'hypothèse d'un modèle rapide à obtenir. De plus, le peu d'expériences réalisées avec les cocultures n'a pas montré une différence significative avec le modèle monocouche, tout en augmentant grandement la complexité des manipulations et en diminuant la robustesse du modèle résultant. Toutefois, il est très précoce d'adresser une conclusion sur les modèles bi- et tri-cellulaires. De ce fait, il a été convenu de passer par un modèle monocouche préliminaire avant d'entamer la construction d'un modèle tricellulaire plus complexe.

Le modèle monocouche de CEs a été conçu pour être un modèle étanche, facile d'assemblage avec la possibilité de l'inclure dans le processus de criblage à haut débit. Sa performance a été comparée avec la lignée cellulaire de souris bEnd.3, la lignée de souris la plus utilisée dans la construction des modèles *in vitro* de la BHE (78).

Pour la construction du modèle primaire, des CEs fraîchement isolées ont été utilisées. Selon le protocole mis au point dans notre laboratoire, l'isolation aboutit à des cultures hautement enrichies dans 5 à 7 jours. L'enrichissement a été réalisé avec l'utilisation de la puromycine directement dans le milieu de culture des capillaires cérébraux(97). Cette méthode a l'avantage de ne pas prolonger la durée d'obtention des cultures pures, car l'enrichissement se fait durant la croissance cellulaire et non sur le tapis cellulaire formé comme c'est le cas pour l'isolation des ACs et des PCs. L'utilisation des réactifs et des milieux spécifiques pour l'isolation et la culture des cellules primaires augmente les coûts associés à l'obtention des modèles de BHE. Toutefois, il est à noter que la culture des Caco-2 est 3 fois plus longue (83), donc le volume du

milieu utilisé est considérablement plus important que celui des cellules primaires. L'importance de l'utilisation de CEs primaires dans la construction des modèles de BHE a été mise en évidence par leur comparaison avec la lignée bEnd.3. L'expression des ARNm des Pgp, BCRP, GLUT-1, LAT-1 et OCL a été trouvée nettement supérieure dans les cellules primaires. Pour vérifier la fonctionnalité du transporteur d'efflux Pgp, une incubation avec le substrat de Pgp, la puromycine, a été réalisée comparativement sur les cellules primaires et bEnd.3. Les résultats ont montré une viabilité plus haute suite à cette exposition des cellules primaires, comparativement aux bEnd.3. Cette observation viendrait confirmer la perte probable d'expression de certaines protéines membranaires lors du processus de transformation des lignées (95). Or, il est impératif de confirmer la présence de ces protéines afin de garantir le phénotype de CEs cérébrales et de s'assurer de la présence des protéines impliquées dans le transport des molécules au cerveau.

Comme suit, ces cellules ont été cultivées dans des plaques Transwell® afin de construire les modèles monocouches primaires et bEnd.3. Les modèles monocouches sont souvent jugés trop simples quand on les compare avec la structure complexe de la BHE *in vivo*. Toutefois, la reproduction fidèle de cette complexité est surtout importante pour les modèles qui sont conçus pour les études des pathologies du SNC plutôt que pour les études de perméabilité à travers la BHE (24). Le modèle monocouche établi dans ce projet montre une TEER d'environ $80 \Omega \times \text{cm}^2$, ce qui peut paraître faible comparativement à la valeur minimale de $150 \Omega \times \text{cm}^2$ décrite comme adéquate dans l'évaluation de la perméabilité (98). Toutefois, cette valeur paraît en quelque sorte arbitraire, car une simple revue de littérature révèle que les modèles de la BHE humains montrent les valeurs de TEER les plus basses (30 à $60 \Omega \times \text{cm}^2$) (58), comparées aux modèles de souris (20 à $140 \Omega \times \text{cm}^2$) (51, 53), de rat (90 à $350 \Omega \times \text{cm}^2$) (56), porc et bovin (350 à $1000 \Omega \times \text{cm}^2$) (55, 59). Ainsi, ces valeurs montrent que les valeurs de TEER sont propres à l'espèce à l'origine des cellules et qu'une unique valeur de TEER n'indique pas nécessairement que le modèle n'est pas adéquat pour l'utilisation visée. D'autres facteurs peuvent également influencer la valeur de TEER. La mesure de la résistance des modèles monocouches statiques est généralement effectuée à l'aide de voltmètres équipés d'électrodes de type « STX2/baguettes » ou d'électrodes concentriques de type chambre Endohm®, et rarement avec des systèmes automatiques continus. Les électrodes en forme de baguettes donnent des valeurs de résistance plus élevées et variables par rapport aux chambres à électrodes, qui donnent des

valeurs plus petites, mais plus stables ; ces valeurs sont de même connues pour être sans communes mesures différentes de celles obtenues avec un système à monitoring continu, type xCELLigence ou ECIS (99). De plus, la valeur de TEER étant exprimée en $\Omega \times \text{cm}^2$ (résistance multipliée par la surface de la monocouche endothéliale), une résistance de 100 Ω donnerait une valeur TEER de 33 ou 112 $\Omega \times \text{cm}^2$ respectivement, si une surface de culture de 0,33 cm^2 (plaque à 24 puits) ou de 1,12 cm^2 (plaque à 12 puits) était utilisée dans la conception du modèle (45). Il a aussi été rapporté que des facteurs tels que la densité cellulaire (91), le temps à la confluence, la composition du milieu de culture (53), la nature du matériel de l'insert ainsi que leur source commerciale (100) ont un impact sur la valeur de TEER. Ainsi, compte tenu de l'hétérogénéité des méthodes et des conditions d'évaluation de la résistance des modèles, il paraît impossible et inadéquat d'estimer la pertinence d'un modèle basé seulement sur ces valeurs de TEER. En conséquence, ces résultats devraient être appuyés par des études de perméabilité et par la quantification de la présence des TMBRs et TJs. Ceci est plus important pour les modèles conçus pour l'évaluation de la perméabilité des molécules au cerveau.

Les essais de perméabilité ont été réalisés avec les marqueurs fluorescents NaFl et FITC-D, deux marqueurs hydrophiles indicateurs de l'étanchéité de la monocouche de CEs. La NaFl, avec une masse molaire de 376 g/mol, est l'un des marqueurs de la perméabilité paracellulaire les plus petits. De par sa faible masse molaire, elle est capable de détecter des altération plus subtiles de la perméabilité à travers la BHE, comparée aux molécules de plus grandes masses molaires (101). D'autre part, le FITC-D est une molécule de masse molaire de 150 KDa qui permet une évaluation préliminaire de l'intégrité de la monocouche, sans pour autant détecter les petites différences entre deux modèles avec des Pe très proches. Une première évaluation de la perméabilité avec le FITC-D a permis sa quantification dans le modèle primaire, mais pas dans le bEnd.3. Kutuzov *et al.* ont démontré que la perméabilité des molécules hydrophiles dépendait de leur masse molaire (102) et que le glycocalyx chargé négativement des CEs était impliqué dans le processus de perméabilité de la BHE lorsque la masse molaire des molécules testées était supérieure à 600 kDa (103). Il est probable que la présence du glycocalyx à la surface des cellules bEnd.3 (104), mais cependant moindre sur celle des cellules BMEC (105), ait pu réduire le passage du FITC-D de 150 kDa dans le modèle bEnd.3, empêchant ainsi sa quantification. L'évaluation du Pe avec la NaFl n'a pas mis en évidence de différences entre les deux modèles après 75 min, résultat qui a été déjà rapporté après un test de perméabilité de 120

min (106). La différence de perméabilité observée pour le modèle primaire selon le type de marqueurs utilisés confirmerait qu'une grosse molécule comme le FITC-D résulterait en un P_e plus petit comparé à celui de la NaFl, et que les résultats des tests de perméabilité dépendent grandement de la masse molaire du marqueur choisi. De plus, ces marqueurs fluorescents sont des indicateurs du transport paracellulaire, régi en grande partie par les protéines des TJs : CL-5, OCL et ZO-1. La quantification par qPCR de l'expression des ARNm codant pour ces trois protéines a montré qu'une fois les cellules cultivées sur l'insert de la plaque Transwell®, l'expression de ces ARNm était augmentée. Une plus grande expression des protéines des TJs mènerait à un passage paracellulaire plus restrictif, donc un P_e plus petit. Toutefois, au cours de cette expérience de perméabilité, les quantités d'ARNm de TJs des cellules primaires et celles des bEnd.3 n'ont pas été directement comparées pour pouvoir mettre en évidence une différence. De plus, la quantification a été réalisée par qPCR et non par Western blot, il est donc impossible de savoir si les ARNm ont été traduits en protéines. Une autre possibilité de détecter les petites différences de perméabilité des deux modèles serait l'emploi de plusieurs marqueurs de différentes tailles comme de FITC-D de 4 à 70 kDa (107) ou des molécules radiomarquées dont la quantification est hautement sensible (108).

Ultimement, les modèles devraient être évalués pour leur capacité de prédiction de la perméabilité chez l'animal vivant. L'avantage d'un modèle *in vitro* de souris est que les données de P_e obtenues *in vitro* peuvent facilement être comparées avec les données de perméabilité ($\log BB$) *in vivo* chez le même animal. Cette comparaison permet aussi de confirmer que les cellules isolées ont gardé la même capacité de transport des molécules que celles retrouvées dans la BHE *in vivo*. Dans ce projet, sept molécules ont été utilisées pour déterminer l'IVIVC et valider les deux modèles. Les molécules ont été classées en trois groupes d'après le travail de Vilar *et al.* (109) selon lequel les molécules sont SNC^{++} ou SNC^+ si $\log BB \geq 0.3$ ou $-1 < \log BB < 0.3$ respectivement et sont SNC^- si $-1 \leq \log BB$. Ainsi, la chlorpromazine rentrait dans le groupe SNC^{++} , le midazolam, la caféine, la théophylline et le vérapamil dans le groupe SNC^+ et l'aténolol et le ténoxicam dans SNC^- . Toutes les molécules avaient des masses molaires entre 180 et 460 g/mol et des $\log P$ rangeant de -0,02-5,4, ainsi assurant un minimum de passage passif au cerveau pour pouvoir être quantifier.

Le IVIVC du modèle primaire a montré un $r^2 = 0.765$ et celui du bEnd.3 un $r^2 = 0.019$. Ce résultat, surprenant, démontre une grande différence entre les deux modèles cellulaires, qui sont

cependant tous les deux fondés sur des CEs cérébrales. Ce résultat indique que le modèle bEnd.3 n'est pas un bon modèle pour discriminer les molécules selon les caractéristiques SNC^+ ou SNC^- et il ne constitue donc pas un bon modèle prédictif pour la perméabilité sang-cerveau. Malgré ça, il est possible que ce modèle soit adéquat pour l'évaluation de la perméabilité d'un groupe particulier de molécules. Par exemple si l'analyse IVIVC se faisait sans les 2 molécules les plus lipophiles (chlorpromazine et midazolam) la corrélation serait $r^2=0.64$ et si de plus le tenoxicam serait exclu le $r^2=0.93$. Ceci indique que le modèle bEnd3 serait optimal pour discriminer les molécules avec des logP autour de la valeur de 1, donc à la fois soluble dans les lipides et l'eau. Toutefois cette analyse serait bonifiée par l'ajout de plus de molécules ce qui consoliderait l'hypothèse émise. Dans le travail de Booth et Kim sur un modèle microfluidique bEnd3 (110), l'IVIVC pour 7 molécules avec des logP entre -1.27 et 5.15 a donné un $r^2=0.85$. Ce résultat n'est pas en conformité avec le nôtre, toutefois il faut savoir que les valeurs pour le calcul de logBB ont été recueillies dans la littérature et non réalisées par les auteurs, ce qui permettrait une sélection des données avec le but de l'obtention d'une meilleure corrélation.

Le transport des molécules au cerveau est régi grandement par les TMBRs retrouvés principalement sur la surface des CEs. Effectivement, le transport paracellulaire étant restreint les molécules se rendent au cerveau par la diffusion passive ou transport régi par les TMBRs. *In vitro*, la diffusion passive des molécules lipophiles peut être évaluée avec des modèles acellulaires comme le modèle PAMPA. La corrélation des P_{eff} du modèle PAMPA-BBB développé par Florian Bernard avec les données logBB obtenues chez la souris ont abouti à une $r^2=0.39$. Ce modèle se restreint à la sélection des molécules selon le coefficient de partition logP et prédit le passage des molécules au cerveau par diffusion passive. La performance relativement meilleure du modèle PAMPA, par rapport au bEnd.3, pourrait être due au fait que, parmi les sept molécules choisies, cinq possèdent un logP plus grand que 1, donc sont lipophiles. Le PAMPA, basé sur une monocouche de lipides cérébraux porcins, permettrait le passage de ces molécules. Toutefois, la majorité des molécules lipophiles sont sujettes à être des substrats Pgp, donc PAMPA pourrait faussement indiquer un passage important pour des molécules qui sont remises dans la circulation sanguine par les transporteurs d'efflux (111). Ainsi, les deux molécules les plus lipophiles, chlorpromazine et midazolam (112) ainsi que le vérapamil (113) sont reconnus comme substrats Pgp. Étant donné que la Pgp est le principal transporteur d'efflux

il est important que dans le calcul de l'IVIVC ce paramètre soit pris en compte. Le grand avantage des modèles cellulaires est la présence de ces transporteurs à la surface cellulaire.

De plus, la grande majorité des molécules qui se rendent au cerveau utilisent le transport par les canaux ioniques (le glucose, les acides aminés, la L-dopa etc) ou le transport par un récepteurs (protéines, hormones, etc.)(40). Pour adresser ces deux caractéristiques de transport de la BHE, la quantification des transporteurs d'efflux (Pgp et BCRP) et des canaux ionique (GLUT-1 et LAT-1) ont été réalisées dans ce projet. Ainsi pour les deux modèles cellulaires, la présence des mRNA codant pour GLUT-1, Lat-1, Pgp, BCRP a été validé, bien que supérieure dans le modèle primaire. D'ailleurs la présence de ces transporteurs dans le modèle bEnd3, bien qu'inapproprié pour les évaluations de perméabilité des molécules au BHE, le rend optimal pour les études portant sur les mécanismes de transport de la BHE (114).

Pour sa part, le modèle primaire, a su discriminer correctement parmi les sept molécules analysées avec un $r^2 = 0.765$. Ceci indique que le modèle est capable de classer des molécules avec des propriétés diverses et qu'il est nettement supérieur au modèle de la lignée bEnd.3. De plus, les taux supérieurs de mRNA codant tant que pour le TMBRs que pour les TJs, ainsi que la comparaison des perméabilités P_e avec le $\log BB$, montre que les cellules isolées gardent, à un certain degré, la même capacité de transport des molécules à travers la BHE, *i.e* un passage paracellulaire restrictif et la présence des principaux transporteurs d'efflux et d'influx. Toutefois, cet avantage des cellules primaires est conservé majoritairement pour les cellules de passage 1 et définitivement en-dessus du passage 10, moment où les cellules primaires ne se divisent plus et perdent leur expression des TJs et de TMBRs (24). En conclusion, le modèle primaire englobe les qualités des tests de perméabilité du modèle PAMPA et des modèles de lignée cellulaire, et ainsi devrait être priorisé dans les études de perméabilité des grandes libraires des NTCs dans les phases précoces du développement du médicament.

Pour adresser les limites de ce projet et bonifier ce travail de recherche, plusieurs points ont été soulignés. Ainsi, l'ajout de plus de molécules pour la validation du modèle augmenterait sa puissance de prédiction de la perméabilité de BHE. Par exemple, un modèle de rat a été développé et validé avec 19 molécules avec un $r^2=0.89$. (56) De plus, afin de confirmer la traduction des ARNm en protéines, il serait important de compléter les résultats de qPCR avec la quantification des protéines des TJs et des TMBRs par la technique de Western blot. De même, il pourrait être intéressant de changer de méthode d'évaluation de la perméabilité *in vivo*

de $\log BB$ par la détermination du standard K_{in} . Les données obtenues suite à la détermination de K_{in} sont des valeurs absolues qui peuvent être comparées entre les préparations et tissus de différents groupes de recherches. De plus, son calcul tient compte de la liaison des protéines plasmatiques ce qui donnerait une image plus juste de la perméabilité au cerveau *in vivo* et donc une IVIVC des modèles cellulaires testés plus réelle.

Conclusions et perspectives

Dans ce projet de recherche, nous avons évalué la faisabilité d'un modèle primaire de BHE à partir de cellules cérébrales de souris. Comme objectif primaire, il était essentiel d'assembler les modèles monocouches et d'évaluer leurs caractéristiques. De ce fait, le protocole d'isolation ainsi que celui de la construction du modèle ont été implémentés avec succès. Un modèle fonctionnel, prêt en 7 jours, a été caractérisé par le calcul de TEER et du Pe des marqueurs de la perméabilité paracellulaire. De plus, les ARNm des principales protéines de TJs et TMBRs, dont la Pgp, le principal transporteur transmembranaire responsable de la résistance à la livraison de nombreuses molécules au tissu cérébral, ont été quantifiés. Le deuxième objectif de ce projet a été atteint avec la corrélation des données *in vitro* des modèles monocouches avec celles obtenues chez la souris vivante pour sept substances actives SNC⁺ et SNC⁻. Comparé au modèle monocouche de la lignée cellulaire bEnd3, le modèle primaire a affiché des taux d'ARNm de TJs et de TMBRs plus élevés, notamment pour la P-gp. Ces caractéristiques favorables, de même que les valeurs retrouvées pour la TEER et la Pe, se sont traduites dans un modèle plus discriminant que le modèle bEnd.3. Ceci a été davantage confirmé avec une meilleure corrélation IVIVC pour le modèle primaire. Ces résultats valident notre hypothèse de recherche et confirment que le modèle primaire construit avec des cellules cérébrales primaires résulte en un modèle adéquat pour l'évaluation du passage des molécules au BHE.

Un modèle *in vitro* idéal de la BHE conçu pour la détermination de la perméabilité des médicaments devrait permettre une évaluation peu coûteuse, rapide et reproductible. Parmi tous les modèles cellulaires statiques de type Transwell® proposés, le modèle basé sur des inserts 0,33 cm² nécessite moins de matériel cellulaire, donc moins de sacrifices d'animaux, que les études de perméabilité *in vivo*. La souris, quant à elle, reste le modèle animal le plus polyvalent et le mieux étudié dans les études de recherche. Compte tenu de la grande variété de souches knock-out et des modèles pathologiques de souris ainsi que de son génome bien étudié, la conception d'un modèle BHE validé à partir de cellules cérébrales primaires de souris semble un atout précieux pour criblage de médicaments dans les phases précoces de R&D. Le modèle primaire évalué dans cette étude, bien qu'il ne soit pas idéal à tous égards, peut néanmoins fournir des informations précieuses sur la perméabilité de la BHE et constitue donc un outil de grande valeur pour la découverte de médicaments du SNC.

Avec ce projet, l'importance de l'utilisation des cellules primaires dans la construction des modèles *in vitro* pour l'évaluation de la perméabilité des médicaments a été confirmée. Ce type de modèles doit être davantage implanté dans l'industrie pharmaceutique, d'autant plus qu'il existe déjà des protocoles bien développés qui permettent d'obtenir des cultures enrichies de cellules primaires. Également, ce travail a permis de souligner l'importance cruciale d'inclure, au cours de la caractérisation des modèles, une étape de quantification des protéines de TJs et des principaux TMBRs. Cela devrait systématiquement compléter les essais plus classiques de TEER et de perméabilité Pe.

Par ce projet, le fondement d'un modèle multicellulaire a été établi. L'ajout et l'impact des cellules de soutien, les PCs et les ACs, dans un modèle de criblage des médicaments devraient être étudiés. Il existe déjà des protocoles d'isolation performants des différents types cellulaires de la BHE, c'est-à-dire CEs, PCs et ACs, de la souris (70, 73, 115). Un modèle synergique pourrait donc résulter de l'emploi simultané des trois types cellulaires dans le même assemblage. Toutefois, le coût de la mise en place et de l'obtention d'un tel modèle, en matière de temps et d'argent, devrait être évalué en fonction du bénéfice apporté comparativement à un modèle monocouche.

Ultimement, tant les modèles monocouches que tricellulaires devraient être validés avec des nanoformulations, qui constituent à ce jour les systèmes de livraison préférentiels des substances actives dotées d'une perméabilité réduite au cerveau (116). Les anticorps et autres médicaments biologiques ou biosimilaires pourraient également être une autre catégorie intéressante à exploiter pour la validation des modèles *in vitro* de la BHE (87).

Les résultats de cette étude indiquent que le modèle *in vitro* primaire de souris serait un bon candidat pour la prédiction de la perméabilité *in vivo* chez la souris vivante. Ceci permettrait effectivement de diminuer le nombre des animaux sacrifiés et de se conformer avec le principe des trois R dans l'expérimentation animale : remplacement, réduction, raffinement.

Bibliographie

1. Liddelow SA. Fluids and barriers of the CNS: a historical viewpoint. *Fluids Barriers CNS*. 2011;8(1):2.
2. Ehrlich P. *Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine Farbenanalytische Studie.* . Berlin: Hirschwald. 1885.
3. Saunders NR, Dreifuss JJ, Dziegielewska KM, Johansson PA, Habgood MD, Mollgard K, et al. The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history. *Front Neurosci*. 2014;8:404.
4. Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anat Rec B New Anat*. 2006;289(1):3-8.
5. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol*. 1967;34(1):207-17.
6. Palmer AM. The blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. 2010;37(1):1-2.
7. Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng*. 2013;6:7.
8. Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;38:2-6.
9. Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA. In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(1):113-28.
10. Shulman RG, Hyder F, Rothman DL. Cerebral metabolism and consciousness. *C R Biol*. 2003;326(3):253-73.
11. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(1):41-53.
12. Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788(4):842-57.
13. Daneman R. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*. 2012;72(5):648-72.
14. Blanchette M, Daneman R. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev*. 2015;138 Pt 1:8-16.
15. Tajes M, Ramos-Fernandez E, Weng-Jiang X, Bosch-Morato M, Guivernau B, Eraso-Pichot A, et al. The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it. *Mol Membr Biol*. 2014;31(5):152-67.
16. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol*. 2002;38(6):323-37.
17. Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. *Febs j*. 2015;282(21):4067-79.
18. Zenaro E, Piacentino G, Constantin G. The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2017;107:41-56.
19. Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS*. 2012;9(1):23.
20. Derada Troletti C, de Goede P, Kamermans A, de Vries HE. Molecular alterations of the blood-brain barrier under inflammatory conditions: The role of endothelial to mesenchymal transition. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(3):452-60.

21. Kim JA, Tran ND, Li Z, Yang F, Zhou W, Fisher MJ. Brain endothelial hemostasis regulation by pericytes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26(2):209-17.
22. Dohgu S, Takata F, Yamauchi A, Nakagawa S, Egawa T, Naito M, et al. Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res.* 2005;1038(2):208-15.
23. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004;16(1):1-13.
24. Wolff A, Antfolk M, Brodin B, Tenje M. In Vitro Blood-Brain Barrier Models-An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches. *J Pharm Sci.* 2015;104(9):2727-46.
25. Alavijeh M, Palmer A. The Rewards and Challenges of CNS Drug Discovery 2006. 29-31 p.
26. DiNunzio JC, Williams RO, 3rd. CNS disorders--current treatment options and the prospects for advanced therapies. *Drug Dev Ind Pharm.* 2008;34(11):1141-67.
27. Alavijeh MS, Chishty M, Qaiser MZ, Palmer AM. Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx.* 2005;2(4):554-71.
28. Banks WA. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(4):275-92.
29. Deane RJ. Is RAGE still a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Future Med Chem.* 2012;4(7):915-25.
30. Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Wiendl H. Therapeutic uses of anti-alpha4-integrin (anti-VLA-4) antibodies in multiple sclerosis. *Int Immunol.* 2015;27(1):47-53.
31. Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(7):640-65.
32. Wilhelm I, Krizbai IA. In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Mol Pharm.* 2014;11(7):1949-63.
33. Aparicio-Blanco J, Martin-Sabroso C, Torres-Suarez AI. In vitro screening of nanomedicines through the blood brain barrier: A critical review. *Biomaterials.* 2016;103:229-55.
34. Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov Today.* 2007;12(1-2):54-61.
35. Oller-Salvia B, Sanchez-Navarro M, Giralt E, Teixido M. Blood-brain barrier shuttle peptides: an emerging paradigm for brain delivery. *Chem Soc Rev.* 2016;45(17):4690-707.
36. Scherrmann JM. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol.* 2002;38(6):349-54.
37. Herda Luciana M, Polo E, Kelly Philip M, Rocks L, Hudecz D, Dawson Kenneth A. Designing the future of nanomedicine: current barriers to targeted brain therapeutics. *Eur J Nanomed* 2014. p. 127.
38. Lee G, Bendayan R. Functional Expression and Localization of P-glycoprotein in the Central Nervous System: Relevance to the Pathogenesis and Treatment of Neurological Disorders. *Pharm Res.* 2004;21(8):1313-30.
39. Kerns EH, Di L. Chapter 10 - Blood-Brain Barrier. In: Kerns EH, Di L, editors. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods.* San Diego: Academic Press; 2008. p. 122-36.

40. Wong KH, Riaz MK, Xie Y, Zhang X, Liu Q, Chen H, et al. Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2).
41. Goh J-Y, Weaver RJ, Dixon L, Platt NJ, Roberts RA. Development and use of in vitro alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980–2013. *Toxicol Res.* 2015;4(5):1297-307.
42. Naik P, Cucullo L. In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J Pharm Sci.* 2012;101(4):1337-54.
43. Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcao A. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. *Eur J Pharm Biopharm.* 2014;87(3):409-32.
44. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* 2015;20(2):107-26.
45. 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.
46. Cho H, Seo JH, Wong KH, Terasaki Y, Park J, Bong K, et al. Three-Dimensional Blood-Brain Barrier Model for in vitro Studies of Neurovascular Pathology. *Sci Rep.* 2015;5:15222.
47. Shi L, Zeng M, Sun Y, Fu BM. Quantification of blood-brain barrier solute permeability and brain transport by multiphoton microscopy. *J Biomech Eng.* 2014;136(3):031005.
48. Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoke R, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2007;27(6):687-94.
49. He Y, Yao Y, Tsirka SE, Cao Y. Cell-culture models of the blood-brain barrier. *Stroke.* 2014;45(8):2514-26.
50. Zhang Y, Li CS, Ye Y, Johnson K, Poe J, Johnson S, et al. Porcine brain microvessel endothelial cells as an in vitro model to predict in vivo blood-brain barrier permeability. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(11):1935-43.
51. Shayan G, Choi YS, Shusta EV, Shuler ML, Lee KH. Murine in vitro model of the blood–brain barrier for evaluating drug transport. *Eur J Pharm Sci.* 2011;42(1–2):148-55.
52. Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *J Cell Biol.* 1991;115(6):1725-35.
53. Weidenfeller C, Schrot S, Zozulya A, Galla HJ. Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Res.* 2005;1053(1-2):162-74.
54. Siddharthan V, Kim YV, Liu S, Kim KS. Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res.* 2007;1147:39-50.
55. Gaillard PJ, Voorwinden LH, Nielsen JL, Ivanov A, Atsumi R, Engman H, et al. Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Eur J Pharm Sci.* 2001;12(3):215-22.
56. Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 2009;54(3-4):253-63.

57. Kaisar MA, Sajja RK, Prasad S, Abhyankar VV, Liles T, Cucullo L. New experimental models of the blood-brain barrier for CNS drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 2017;12(1):89-103.
58. Hatherell K, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Pilkington GJ. Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J Neurosci Methods.* 2011;199(2):223-9.
59. Thomsen LB, Burkhart A, Moos T. A Triple Culture Model of the Blood-Brain Barrier Using Porcine Brain Endothelial cells, Astrocytes and Pericytes. *PLoS One.* 2015;10(8):e0134765.
60. Palmiotti CA, Prasad S, Naik P, Abul KM, Sajja RK, Achyuta AH, et al. In vitro cerebrovascular modeling in the 21st century: current and prospective technologies. *Pharm Res.* 2014;31(12):3229-50.
61. Cucullo L, Hossain M, Puvenna V, Marchi N, Janigro D. The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci.* 2011;12:40.
62. Cucullo L, Couraud PO, Weksler B, Romero IA, Hossain M, Rapp E, 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.* 2008;28(2):312-28.
63. 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.* 2011;31(2):767-77.
64. van der Helm MW, van der Meer AD, Eijkel JC, van den Berg A, Segerink LI. Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research. *Tissue barriers.* 2016;4(1):e1142493.
65. Booth R, Kim H. Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier (muBBB). *Lab Chip.* 2012;12(10):1784-92.
66. Wang JD, Khafagy el S, Khanafer K, Takayama S, ElSayed ME. Organization of Endothelial Cells, Pericytes, and Astrocytes into a 3D Microfluidic in Vitro Model of the Blood-Brain Barrier. *Mol Pharm.* 2016;13(3):895-906.
67. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J Med Chem.* 1998;41(7):1007-10.
68. Bicker J, Alves G, Fortuna A, Soares-da-Silva P, Falcao A. A new PAMPA model using an in-house brain lipid extract for screening the blood-brain barrier permeability of drug candidates. *Int J Pharm.* 2016;501(1-2):102-11.
69. 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.
70. Ruck T, Bittner S, Epping L, Herrmann AM, Meuth SG. Isolation of primary murine brain microvascular endothelial cells. *J Vis Exp.* 2014(93):e52204.
71. Navone SE, Marfia G, Invernici G, Cristini S, Nava S, Balbi S, et al. Isolation and expansion of human and mouse brain microvascular endothelial cells. *Nat Protoc.* 2013;8(9):1680-93.
72. Culot M, Lundquist S, Vanuxeem D, Nion S, Landry C, Delplace Y, et al. An in vitro blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro.* 2008;22(3):799-811.

73. Coisne C, Dehouck L, Faveeuw C, Delplace Y, Miller F, Landry C, et al. Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest.* 2005;85(6):734-46.
74. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science.* 2011;334(6063):1727-31.
75. Helms HC, Brodin B. Generation of primary cultures of bovine brain endothelial cells and setup of cocultures with rat astrocytes. *Methods Mol Biol.* 2014;1135:365-82.
76. Pan C, Kumar C, Bohl S, Klingmueller U, Mann M. Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(3):443-50.
77. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM, Downward J, Freshney RI, Knezevic I, et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. *Br J Cancer.* 2014;111(6):1021-46.
78. Rahman NA, Rasil A, Meyding-Lamade U, Craemer EM, Diah S, Tuah AA, et al. Immortalized endothelial cell lines for in vitro blood-brain barrier models: A systematic review. *Brain Res.* 2016;1642:532-45.
79. Eigenmann DE, Xue G, Kim KS, Moses AV, Hamburger M, Oufir M. Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers CNS.* 2013;10(1):33.
80. Xu H, Li Z, Yu Y, Sizardkhani S, Ho WS, Yin F, et al. A dynamic in vivo-like organotypic blood-brain barrier model to probe metastatic brain tumors. *Sci Rep.* 2016;6:36670.
81. Volpe DA. Drug-permeability and transporter assays in Caco-2 and MDCK cell lines. *Future Med Chem.* 2011;3(16):2063-77.
82. Hellinger E, Veszeka S, Toth AE, Walter F, Kittel A, Bakk ML, et al. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm.* 2012;82(2):340-51.
83. Lundquist S, Renftel M, Brillault J, Fenart L, Cecchelli R, Dehouck MP. Prediction of drug transport through the blood-brain barrier in vivo: a comparison between two in vitro cell models. *Pharm Res.* 2002;19(7):976-81.
84. Lippmann ES, Al-Ahmad A, Palecek SP, Shusta EV. Modeling the blood-brain barrier using stem cell sources. *Fluids Barriers CNS.* 2013;10(1):2.
85. Leventhal A, Chen G, Negro A, Boehm M. The benefits and risks of stem cell technology. *Oral Dis.* 2012;18(3):217-22.
86. Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, Nessler RA, Wilson HK, Al-Ahmad A, et al. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2012;30(8):783-91.
87. Stanimirovic DB, Bani-Yaghoub M, Perkins M, Haqqani AS. Blood-brain barrier models: in vitro to in vivo translation in preclinical development of CNS-targeting biotherapeutics. *Expert Opin Drug Discov.* 2015;10(2):141-55.
88. Somnath S, Bhaswat C. In vitro - in vivo correlation (IVIVC): a strategic tool in drug development. *J Bioequiv Availab.* 2011 (S3).
89. Lacombe O, Videau O, Chevillon D, Guyot AC, Contreras C, Blondel S, et al. In vitro primary human and animal cell-based blood-brain barrier models as a screening tool in drug discovery. *Mol Pharm.* 2011;8(3):651-63.

90. Balimane PV, Pace E, Chong S, Zhu M, Jemal M, Pelt CK. A novel high-throughput automated chip-based nanoelectrospray tandem mass spectrometric method for PAMPA sample analysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2005;39(1-2):8-16.
91. Wuest DM, Lee KH. Optimization of endothelial cell growth in a murine in vitro blood-brain barrier model. *Biotechnol J.* 2012;7(3):409-17.
92. Boveri M, Berezowski V, Price A, Slupek S, Lenfant AM, Benaud C, et al. Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: comparison between primary glial cells and C6 cell line. *Glia.* 2005;51(3):187-98.
93. Hayashi K, Nakao S, Nakaoke R, Nakagawa S, Kitagawa N, Niwa M. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept.* 2004;123(1-3):77-83.
94. Tavelin S, Grasjo J, Taipalensuu J, Ocklind G, Artursson P. Applications of epithelial cell culture in studies of drug transport. *Methods Mol Biol.* 2002;188:233-72.
95. Hamadneh L, Al-Majawleh M, Jarrar Y, Shraim S, Hasan M, Abu-Irmaileh B. Culturing conditions highly affect DNA methylation and gene expression levels in MCF7 breast cancer cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2018;54(5):331-4.
96. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012;32(11):1959-72.
97. 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.
98. Gaillard PJ, de Boer AG. Relationship between permeability status of the blood-brain barrier and in vitro permeability coefficient of a drug. *Eur J Pharm Sci.* 2000;12(2):95-102.
99. Maherally Z, Fillmore HL, Tan SL, Tan SF, Jassam SA, Quack FI, et al. Real-time acquisition of transendothelial electrical resistance in an all-human, in vitro, 3-dimensional, blood-brain barrier model exemplifies tight-junction integrity. *Faseb j.* 2018;32(1):168-82.
100. Wuest DM, Wing AM, Lee KH. Membrane configuration optimization for a murine in vitro blood-brain barrier model. *J Neurosci Methods.* 2013;212(2):211-21.
101. Saunders NR, Dziegielewska KM, Mollgard K, Habgood MD. Markers for blood-brain barrier integrity: how appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Front Neurosci.* 2015;9:385.
102. Kutuzov N, Flyvbjerg H, Lauritzen M. Contributions of the glycocalyx, endothelium, and extravascular compartment to the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(40):E9429-e38.
103. Sahagun G, Moore SA, Hart MN. Permeability of neutral vs. anionic dextrans in cultured brain microvascular endothelium. *Am J Physiol.* 1990;259(1 Pt 2):H162-6.
104. Yuan W, Li G, Gil ES, Lowe TL, Fu BM. Effect of surface charge of immortalized mouse cerebral endothelial cell monolayer on transport of charged solutes. *Ann Biomed Eng.* 2010;38(4):1463-72.
105. Aman J, Weijers EM, van Nieuw Amerongen GP, Malik AB, van Hinsbergh VW. Using cultured endothelial cells to study endothelial barrier dysfunction: Challenges and opportunities. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016;311(2):L453-66.
106. Watanabe T, Dohgu S, Takata F, Nishioku T, Nakashima A, Futagami K, et al. Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(3):492-5.

107. Pearce SC, Al-Jawadi A, Kishida K, Yu S, Hu M, Fritzky LF, et al. Marked differences in tight junction composition and macromolecular permeability among different intestinal cell types. *BMC Biol.* 2018;16(1):19-.
108. Takata F, Dohgu S, Yamauchi A, Matsumoto J, Machida T, Fujishita K, et al. In vitro blood-brain barrier models using brain capillary endothelial cells isolated from neonatal and adult rats retain age-related barrier properties. *PLoS One.* 2013;8(1):e55166.
109. Vilar S, Chakrabarti M, Costanzi S. Prediction of passive blood-brain partitioning: straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *J Mol Graph Model.* 2010;28(8):899-903.
110. Booth R, Kim H. Permeability analysis of neuroactive drugs through a dynamic microfluidic in vitro blood-brain barrier model. *Ann Biomed Eng.* 2014;42(12):2379-91.
111. Teksin ZS, Seo PR, Polli JE. Comparison of drug permeabilities and BCS classification: three lipid-component PAMPA system method versus Caco-2 monolayers. *Aaps j.* 2010;12(2):238-41.
112. Loscher W, Potschka H. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Prog Neurobiol.* 2005;76(1):22-76.
113. Wu JQ, Shao K, Wang X, Wang RY, Cao YH, Yu YQ, et al. In vitro and in vivo evidence for amphotericin B as a P-glycoprotein substrate on the blood-brain barrier. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(8):4464-9.
114. Omid Y, Campbell L, Barar J, Connell D, Akhtar S, Gumbleton M. 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.* 2003;990(1-2):95-112.
115. Boroujerdi A, Tigges U, Welser-Alves JV, Milner R. Isolation and culture of primary pericytes from mouse brain. *Methods Mol Biol.* 2014;1135:383-92.
116. Saraiva C, Praca C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release.* 2016;235:34-47.