

Université de Montréal

Mise au point d'un modèle *in vitro* de la barrière  
hémato-encéphalique pour l'étude de la perméabilité  
de médicaments

par

**Florian Bernard**

Faculté de pharmacie

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de  
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en sciences pharmaceutiques

Option technologie pharmaceutique

Avril 2020



# Université de Montréal

Faculté de pharmacie

---

Cette thèse intitulée

## Mise au point d'un modèle *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique pour l'étude de la perméabilité de médicaments

présentée par

### Florian Bernard

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

*Pre Marie Lordkipanidzé*

---

(président-rapporteur)

*Pre V. Gaëlle Roullin*

---

(directeur de recherche)

*Pr Grégoire Leclair*

---

(codirecteur)

*Pr Simon-Pierre Gravel*

---

(membre du jury)

*Dr Kessen Patten*

---

(examineur externe)

*Pr Patrick Lavoie*

---

(représentant du doyen de la FESP)





# Résumé

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est la structure formant les capillaires du système nerveux central (SNC). La BHE est responsable de maintenir l'homéostasie du cerveau en régulant précisément les échanges entre le sang et le tissu cérébral. Elle est composée de trois types cellulaires : les cellules endothéliales (ECs), les péricytes (PCs) et les astrocytes (ACs). Du fait de ses propriétés très sélectives, la BHE est une des causes majeures des échecs observés dans le développement des médicaments destinés au SNC. En effet, ces médicaments en développement sont souvent incapables de franchir la BHE pour atteindre leurs cibles thérapeutiques. C'est pour cette raison que la mise au point et l'utilisation de modèles de BHE sont cruciaux pour étudier la capacité de nouveaux agents thérapeutiques à traverser la BHE mais également les mécanismes sous-jacents à leurs passages. Utilisé très tôt dans le développement pharmaceutique, un modèle de BHE informatif permettrait de réduire les échecs dans des phases de R&D plus avancées. Nous reportons dans cette thèse le développement et la validation d'un modèle de BHE réalisé sur un Transwell<sup>®</sup>, composé d'ECs extraites chez la souris. Les travaux ont été réalisés avec la perspective de fournir le plus d'informations possibles quant à la réalisation, l'utilisation et l'interprétation du modèle de BHE dans l'étude de la perméabilité de petites molécules en conditions saines et pathologiques.

Dans un premier temps, nous avons établi un protocole permettant l'isolation chez la souris des trois types cellulaires composant la BHE, soit les ECs chez la souris adulte, et les PCs et les ACs chez les nouveau-nés. Les méthodes décrites sont efficaces pour obtenir rapidement un grand nombre de cellules pures à moindre coût. De plus, les essais préliminaires démontrent que les cellules endothéliales isolées sont pertinentes pour la création d'un modèle de la BHE.

Dans un deuxième temps, nous avons entrepris de valider un modèle sain de BHE. Pour ce faire, nous avons comparé les résultats de la perméabilité *in vivo* de 7 molécules à trois modèles de BHE composés respectivement d'ECs primaires, d'ECs immortalisées ou de lipides extraits du cerveau porcin. Le modèle de BHE composé des ECs primaires corrèle le mieux avec les résultats obtenus *in vivo* chez la souris.

Dans un troisième temps, nous avons exploré la possibilité d'utiliser ce modèle de BHE validé

comme modèle dans l'étude de la perméabilité lors d'une inflammation aiguë. Les résultats obtenus nous permettent de décrire les possibles voies empruntées par les molécules dont la perméabilité est augmentée lors de l'inflammation. Néanmoins, cette étude met aussi en lumière l'absence de généralisation possible quant à l'impact de l'inflammation aiguë sur le passage des petites molécules à travers la BHE.

À l'issue de cette thèse, un modèle de BHE composé d'ECs primaire a été développé et validé. Ce modèle permettra l'étude systématique des nombreux paramètres impliqués dans le passage des molécules à travers la BHE très tôt dans le développement du médicament.

Mots-clés : Barrière hémato-encéphalique, cellules endothéliales, péricytes, astrocytes, perméabilités, jonctions serrées, transporteurs.

# Abstract

The blood-brain barrier (BBB) is the structure that forms the capillaries of the central nervous system (CNS). BBB major role is to maintain brain homeostasis by precisely regulating exchange between blood and brain tissues. Three cellular types constitute the BBB, namely: endothelial cells (ECs), pericytes (PCs) and astrocytes (ACs). Due to the BBB selectivity, this barrier is the major cause of failing in the drug development of molecules targeting the CNS. Indeed, drugs developed for CNS pathologies are often unable to cross the BBB to reach their therapeutic targets. The use of a relevant BBB model is therefore critical to study drug permeability when developing new drugs. Used earlier in drug development, this kind of BBB model could allow reducing failure rates in more advanced R&D phases. In this thesis, we report the development and validation of a BBB model made from ECs extracted from mouse and seeded in a Transwell<sup>®</sup>. This work aimed at providing as much information as possible regarding the production, use and interpretation of the BBB model in the study of small molecule permeability under healthy and pathological conditions.

First, we established a protocol allowing the isolation of the three cell types from mice : endothelial cells from adult mice, and pericytes and astrocytes from newborns. The methods described herein are effective to quickly obtain a large number of pure cells at a low cost. Furthermore, preliminary tests show that isolated endothelial cells are relevant for the creation of a BBB model.

Next, we focused on validating a healthy BBB model. We have compared the results of the *in vivo* permeability of 7 molecules with three models of BBB composed respectively of primary ECs, immortalized ECs or extracted porcine brain lipids. The BBB model composed of primary ECs best correlates with the results obtained *in vivo* in mice.

Finally, we studied the possibility of using our BBB model as a model of permeability under acute inflammation. Our results allowed describing the possible routes used by the molecules whose permeability was increased during inflammation. The inflamed BBB model is relevant for studying the permeability of small molecules; however, this work also shows that one cannot generalize the impact of inflammation on the passage of small molecules through the BBB.

Overall, we have developed and validated a BBB model composed of primary endothelial cells. This model allows studying drug permeability and provides a better understanding of the mechanisms involved in the permeability. This model could be used to study many parameters involved in the passage of molecules through the BBB at very early stages of drug development.

Keywords: Blood-brain barrier, endothelial cells, pericytes, astrocytes, permeability, tight junctions, transporters.

# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>xi</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>xiii</b>
<b>Liste des abréviations et des symboles</b>	<b>xvii</b>
<b>Dédicace</b>	<b>xxi</b>
<b>Remerciements</b>	<b>xxiii</b>
<b>Chapitre 1 Introduction</b>	<b>1</b>
1.1 Mise en contexte . . . . .	1
1.1.1 Généralités sur la barrière hémato-encéphalique . . . . .	1
1.1.2 La barrière hémato-encéphalique et les maladies du système nerveux central dans le contexte pharmaceutique . . . . .	3
1.2 La barrière hémato-encéphalique . . . . .	4
1.2.1 Les astrocytes . . . . .	5
1.2.2 Les péricytes . . . . .	9
1.2.3 Les cellules endothéliales . . . . .	13
1.2.4 Les autres éléments en lien avec la barrière hémato-encéphalique . . . . .	26
1.3 La barrière hémato-encéphalique dans un contexte d'inflammation . . . . .	31
1.3.1 Les principales molécules pro-inflammatoires et leurs mécanismes d'action . . . . .	33
1.3.2 Les changements induits par l'inflammation sur les cellules endothéliales . . . . .	35
1.3.3 Inflammation et perméabilité des petites molécules à travers la barrière hémato-encéphalique . . . . .	37

1.4	Les modèles d'études de la perméabilité de la BHE . . . . .	38
1.4.1	Les modèles <i>in vivo</i> . . . . .	41
1.4.2	Les modèles <i>in silico</i> . . . . .	48
1.4.3	Les modèles <i>in vitro</i> . . . . .	49
1.4.4	Les formules associées à l'étude de la perméabilité . . . . .	55
1.5	Hypothèse et objectifs de recherche . . . . .	58
1.5.1	Hypothèse de recherche . . . . .	58
1.5.2	Objectifs de recherche et méthodologies . . . . .	60
1.5.3	Objectif 1 — Isoler et caractériser les cellules de la barrière hémato-encéphalique	60
1.5.4	Objectif 2 — Développer et valider un modèle de BHE pour l'étude de la perméabilité . . . . .	60
1.5.5	Objectif 3 — Application du modèle à l'étude de la perméabilité dans un contexte pathologique . . . . .	61
1.6	Contribution des auteurs . . . . .	61
1.6.1	Article 1 . . . . .	61
1.6.2	Article 2 . . . . .	62
1.6.3	Article 3 . . . . .	63

**Chapitre 2 Article 1 - Isolation of Endothelial Cells, Pericytes and Astrocytes from Mouse Brain.**

		<b>65</b>
2.1	Abstract . . . . .	66
2.2	Introduction . . . . .	66
2.3	Materials and Methods . . . . .	68
2.3.1	Brain Extractions . . . . .	68
2.3.2	ECs Isolation and Enrichment . . . . .	68
2.3.3	PCs Isolation and Enrichment . . . . .	69
2.3.4	ACs Isolation and Enrichment . . . . .	70
2.3.5	Cell Characterization . . . . .	70
2.3.6	Cellular Functionality . . . . .	71
2.3.7	Endothelial Cell Cryopreservation . . . . .	73
2.3.8	Data Statistical Analyses . . . . .	74
2.4	Results . . . . .	74
2.4.1	Isolated BBB Cells Express Cell-Specific Lineage Markers . . . . .	74
2.4.2	Isolated Primary ECs Display Blood-Brain Barrier Characteristics . . . . .	76
2.4.3	Endothelial Cells Cultured in Inflammatory Conditions . . . . .	79
2.4.4	Bi-Cellular <i>In Vitro</i> BBB Models Impact TEER and Permeability . . . . .	80

2.4.5	Cryopreservation of Endothelial Cells . . . . .	81
2.5	Discussion . . . . .	82
2.6	Acknowledgements . . . . .	86
2.7	Supporting information . . . . .	87
2.8	References . . . . .	97
2.9	Résultats supplémentaires . . . . .	103
2.9.1	Les éléments suivants ont été modifiés par rapport à l'article publié : . . . .	103
2.9.2	Définition d'une unité utilisée pour les cytokines . . . . .	104
2.9.3	Nombre d'animaux utilisés par modèle . . . . .	104

**Chapitre 3 Article 2 - *IVIVC Assessment of Two Mouse Brain Endothelial Cell Models for Drug Screening* 105**

3.1	Abstract . . . . .	106
3.2	Introduction . . . . .	106
3.3	Materials and Methods . . . . .	109
3.3.1	Chemical and Supplies . . . . .	109
3.3.2	Animals and Cell Culture . . . . .	109
3.3.3	Model Assembly . . . . .	111
3.3.4	Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) Model . . . . .	116
3.3.5	Animal Studies . . . . .	117
3.3.6	LC-MS/MS Drug Analysis . . . . .	118
3.3.7	Statistical Analysis . . . . .	119
3.4	Results . . . . .	119
3.4.1	Endothelial Cells—Basal Characterization . . . . .	119
3.4.2	Monolayer Models and Subsequent Characterization . . . . .	121
3.4.3	<i>In Vivo/In Vitro</i> Correlation and Validation . . . . .	124
3.5	Discussion . . . . .	125
3.5.1	Although Morphologically Identical, Primary and Immortalized Brain ECs Display Different Genomic Patterns . . . . .	125
3.5.2	Primary Cells Form a Tighter, More Impermeable Monolayer Model Than Immortalized Cells . . . . .	127
3.5.3	Primary Cells Allow a Better Predictability of Drug Permeation Across the BBB . . . . .	129
3.6	Conclusions . . . . .	131
3.7	Supporting information . . . . .	132
3.8	References . . . . .	135

3.9	Résultats supplémentaires . . . . .	140
3.9.1	Les éléments suivants ont été modifiés par rapport à l'article publié : . . . .	140
3.9.2	Choix du délai de 2h post-iv . . . . .	140
3.9.3	Coefficient de corrélation (r) et coefficient de détermination (r <sup>2</sup> . . . . .	141
3.9.4	Comment la membrane PAMPA se compare-t-elle au modèle avec les bEnd3?141	

**Chapitre 4 Article 3 - *Acute inflammation of the blood-brain barrier has an unexpected impact on the permeability of small drugs in a validated in vitro model.***

**143**

4.1	Abstract . . . . .	144
4.2	Introduction . . . . .	144
4.3	Materials and methods . . . . .	145
4.3.1	Animals . . . . .	145
4.3.2	Endothelial Cell Cultures . . . . .	146
4.3.3	Blood-Brain Barrier Model . . . . .	146
4.3.4	Acute Inflammation Blood-Brain Barrier Model . . . . .	146
4.3.5	Cell Viability Assay . . . . .	146
4.3.6	Model Characterization . . . . .	147
4.3.7	Statistical Analysis . . . . .	150
4.4	Results and Discussions . . . . .	150
4.4.1	<i>In vitro</i> Model Conditions . . . . .	150
4.4.2	Validation of the Acute Inflammation BBB Model . . . . .	151
4.4.3	Small Drug Permeability In The Acutely Inflamed BBB Model . . . . .	153
4.5	Conclusions . . . . .	158
4.6	Acknowledgements . . . . .	159
4.7	Author statement . . . . .	159
4.8	Supporting information . . . . .	160
4.9	References . . . . .	165

**Chapitre 5 Discussion et perspectives**

**171**

5.1	Résumé des travaux réalisés . . . . .	171
5.2	Isolation et enrichissement des cellules de la BHE . . . . .	171
5.2.1	Améliorations possibles pour l'obtention des cellules endothéliales . . . . .	174
5.2.2	Obtention des péricytes : un avantage, des inconvénients . . . . .	174
5.2.3	Obtention des astrocytes : peu de pistes d'amélioration du protocole . . . . .	175
5.3	Cahier des charges du modèle de BHE pour évaluer la perméabilité . . . . .	175



5.3.1	Les modèles multicellulaires – trop complexes actuellement pour des applications HTS . . . . .	177
5.3.2	Le modèle PAMPA-BBB – simplissime mais peu fiable . . . . .	178
5.3.3	Le modèle composé de cellules bEnd.3 . . . . .	180
5.3.4	Le modèle composé de cellules endothéliales primaires . . . . .	182
5.4	Le modèle pathologique . . . . .	184
5.4.1	Les limites de notre modèle pathologique . . . . .	184
5.4.2	Les limitations de notre étude sur l’inflammation . . . . .	185
5.5	Perspectives futures . . . . .	186
5.5.1	Consolider la reproductibilité du modèle . . . . .	187
5.5.2	Étendre l’utilisation du modèle . . . . .	188
<b>Chapitre 6</b>	<b>Conclusion</b>	<b>191</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>212</b>
	<b>Annexe A - <i>Curriculum vitae</i> scientifique</b>	<b>213</b>



# Liste des tableaux

<b>Table S2.1</b>	Literature protocol comparison for ECs, PCs and ACs isolation. . . . .	93
<b>Table S2.2</b>	Detailed list of used reagents . . . . .	94
<b>Table S2.3</b>	Detailed list of used consumables . . . . .	95
<b>Table S2.4</b>	Detailed list of used equipment . . . . .	96
<b>Table S2.5</b>	FACS antibodies and isotypes. . . . .	96
<b>Table S2.6</b>	Confocal and ICC antibodies. . . . .	97
<b>Table S2.7</b>	q-PCR probes and primers . . . . .	97
<b>Table 3.1</b>	List of the drugs selected for the validation of ECs and bEnd3 mono-layer models. . . . .	113
<b>Table 3.2</b>	Summary of mass spectrometry conditions. . . . .	114
<b>Table 3.3</b>	Primers sequences and parameters used in this study for the analysis of the mRNA expression of main transporters and tight junction proteins. . . . .	115
<b>Table 3.4</b>	Drug formulation ( <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> ) and dosage ( <i>in vivo</i> ) used for the permeability studies. . . . .	118
<b>Table S4.1</b>	Detailed list of used reagents . . . . .	162
<b>Table S4.2</b>	Detailed list of used consumables . . . . .	163
<b>Table S4.3</b>	Detailed list of used equipment . . . . .	164
<b>Table S4.4</b>	Antibodies used for fluorescence microscopy imaging. . . . .	164
<b>Table S4.5</b>	Comparison of permeability coefficients obtained in a previous study [15] with the ones determined during the current one . . . . .	165
<b>Table 5.1</b>	Résumé des spécifications pour la validation de la méthode LC-MS/MS . . . . .	180



# Liste des figures

<b>Figure 1.1</b>	L'unité neurovasculaire au niveau capillaire. . . . .	2
<b>Figure 1.2</b>	Médicaments abandonnés en phase clinique III pour des maladies associées au système nerveux central : 1990 – 2012. . . . .	3
<b>Figure 1.3</b>	Première démonstration de la présence de la barrière hémato-encéphalique lors du développement embryonnaire. . . . .	4
<b>Figure 1.4</b>	Représentation schématique des divers rôles occupés par les astrocytes. . .	7
<b>Figure 1.5</b>	Trois images de microscopie électronique à balayage de segments de capillaires du SNC du rat (a à c) ainsi que quatre dessins illustrant l'association structurelle des péricytes avec les microvaisseaux (d à g). . . .	10
<b>Figure 1.6</b>	Le rôle multifonctionnel des péricytes du SNC. . . . .	12
<b>Figure 1.7</b>	Les mécanismes de transport au travers de la BHE . . . . .	14
<b>Figure 1.8</b>	Jonctions serrées, communicantes et adhérentes. . . . .	17
<b>Figure 1.9</b>	Les transporteurs de la BHE. . . . .	21
<b>Figure 1.10</b>	Changement de morphologie de microglies primaires de souris après activation par la dopamine. . . . .	28
<b>Figure 1.11</b>	Représentation schématique des membranes basales. . . . .	30
<b>Figure 1.12</b>	Stratégie suggérée par Abbott en 2004 pour la prédiction de la perméabilité de nouvelles molécules au travers de la BHE. . . . .	39
<b>Figure 1.13</b>	Schémas des différentes techniques <i>in vivo</i> pour mesurer la diffusion d'une molécule au cerveau. . . . .	45
<b>Figure 1.14</b>	Représentation schématique des différents modèles de BHE <i>in vitro</i> . . .	53
<b>Figure 2.1</b>	Identification of isolated brain cells from mice. . . . .	76
<b>Figure 2.2</b>	Electrical resistance of primary cultures of pericytes, astrocytes and endothelial cells, as measured by ECIS Z $\theta$ . . . . .	78
<b>Figure 2.3</b>	Relative quantification of the mRNA of junction and transporter proteins in primary endothelial cells. . . . .	80
<b>Figure 2.4</b>	Measurement of the transcellular permeability of primary endothelial cells alone or in co-culture with pericytes or astrocytes. . . . .	81
<b>Figure 2.5</b>	Viability of primary endothelial cells after cryopreservation. . . . .	82

<b>Figure S2.1</b>	Illustration of the flow cytometry analysis strategy related to the complete identification of PCs (at P3). . . . .	87
<b>Figure S2.2</b>	Analysis of population purity by flow cytometry. . . . .	88
<b>Figure S2.3</b>	Confocal microscopy images of primary endothelial cells. . . . .	89
<b>Figure S2.4</b>	Confocal microscopy images of primary pericytes (PCs) and astrocytes (ACs). . . . .	90
<b>Figure S2.5</b>	Primary pericytes (PCs) do not express fibroblast-specific protein 1 (FSP1) on fluorescent microscopic images. . . . .	90
<b>Figure S2.6</b>	Maximum impedance of endothelial cell (EC) monolayers at different passages. . . . .	91
<b>Figure S2.7</b>	Electrical resistance of primary cultures of endothelial cells without treatment, as measured by ECIS Z $\theta$ . . . . .	91
<b>Figure S2.8</b>	Junctional protein expression in cryopreserved and non-cryopreserved primary endothelial cells. . . . .	92
<b>Figure 3.1</b>	mRNA expression fold-change between ECs and bEnd.3 cells, the latter used as the calibrator. . . . .	120
<b>Figure 3.2</b>	Effect of puromycin on ECs and bEnd.3 cell viability. . . . .	121
<b>Figure 3.3</b>	Comparison of TEER and markers permeability between ECs and bEnd.3.	122
<b>Figure 3.4</b>	Differences in the fold-change of gene expression between ECs and bEnd.3 cells grown on a polyester membrane insert filter compared to cells grown on plastic cell culture flask. . . . .	123
<b>Figure 3.5</b>	Linear regression plots for <i>in vitro</i> Pe– <i>in vivo</i> log BB correlation (IVIVC) using different models. . . . .	125
<b>Figure S3.1</b>	Bright field imaging of ECs and bEnd.3 . . . . .	132
<b>Figure S3.2</b>	Differences in mRNA expression fold-change between ECs and bEnd.3 cell line for selected markers. . . . .	132
<b>Figure S3.3</b>	Differences in gene expression fold-change between ECs and bEnd.3 using various growth conditions. . . . .	133
<b>Figure S3.4</b>	Immunocytochemistry of tight junctions on ECs and bEnd.3. . . . .	134
<b>Figure S3.5</b>	Relative quantification of the tight junction in ECs and bEnd.3. . . . .	135
<b>Figure 4.1</b>	Trans endothelial electrical resistance and permeability of 4 kDa Dextran-fluorescein on endothelial cells treated with LPS (10 $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ), IL1- $\beta$ (50 ng $\times \text{mL}^{-1}$ ) or TNF- $\alpha$ (3 ng $\times \text{mL}^{-1}$ ). . . . .	152

<b>Figure 4.2</b>	Permeability of 6 drugs on the blood-brain barrier model either inflamed with LPS ( $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ , red bars) or IL1- $\beta$ ( $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ , grey bars), compared to untreated cells (NT, black bars). . . . .	154
<b>Figure 4.3</b>	Ribonucleic acid fold change expression of endothelial cells either treated with LPS ( $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ), or IL1- $\beta$ ( $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ), or TNF- $\alpha$ ( $3 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ) for 24 h, relative to untreated cells. . . . .	155
<b>Figure 4.4</b>	Quantification of claudin-5 (Cldn5, green), occludin (Ocln, red) and zonula-occludens 1 (ZO-1, green) on primary ECs treated for 24h with LPS ( $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ) or IL1- $\beta$ ( $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ). . . . .	157
<b>Figure S4.1</b>	(a) Trans endothelial resistance and (b) permeability of 4 kDa FITC-dextran on endothelial cells at passage 1 grown with different donor volumes. . . . .	160
<b>Figure S4.2</b>	Viability of ECs exposed to increasing concentration of (a) LPS, (b) IL1- $\beta$ and (c) TNF- $\alpha$ . . . . .	160
<b>Figure S4.3</b>	Trans endothelial resistance and permeability of 4 kDa FITC-dextran in endothelial cells treated 24 h with LPS ( $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ) or IL1- $\beta$ ( $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ), while the culture media were replaced (plain bars) or not (dashed bars) prior the experiment. . . . .	161
<b>Figure 5.1</b>	Corrélation <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> pour 7 molécules réalisées sur différentes conditions de PAMPA-BBB. . . . .	179
<b>Figure 5.2</b>	Perméabilité de la BSA-FITC seule ou encapsulée au travers d'une monocouche de bEnd.3. . . . .	181
<b>Figure 5.3</b>	Internalisation par les bEnd.3 de la BSA-FITC seule ou encapsulée. . . . .	182
<b>Figure 5.4</b>	TEER pour différents modèles de la BHE composée d'ECs. . . . .	183

*L'intégralité des figures et tableaux inclus dans ce présent document sont reproduits avec l'autorisation préalable des détenteurs du droit d'auteur.*





# Liste des abréviations et des symboles

## Commun aux deux langues

$\tau$	Contrainte de cisaillement	Shear stress
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma	Interferon gamma
<b>IL1-<math>\beta</math></b>	Interleukine 1 beta	Interleukin 1 beta
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Facteur de nécrose tumorale alpha	Tumor Necrosis Factor alpha
<b>AAs</b>	Acide aminés	Amino acids
<b>ABC</b>	Transporteurs en cassette liant l'ATP	ATP-binding cassette
<b>ACSA1/GIast</b>	antigène de surface des cellules astrocytaires	astrocyte cell surface antigen
<b>ACs</b>	Astrocytes	Astrocytes
<b>AI</b>	Intelligence artificielle	Artificial intelligence
<b>AJs</b>	Jonctions adhérentes	Adherens junctions
<b>ANG1</b>	Angiopoïétine	Angiopoietin 1
<b>ATP</b>	Adénosine triphosphate	Adenosine triphosphate
<b>BCRP</b>	Protéine résistance du cancer du sein	Breast cancer resistance protein
<b>bFGF</b>	Facteur de croissance basique des fibroblastes	Basic fibroblast growth factor
<b>BUI</b>	Indice d'absorption cérébrale	Brain uptake index
<b>Cldn5</b>	Claudine-5	Claudin-5
<b>CRedit</b>	Taxonomie des rôles de contributeur	Contributor Roles Taxonomy
<b>Cx</b>	Connexine	Connexin

<b>ECs/BMEC</b>	Cellule endothéliales	Endothelial cell
<b>EMA</b>	L'agence européenne du médicament	European Medicines Agency
<b>ESAMs</b>	Adhésion sélective aux cellules endothéliales molecule	Endothelial cell-selective adhesion
<b>FDA</b>	L'agences de réglementation de la nourriture et des médicaments américaine Drug Administration	Food and
<b>FSP1</b>	Protéine 1 spécifique des fibroblastes	Fibroblast-specific protein 1
<b>GDNF</b>	Facteur neutrophique dérivé des cellules gliale	Glial cell-derived neutrophic factor
<b>GFAP</b>	protéine d'acide fibrillaire gliale	Glial fibillary acidic protein
<b>GJs</b>	Jonctions communicantes	Gaps junctions
<b>HTS</b>	Criblage à haut débit	High throughput screening
<b>IAM</b>	Membrane artificielle immobilisée	Immobilized artificial membrane
<b>iPSC</b>	Cellules souches pluripotentes induites	Induced pluripotent stem cells
<b>JAMs</b>	Molécules d'adhésion jonctionnelles	Junctional adhesion molecules
<b>L-DOPA</b>	1-3, 4-dihydroxyphenylalanine	1-3,4-dihydroxyphenylalanine
<b>LAT1</b>	Transporteur 1 des acides aminés L	L amino acid transporter 1
<b>LC-MS/MS</b>	Chromatographie liquide couplée à deux spectromètres de masse chromatography coupled to two mass spectrometers	Liquid
<b>LDLR</b>	récepteur aux lipoprotéines de faible densité	Low-density lipoprotein receptor
<b>LDL</b>	Lipoprotéines à faible densité	Low-density lipoprotein
<b>MCAM</b>	Molécule d'adhésion des cellules du mélanome	Melanoma cell adhesion molecule
<b>MRP</b>	Protéines associées à la résistance multiple	Multi-resistance protein
<b>NG2</b>	Antigène neural/gliale 2	Neural/Glial antigen 2
<b>Ocln</b>	Occludine	Occludin
<b>P-gp</b>	P-glycoprotéine	P-glycoprotein

<b>PAMPA</b>	Perméabilité sur une membrane parallèle artificielle permeability assay	Parallel artificial membrane
<b>Papp</b>	Perméabilité apparante	Apparent permeability
<b>PAPs</b>	Prolongements présynaptiques astrocytaires	Perisnaptic astrocytic processes
<b>PBL</b>	lipides du cerveau de porc	Porcine brain lipids
<b>PBPK</b>	Pharmacocinétique basée sur des paramètres physiologiques pharmacokinetic	Physiologically based
<b>PCs</b>	Péricytes	Pericyte
<b>PDGFR<math>\beta</math></b>	Facteur de croissance bêta dérivé des plaquettes receptor beta	Platelet-derived growth factor
<b>PDGF</b>	Facteur de croissance dérivé des plaquettes	Platelet-derived growth factor
<b>PDZ</b>	PSD95/Large Disque et zonula occludens	PSD95/Disc Large and Zonula occludens
<b>PECAM</b>	Molécule d'adhésion endothéliale plaquettaire	Platelet endothelial adhesion molecule
<b>Pe</b>	Perméabilité	Permeability
<b>PS</b>	Perméabilité de surface	Permeability surface
<b>PVDF</b>	Polyfluorure de vinylidène	Polyvinylidene fluoride
<b>Q-ToF</b>	Quantification par temps de vol	Quantitative time of flight
<b>QSAR</b>	Relation quantitative structure à activité	Quantitative structure activity relationships
<b>RGS5</b>	Signal 5 régulateur de la protéine G	Regulator of G protein signaling 5
<b>RMT</b>	Récepteurs induisant la transcytose	Receptor mediated transcytosis
<b>sdAbs</b>	Anticorps à domaine unique	Single domain antibodies
<b>Shh</b>	Glycoprotéine hérissonne sonique	Glycoprotein Sonic hedgehog
<b>SLC</b>	Transporteurs de soluté	Solute carrier
<b>SMA</b>	Actine alpha des muscles lisses	Alpha smooth muscle actin
<b>SVM</b>	Machine à vecteurs de support	Support vector machine

<b>TEER</b>	Résistance électrique trans endothéliale	Trans endothelial electrical resistance
<b>TfR</b>	Récepteur à la transferrine	Transferrin receptor
<b>Tf</b>	Transferrine	Transferrin
<b>TGF-<math>\beta</math>1</b>	Facteur de croissance transformant bêta-1	Transforming growth factor-beta1
<b>TJs</b>	Jonctions serrées	Tight junctions
<b>VE-cadherin</b>	Cadhérine vasculaire endothéliale	Vascular endothelial cadherin

### Anglais

<b>BBB</b>	Blood-Brain Barrier
<b>BM</b>	Basal Membrane
<b>CBF</b>	Cerebral blood flow
<b>CNS</b>	Central Nervous System
<b>ISTD</b>	Internal standard
<b>RNA</b>	Ribonucleic acid

### Français

<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>DSC</b>	Débit sanguin cérébral
<b>EI</b>	Étalon interne
<b>MB</b>	Membrane basal
<b>SNC</b>	Système nerveux central

*Apprend comme si tu devais vivre pour toujours,  
vis comme si tu devais mourrir demain*

Gandhi

*À vous mes enfants, à toi ma chère et tendre.*

*À toi l'impertinent ami de toujours qui s'est assagi avec le temps.*

*À tous ceux qui ont rendu cette histoire possible,  
car seul on avance plus vite, mais ensemble on va plus loin.*



# Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche la Pre Roullin et mon codirecteur le Pr Leclair sans qui les travaux de recherche présentés dans cette thèse de doctorat n'auraient jamais vu le jour. Je les remercie pour leurs soutiens et leur patience à mon égard. Merci Gaëlle d'avoir cru en l'étudiant moyen que j'étais et de m'avoir donné ma chance. Merci, Grégoire, pour tes conseils avisés. Je remercie également le Pr Prat, de m'avoir accueilli dans son laboratoire comme un membre de son équipe. Mais aussi pour m'avoir fourni un accès illimité aux connaissances et aux ressources de son laboratoire et d'avoir pris le temps de me recevoir dans son bureau même quand le temps lui manquait.

Je souhaite ensuite remercier tous les étudiants et agents de recherche qui ont jalonné mon parcours. Chaque interaction que j'ai pu avoir avec vous a été précieuse et une aide importante dans de nombreux aspects de ma thèse. Je tiens spécialement à remercier Martin Jutras, qui en plus d'être un père spirituel, est un scientifique passionné qui m'a transmis son savoir avec bienveillance. De plus, je souhaite remercier Lyne Bourbonnière de m'avoir permis d'intégrer si aisément le laboratoire du Pr Prat. Je remercie également Marc-André, pour les discussions scientifiques pointues qui m'ont aiguillé de nombreuses fois dans la bonne direction. Pour finir, je tiens à remercier Ina Puscas pour son franc parlé, sa maturité et pour nos échanges scientifiques. Merci d'avoir été une aussi bonne collègue scientifique. Merci à tous les deux pour toutes vos contributions à la réalisation de mes travaux de recherche. Merci également à tous les co-auteurs des articles qui ont participé intellectuellement ou manuellement au mérite des publications.

Je souhaite remercier les membres du jury qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer mes travaux de recherche et mes connaissances. Vos remarques, perspectives et ouvertures constructives furent les bienvenues.

Je poursuis mes remerciements à la famille, avec ceux sans qui je ne serais tout simplement pas là. Je vous remercie Maman et Papa. Si j'écris ces lignes aujourd'hui c'est simplement grâce à l'amour et la passion que vous m'avez transmis. Je vous en serai pour toujours reconnaissant.

Je continue avec mes beaux-parents, Jean-Frédéric et Anne-Marie qui ont toujours eu la porte et le cœur grand ouvert pour me recevoir. Jean-Frédéric, je vous remercie pour nos discussions philosophiques passées et à venir. Je vous remercie également d'avoir été le relecteur naïf de cette thèse.

Je te remercie toi aussi Baptiste, mon acolyte de toujours. Merci d'avoir toujours été franc et attentif à ce que ma motivation ne faiblisse pas même si tu as fait le choix de la voie de l'ingénieur. Merci à toi l'amie qui avec le temps a fait sa place au sein de notre famille. Merci, Ophélie, pour ton soutien infaillible depuis ces dernières années.

Je terminerais ces remerciements en commençant par toi, ma fille, qui m'a fait prendre conscience de la plus belle place que je veux prendre dans la vie. Enfin, mes remerciements vont à la seule et l'unique amour de ma vie. À toi mon amie, ma confidente, ma femme, la mère de mes enfants. Ton soutien sans faille et ton amour infini sont toujours une source d'inspiration qui révèle le meilleur en moi.



# Chapitre 1

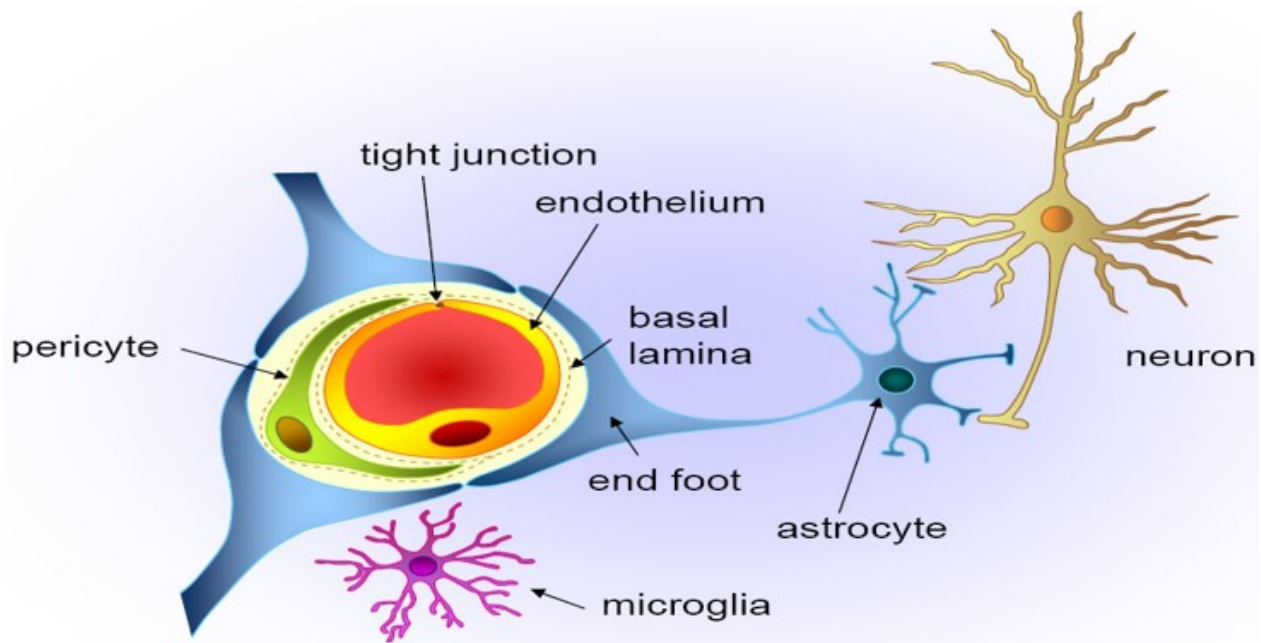
## Introduction

### 1.1 Mise en contexte

#### 1.1.1 Généralités sur la barrière hémato-encéphalique

Le cerveau est l'organe le plus complexe chez les vertébrés et le chef d'orchestre du corps. Pour maintenir l'homéostasie du système nerveux central (SNC), la structure chargée de cette fonction est la barrière hémato-encéphalique (BHE) [1]. C'est en restreignant le passage des molécules, des ions, et des fluides, combinés à l'expression de transporteurs et de récepteurs spécifiques que la BHE produit un environnement optimal pour les fonctions neurologiques [2]. Elle est composée de cellules endothéliales (ECs) qui forment la structure des capillaires cérébraux. Ces dernières sont enveloppées de péricytes (PCs) dans une matrice appelée la lame basale. L'ensemble est alors recouvert par les projections des astrocytes (ACs) [3] (Fig 1.1). Il existe également deux autres types de barrières : la barrière entre le sang et le liquide céphalo rachidien (LCR), au niveau des cellules épithéliales du plexus choroïde, et la barrière arachnoïde entre le LCR et la dure-mère [4].

C'est à partir de la seconde moitié du 20<sup>me</sup> siècle que l'on constate que les ECs de la BHE sont différentes de celles trouvées ailleurs dans l'organisme [5]. Cette différence entre ECs est caractérisée par des propriétés distinctes dont la finalité est de contrôler strictement les échanges entre le sang et le système nerveux central. La première de ces propriétés de contrôle est la présence des jonctions serrées restreignant fortement la voie paracellulaire [6]. Vient ensuite une quantité réduite de vésicules endocytotiques et de récepteurs auxquels s'ajoute une grande diversité de transporteurs dont les transporteurs à efflux [7] limitant grandement la voie transcellulaire. Une dernière propriété, moins étudiée que les précédentes, est la présence d'enzymes métabolisant les molécules endogènes et exogènes [8]. Les ECs possèdent également des jonctions adhérentes qui vont ancrer les cellules dans la LB [9]. La LB est composée majoritairement de protéines extracellulaires excrétées par les ECs et les PCs [10].



**Figure 1.1 – L'unité neurovasculaire au niveau capillaire.**

L'unité neurovasculaire est composée de plusieurs types de cellules en association étroite, travaillant ensemble pour maintenir une fonction cérébrale optimale. Les cellules endothéliales, cellules principales de la BHE, forment des jonctions serrées qui restreignent la voie paracellulaire. Les péricytes enveloppent partiellement les cellules endothéliales et partagent avec elles une lame basale commune. Les projections astrocytaires, appelées pieds d'astrocyte, recouvrent la paroi des microvaisseaux. Les péricytes et les astrocytes jouent un rôle important dans l'induction et l'entretien de la barrière, et les astrocytes fournissent des liens avec les neurones. Les microglies sont des cellules immunitaires résidentes du SNC. Reproduit et modifié avec permission de JohnWiley and Sons [11].

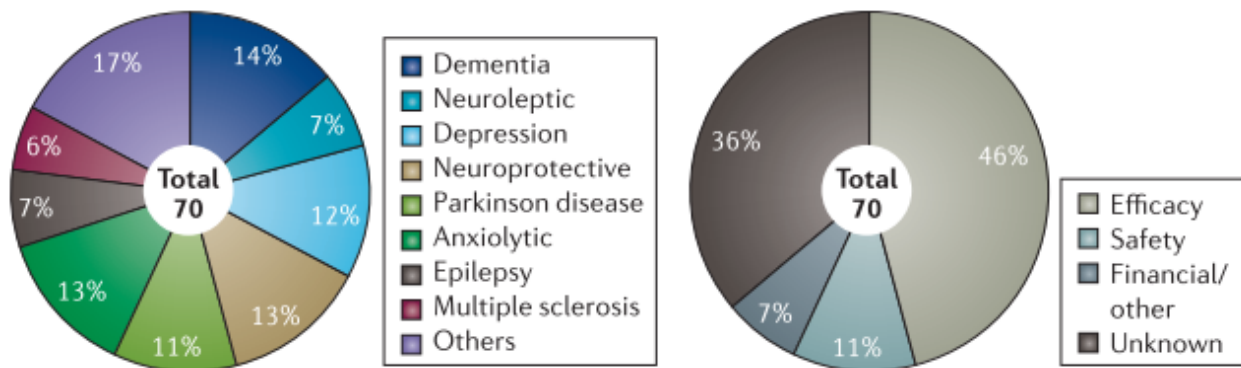
Le type cellulaire prédominant du SNC sont les ACs [12]. Les ACs projettent des extensions qui vont recouvrir la surface du capillaire. Ils jouent le rôle de médiateur entre la BHE et les neurones en permettant les échanges de nutriments et l'élimination des déchets [13]. Les ACs ont également un rôle dans le maintien des caractéristiques de la BHE, même si leur importance a été réévaluées ces 20 dernières années pour être partagée avec les PCs. Les PCs ont également un rôle dans les fonctions suivantes : l'angiogenèse, l'élimination de protéines, la régulation du flux sanguin cérébral et la réponse à l'inflammation [14, 15, 16, 17].

La BHE fait partie d'un ensemble plus grand appelé unité neurovasculaire (NVU) qui comprend également les microglies et les neurones [18] (Fig 1.1). Les fonctions de chaque cellule qui compose la BHE en font certainement la barrière la plus difficile à franchir de l'organisme. Étant donné son importance dans le contrôle des échanges entre le sang et le SNC, la BHE est également un élément central dans de nombreuses pathologies du cerveau [19].

### 1.1.2 La barrière hémato-encéphalique et les maladies du système nerveux central dans le contexte pharmaceutique

Les besoins thérapeutiques en traitements destinés au SNC sont en constante augmentation [20]. Cela est principalement dû à l'accroissement des besoins de la population pour des médicaments traitant les maladies neurodégénératives : la sclérose en plaques, l'accident vasculaire cérébral, les tumeurs, l'épilepsie et les maladies mentales [21]. Le problème est que le taux de réussite dans le développement de médicament destiné au SNC est encore aujourd'hui bien faible et loin derrière tout autre champ thérapeutique.

Dans leurs études de 2015, Kesselheim *et al.* montrent que de 1990 à 2012, les entreprises pharmaceutiques ont eu tendance à ne pas entamer des recherches dans le traitement des maladies affectant le SNC. Les raisons avancées par les auteurs sont premièrement d'ordre économique. On peut prendre comme exemple le champ thérapeutique du cancer qui est plus lucratif. La deuxième raison est que la démonstration de l'efficacité clinique est associée à une plus longue période d'investigation. C'est le cas pour la maladie d'Alzheimer par exemple. Les auteurs ont observé que durant la phase III des essais cliniques pendant laquelle le médicament est comparé à un placebo, les médicaments destinés au SNC sont les plus susceptibles d'échouer. La cause majeure de ces échecs est le manque d'efficacité (Fig 1.2).



**Figure 1.2 – Médicaments abandonnés en phase clinique III pour des maladies associées au système nerveux central : 1990 – 2012.**

Proportions des abandons en phase III par indication thérapeutique (gauche) et par cause (droite). Reproduit et modifié avec permission de Springer Nature [20].

Améliorer la compréhension de la physiopathologie des maladies du SNC aiderait donc grandement dans l'identification de potentiels agents thérapeutiques. Ce qui amène les auteurs à conclure que des modèles plus pertinents dans la phase préclinique devraient être validés [20]. Ce ne sont pas les seuls auteurs à mentionner le besoin actuel en recherche de modèles pertinents [22]. De Lange *et al.*

ont également mis en avant l'importance de comprendre les mécanismes impliqués dans l'influx ou l'efflux des médicaments au travers de la BHE [23]. Déjà en 2005, Pardrige mentionnait le fait que les scientifiques avaient été prolifiques quant à la découverte de médicaments qui pouvaient potentiellement être utilisés pour traiter les maladies du SNC, mais qu'il fallait d'abord régler le problème de la BHE [24].

Les besoins en modèles permettant de comprendre les mécanismes de transport à travers la BHE, mais également les changements induits par les pathologies du SNC, sont très importants, à plus forte raison alors que peu de modèles de BHE pathologiques ont été développés.

## 1.2 La barrière hémato-encéphalique

La première fois que la barrière hémato-encéphalique a été mise en évidence remonte au début du 20<sup>ème</sup> siècle. Goldmann (1909) [25] et Wislocki (1920) [26] ont injecté différents colorants dans des embryons et dans des adultes animaux (souris, cochon d'Inde et lapins). Les chercheurs ont alors constaté que le cerveau était bien moins coloré que les autres tissus (Fig 1.3).



**Figure 1.3 – Première démonstration de la présence de la barrière hémato-encéphalique lors du développement embryonnaire.**

Un embryon de cochon d'Inde a été injecté avec du bleu trypan par Wislocki en 1920. Cette observation fait suite à celle de Goldmann en 1909 avec le même colorant mais chez l'animal adulte. Reproduit et modifié avec permission de Creative Commons Attribution License (CC BY) [27].

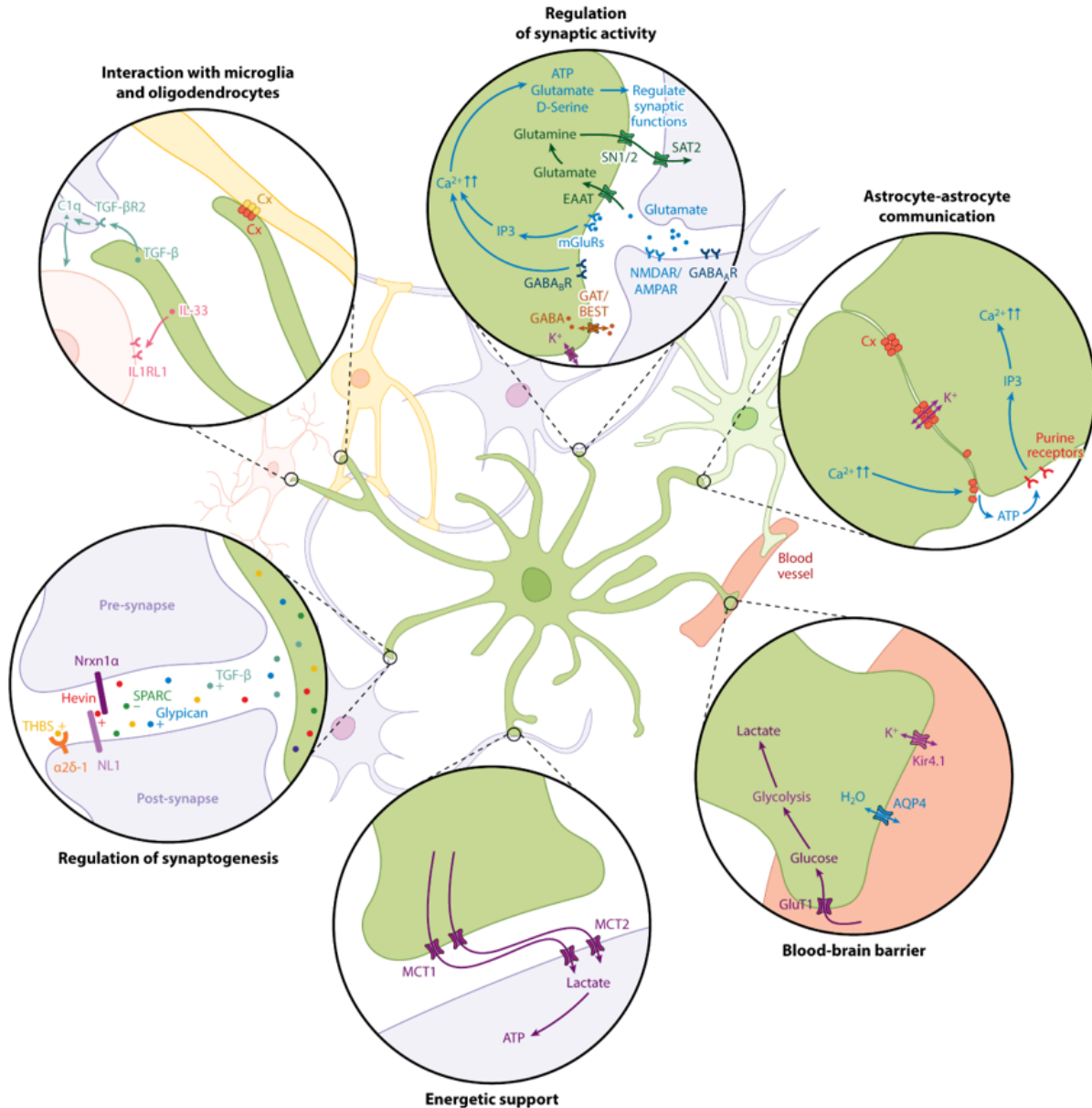
Ces observations feront suite à celles de Paul Ehrlich (1906) [28] qui, lui aussi, avait observé avec de nombreux colorants injectés par différentes voies (intraveineux, intramusculaire et sous-cutané) que le cerveau n'était pas coloré. Néanmoins, ce dernier ne voulait pas conclure que des capillaires pouvaient avoir des propriétés différentes d'un organe à l'autre [27]. Quelques années plus tard, Stern et Gautier (1918), deux chercheurs français, emploieront le terme barrière, et c'est seulement en 1922 que les deux chercheurs appelleront la barrière du cerveau par le terme que l'on emploie aujourd'hui : la barrière hémato-encéphalique (BHE) [29]. Durant cette période, d'autres barrières sont mises en évidence, telles que la barrière séparant le sang du fluide cérébrospinal et l'épithélium arachnoïde [30]. Toutefois, c'est en 1934 que Lina Stern introduira les notions de sélectivité et de résistance de la BHE et la décrira comme la barrière majeure du système nerveux central (SNC). Elle déduira que, comme le liquide céphalo-rachidien, le milieu nutritif baignant les cellules nerveuses présente une composition physico-chimique relativement constante due à la présence de la BHE qui agit comme organe régulateur. Plus précisément, Stern mettra en avant que les propriétés de la barrière ne sont pas uniformes et qu'elles sont dépendantes de la molécule utilisée [31]. Il faudra attendre l'avènement des molécules radio-marquées pour que la théorie de Stern soit confirmée et étudiée avec plus de précision. En effet, le radio-marquage de petites molécules, telles que le sucrose ou le mannitol, permettra de démontrer que ces sucres peuvent traverser la BHE, là où les colorants testés pendant la moitié du vingtième siècle ne parvenaient pas à la franchir [27]. C'est en 1967, dans les débuts de la microscopie électronique, que les premières images obtenues révèlent la structure de la BHE [32]. C'est également à partir de cette époque que les premiers modèles de BHE seront réalisés, améliorant ainsi la reproductibilité des expériences et les connaissances sur la barrière.

Dans cette section, nous verrons plus en détail les différents types cellulaires qui composent la BHE. Nous commencerons par les astrocytes et les péricytes. Pour ces deux types cellulaires, nous regarderons leurs fonctions d'un point de vue général. Nous détaillerons également leur importance dans le fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique en décrivant leurs interactions connues avec les cellules endothéliales. Nous finirons la description des cellules composant la barrière hémato-encéphalique en détaillant les aspects majeurs des cellules endothéliales qui rendent si unique la BHE. À l'issue de cette section, nous aurons une vue d'ensemble de l'état des connaissances sur la barrière hémato-encéphalique et les cellules qui la composent.

### 1.2.1 Les astrocytes

Les astrocytes (ACs) sont les cellules prédominantes du cerveau et ils sont 5 fois plus nombreux que les neurones [33]. C'est en 1846 que Rudolf Virchow décrira les cellules neurogliales dont font partie les ACs, comme une population homogène soutenant les fonctions des neurones [12]. Avec l'avancée des connaissances, les cellules gliales ont été divisées en sous-catégories dont les

cellules suivantes : les oligodendrocytes, les microglies et les astrocytes. Les oligodendrocytes sont un des deux types cellulaires intervenant dans la formation de la gaine de myéline. La myéline est la couche isolante des axones. Les microglies sont les cellules immunitaires innées du SNC [34]. Depuis ces 10 dernières années, les avancées technologiques remettent également en cause le fait que les ACs forment une population homogène [35, 33]. Les astrocytes ont été dans un premier temps classés en deux catégories, les ACs protoplasmiques et les astrocytes fibreux. Les ACs protoplasmiques se retrouvent au niveau de la matière grise alors que les ACs fibreux sont quant à eux présents dans la matière blanche. Néanmoins, ces deux types d'ACs sont en contact avec les vaisseaux sanguins [3]. De nos jours, il semblerait que la grande diversification des fonctions dont sont capables les astrocytes pourrait conduire à une classification bien plus large que seulement deux catégories [35] (Fig 1.4).



Khakh BS, Deneen B. 2019.  
*Annu. Rev. Neurosci.* 42:187–207

**Figure 1.4 – Représentation schématique des divers rôles occupés par les astrocytes.**

Abréviations : AMPAR,  $\alpha$ -amino-3hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; BEST, bestrophin;  $Ca^{2+}$ , calcium ion; Cx, connexin; EAAT, excitatory amino acid transporter; GABA,  $\gamma$ -aminobutyric acid; GAT, GABA transporter; GluT1, glucose transporter 1; IL, interleukin; IP3, inositol triphosphate;  $K^+$ , potassium ion; MCT1/2, monocarboxylate transporter 1/2; mGluRs, metabotropic glutamate receptors; NMDAR, N-methyl-d-aspartate receptor; Nrxn1 $\alpha$ , Neurexin 1 $\alpha$ ; THBS, thrombospondin. Reproduit et modifié avec permission de Annual Reviews, Inc [35].

Le rôle premier des ACs est de permettre la communication entre les neurones en intervenant



dans la régulation de la synaptogenèse et l'activité synaptique. Les synapses sont décrites comme une interaction spécialisée entre une terminaison axonale présynaptique d'un neurone et la dendrite postsynaptique d'un autre neurone. Pendant la synaptogénèse, la partie présynaptique va accumuler des vésicules contenant des neurotransmetteurs, alors que la partie postsynaptique accumulera des récepteurs destinés aux neurotransmetteurs. Les astrocytes protoplasmiques possèdent des extensions appelées prolongements présynaptiques astrocytaires (*perisynaptic astrocytic processes*, PAPs) [36]. Ces prolongements vont être utilisés par les astrocytes pour sécréter des facteurs induisant la formation et la maturation de synapses [37]. Les ACs, par l'intermédiaire de leurs PAPs, ont la capacité de libérer de l'adénosine triphosphate (*Adenosine triphosphate*, ATP) dans la synapse, induisant la modulation de l'activité synaptique et, par extension, l'activité neuronale [38].

Les ACs ont également la capacité d'interagir avec les oligodendrocytes en promouvant la prolifération, la différenciation et la myélinisation de ces derniers. Pour cela, les ACs vont sécréter des facteurs solubles, tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor*, PDGF) et le facteur de croissance basique des fibroblastes (*basic fibroblast growth factor*, bFGF) [34].

Le dernier rôle majeur des ACs est de maintenir des fonctions de la barrière hémato-encéphalique. En effet, pendant longtemps, les astrocytes ont été considérés comme les cellules impliquées dans la formation et la maintenance des propriétés de la BHE. Mais les données de ces 10 dernières années tendent à démontrer que le rôle des astrocytes est davantage lié à la maintenance des propriétés de la BHE [39]. Les astrocytes possèdent des prolongements appelés pieds astrocytaires, qui vont recouvrir la surface des capillaires cérébraux (Fig 1.1). Ces pieds astrocytaires très proches des cellules endothéliales et péricytes vont interagir avec la BHE dans diverses fonctions. Premièrement, les ACs secrètent des médiateurs tels que la prostaglandine, l'oxyde nitrique et l'acide arachidonique qui peuvent augmenter ou diminuer localement les diamètres des vaisseaux sanguins [3]. De plus, dans l'étude de Alvarez *et al.*, les astrocytes ont été observés promouvant l'intégrité de la BHE en interagissant avec le récepteur des cellules endothéliales pour la glycoprotéine hérissone sonique (*Glycoprotein Sonic hedgehog*, Shh). Cette interaction limite l'accès des cellules immunitaires au SNC en diminuant l'expression des molécules proinflammatoires dans les ECs. Dans la même étude, le signal Shh a eu également pour effet d'augmenter l'expression dans les ECs de deux protéines formant les jonctions serrées, la claudin-5 (Cldn5) et l'occludine (Ocln) [40]. Les astrocytes secrètent également de la laminine qui est un constituant majeur de la lame basale et dont l'absence produit, cette fois-ci, une diminution de l'expression de la Cldn5 et Occ conduisant à une BHE plus perméable [41]. Il est intéressant de noter que les connaissances sur les astrocytes ont été obtenues majoritairement *in vitro* par l'isolation de ces derniers dans de nombreuses espèces [35, 12, 3, 33].

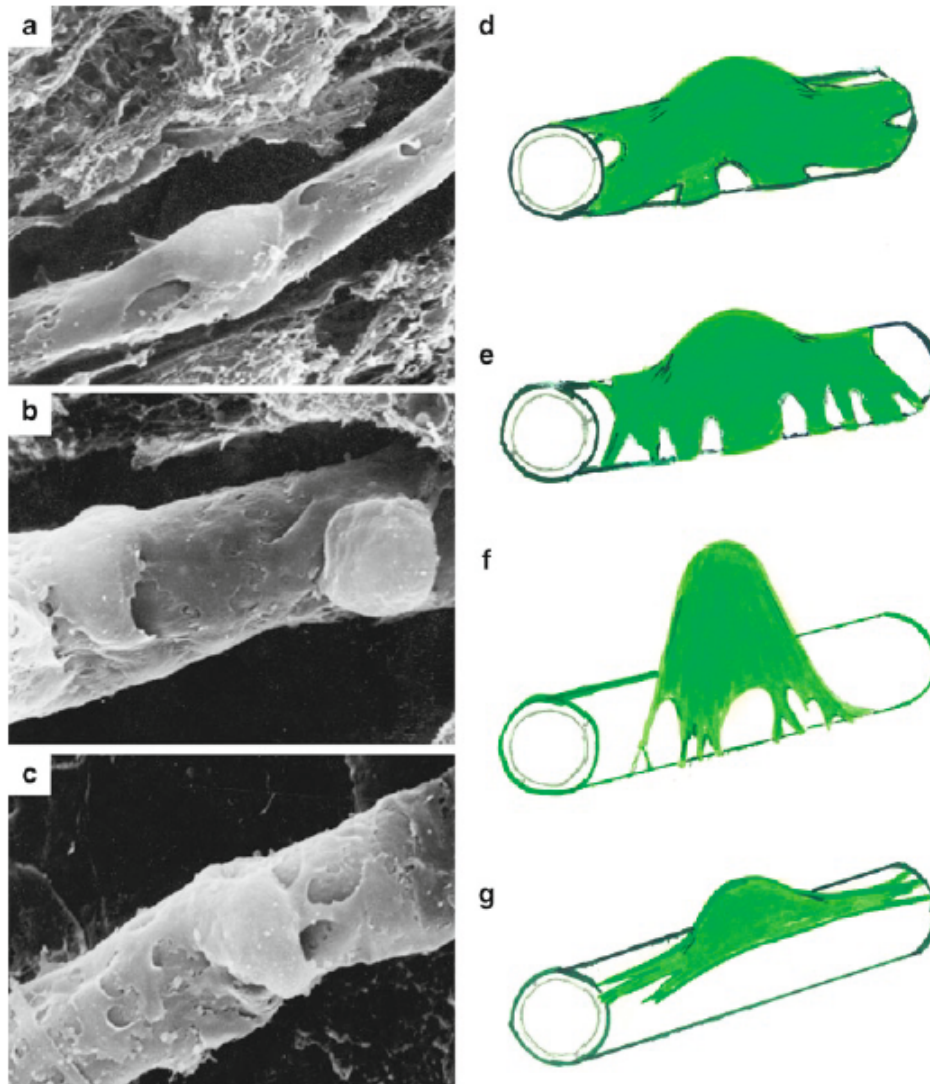
L'isolation des ACs chez le rongeur remonte à un protocole publié en 1970 [42]. Dès cette



époque, les animaux utilisés sont des nouveau-nés, âgés entre 1 et 12 jours. La raison principale est que la culture d'astrocytes, obtenue depuis le cerveau d'animaux adultes, prolifère très peu [43, 44]. La méthode d'extraction a très peu varié depuis 1970. Les cortex sont prélevés après avoir retiré les méninges puis digérés enzymatiquement (trypsine). Les agrégats cellulaires sont ensuite dissociés mécaniquement avant d'être déposés dans le fond d'une flasque préalablement revêtue de poly-D-lysine. Cette méthode est connue pour produire un très grand nombre de cellules astrocytaires avec une contamination en microglie de l'ordre de 5 % [45]. Certains protocoles réduiront la contamination par les microglies en dessous de 1 % en employant des billes. La méthode de sélection négative par billes est réalisée en ciblant le marqueur des microglies, le CD11b. La sélection positive se concentre sur l'antigène de surface des cellules astrocytaires (*astrocyte cell surface antigen*, ACSA1 ou Glast). L'utilisation de tissus humains pour extraire les astrocytes a également été décrite [46]. Le problème majeur est que le tissu ne peut pas être décrit comme sain puisque le prélèvement est toujours obtenu via des patients malades ou âgés [47]. La caractérisation des ACs est ensuite achevée par l'utilisation d'anticorps dirigés contre des marqueurs plus ou moins spécifiques ainsi que des contrôles négatifs. Le marqueur le plus récent (2012) pour caractériser les ACs est Glast [48]. Il est utilisé dans les premiers jours de la culture ou encore lors du triage cellulaire. Néanmoins, il perd en intensité au fur et à mesure que les astrocytes gagnent en maturité. Les marqueurs tels que la protéine d'acide fibrillaire gliale (*Glial fibrillary acidic protein*, GFAP), le S100 $\beta$ , et l'aquaporine 4 sont alors utilisés [49].

### 1.2.2 Les péricytes

Les péricytes (PCs) ont été décrits à la fin du 19e siècle mais, pendant longtemps, le manque de marqueurs spécifiques a empêché leur étude [39]. À cela, il faut ajouter le fait que les PCs représentent un faible nombre de cellules. On trouve en effet environ 1 PC pour 4 ECs dans le SNC, qui est le tissu en contenant le plus avec la rétine [50]. Les PCs sont enchevêtrés dans la membrane basale entre les ECs et les pieds astrocytaires (Fig 1.1). Leurs prolongements entourent le capillaire sur plusieurs ECs (Fig 1.5).



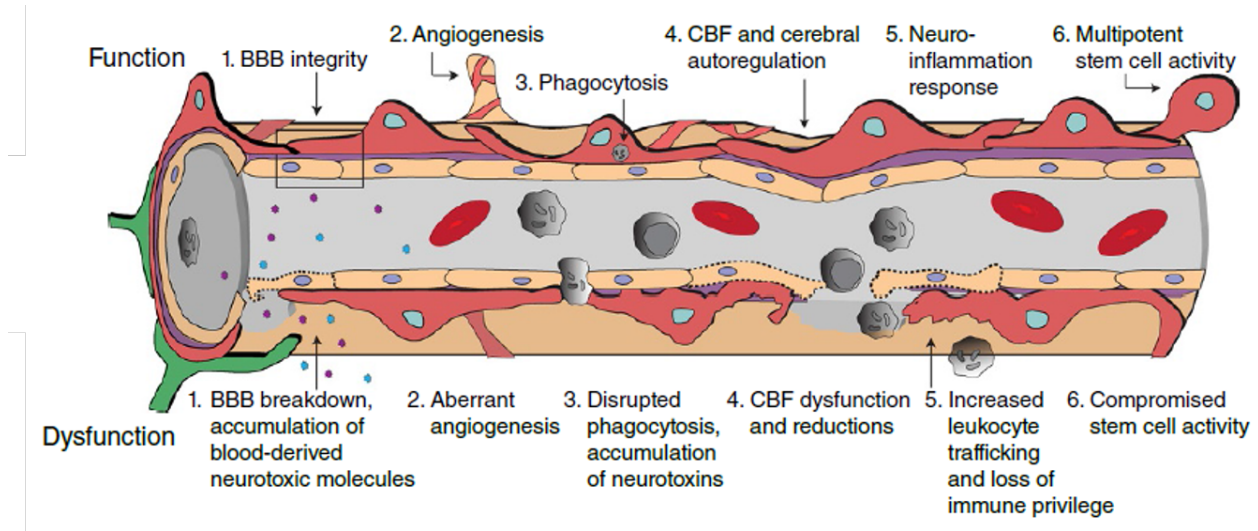
**Figure 1.5 – Trois images de microscopie électronique à balayage de segments de capillaires du SNC du rat (a à c) ainsi que quatre dessins illustrant l'association structurale des péricytes avec les microvaisseaux (d à g).**

Le motif commun est le péricyte (en vert sur les schémas) entourant le capillaire avec de larges projections pratiquement continues qui couvrent une grande surface du microvaisseau (a, d). Le deuxième motif montre des péricytes s'enroulant autour du capillaire, mais la zone est plus définie et plus petite et les projections de péricytes ont la forme d'un doigt (b, c, e). Le troisième schéma est celui de la migration des péricytes (b, f). Ce schéma est principalement observé après une blessure et pendant les premiers stades de l'angiogenèse. Le quatrième motif montre que le péricyte est positionné longitudinalement de façon polaire le long du microvaisseau (g). Ce schéma peut refléter des péricytes migrant le long du vaisseau ou refléter des péricytes de transition. Ce modèle est observé aux jonctions artériolaires / capillaires et pendant l'angiogenèse. Reproduit et modifié avec permission de Springer Nature [50].

Jusqu'au début du 21<sup>e</sup> siècle, les ACs étaient considérés comme étant les cellules jouant un rôle

majeur sur les ECs dans la formation de la BHE. C'est en 2010 que Daneman *et al.* vont décrire le rôle capital des PCs pour cette fonction. En effet, ils démontreront que les ECs, lors de leur prolifération dans le SNC, vont recruter les PCs plus d'une semaine avant les ACs. Ils démontreront également que les PCs sont nécessaires, non seulement, à la formation de la BHE, mais que leur absence conduit à une barrière non viable [8]. Durant les 20 dernières années, de nombreuses preuves mettent également en avant la capacité des PCs à retourner à l'état de cellule souche pluripotente [18]. Les péricytes sont spatialement très proches des cellules endothéliales, ce qui influence ces dernières dans la production de nombreuses caractéristiques spécifiques à la BHE [14].

À l'heure actuelle, les recherches sur les PCs se concentrent majoritairement sur leur rôle au niveau de la BHE dans des conditions saines et pathologiques (Fig 1.6) [18], plus particulièrement dans les interactions qu'ils entretiennent avec les cellules adjacentes, qui sont majoritairement les ECs et les ACs.



**Figure 1.6 – Le rôle multifonctionnel des péricytes du SNC.**

Dans des conditions physiologiques (rangée du haut), les péricytes régulent (1) l'intégrité de la BHE c'est-à-dire, jonctions serrées ou adhérentes et la transcytose à travers la BHE ; (2) l'angiogenèse, c'est-à-dire le remodelage microvasculaire, la stabilité et l'architecture ; (3) la phagocytose, c'est-à-dire l'élimination des métabolites toxiques du SNC ; (4) Le flux sanguin cérébral ; et le diamètre des capillaires ; (5) la neuroinflammation, c'est-à-dire le trafic de leucocytes dans le cerveau ; et (6) l'activité des cellules souches multipotentes. Le dérèglement des péricyte (rangée du bas) est caractérisée par (1) une dégradation de la BHE provoquant une fuite de molécules neurotoxiques dérivées du sang dans le cerveau (par exemple, le fibrinogène, la thrombine, le plasminogène, le fer libre dérivé des érythrocytes et les anticorps anti-cerveau) ; (2) une angiogenèse aberrante, avec l'apparition de vaisseaux sanguins déficients ; (3) une phagocytose altérée provoquant une accumulation dans le SNC de neurotoxines ; (4) un dysfonctionnement du débit sanguin cérébral (DSC) et une obstruction capillaire ischémique ; (5) l'augmentation du trafic de leucocytes favorisant la neuroinflammation ; et (6) une altération de la capacité des cellules souches à se différencier en cellules neuronales et hématopoïétiques. La dysfonction des péricytes est présente dans de nombreuses conditions neurologiques et peut contribuer à la pathogenèse de la maladie. Reproduit et modifié avec permission de Springer Nature [18].

Les PCs régulent l'expression des jonctions serrées par la sécrétion de différents facteurs, tels que le facteur de croissance transformant bêta-1 (*transforming growth factor-beta1*, TGF  $\beta$ 1), le facteur neutrophique dérivé des cellules gliales (*glial cell-derived neutrophilic factor*, GDNF), et l'angiopoïétine 1 (*angiopoietin 1*, ANG 1) [14]. Les PCs jouent également un rôle dans la régulation de l'angiogenèse et la stabilité vasculaire durant le développement ou les phases de remodelage chez l'adulte [15]. Ils exercent aussi le rôle de macrophages en éliminant les débris cellulaires et certaines protéines telles que l'amyloïde  $\beta$  [51]. Les PCs contribuent à la régulation du flux sanguin en contrôlant le diamètre des capillaires [16]. Dans les mécanismes d'inflammation, il

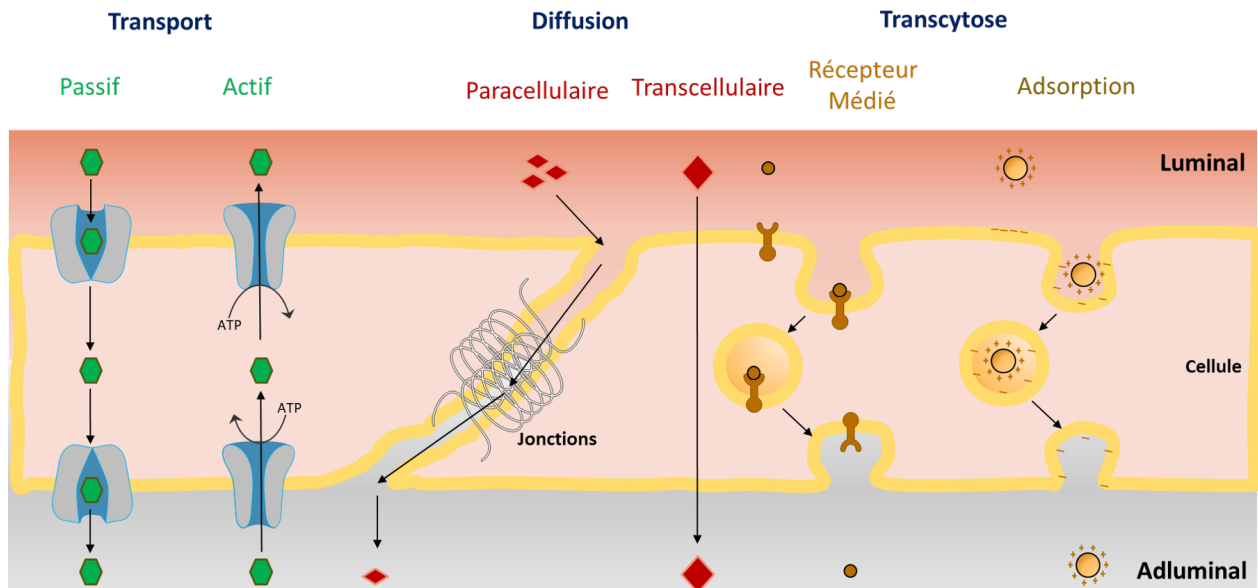
semblerait que les PCs contribuent aux signaux inflammatoires en contrôlant par exemple, l'entrée des leucocytes dans le SNC [17]. La dernière fonction des PCs découverte plus récemment serait leur capacité à former des cellules souches qui peuvent être, à nouveau, différenciées en cellules neuronales ou en lignées vasculaires [52]. La méthode d'imagerie la plus récente est la microscopie à deux photons qui permet de suivre *in vivo* l'évolution de marqueurs fluorescents. Cette méthode a permis de confirmer certaines hypothèses qui ont été observées la première fois *in vitro* [15]. Cependant, la plupart des connaissances a été acquise majoritairement par l'étude des PCs *in vitro* [53].

L'isolation des PCs a également été décrite dans les années 70, plus exactement en 1975 pour les PCs de la rétine [54] mais seulement en 1996 pour les PCs du SNC [55]. Les PCs sont isolés chez le rat adulte. L'isolation consiste en une extraction des microvaisseaux du cerveau, une homogénéisation du tissu, une séparation par gradient, suivie d'une à plusieurs filtrations. Les vaisseaux sont ensuite digérés avec une solution de collagénase pendant 24 h. Pour éliminer les ECs de la suspension cellulaire, le support de culture est du plastique seul sans revêtement et le milieu contient seulement 10 % de sérum. Ces conditions sont en effet défavorables à la croissance des ECs. De plus, les cellules ont seulement entre 4 et 6 h pour adhérer, à la suite de quoi les cellules en suspension sont jetées [55, 56]. En 2012, Tigges *et al.* démontrent que l'on peut également enrichir une culture de PCs par passages successifs d'une culture d'ECs. Cette méthode donne un très bon rendement, mais nécessite plusieurs semaines de culture pour atteindre une culture enrichie [57]. Il est communément accepté maintenant que les PCs sont positifs pour le récepteur au facteur de croissance bêta dérivé des plaquettes (*platelet-derived growth factor receptor beta*, PDGFR $\beta$ ), ainsi qu'à l'antigène neural/glial 2 (*Neural/Glial antigen 2*, NG2), la desmine et le signal 5 régulateur de la protéine G (*regulator of G protein signaling 5*, RGS5). Les PCs seront, par contre, faiblement positifs voir négatifs à l'actine alpha des muscles lisses (*alpha smooth muscle actin*, SMA) [58]. De plus, un autre marqueur tel que la protéine 1 spécifique des fibroblastes (*fibroblast-specific protein 1*, FSP1) est considéré comme étant négatif pour les péricytes [59]. Enfin, le colorant fluorescent NeuroTrace 500/525 a été utilisé pour marquer les péricytes chez la souris [39]. Les PCs partagent également certains marqueurs, telle que la molécule d'adhésion des cellules du mélanome (*melanoma cell adhesion molecule*, MCAM, CD146), avec les ECs [58].

### 1.2.3 Les cellules endothéliales

Nous avons vu précédemment que, très tôt, les chercheurs ont catégorisé les ECs de la BHE à part des ECs du reste de l'organisme [5]. Les ECs étant des cellules polarisées, la membrane du côté luminal/apicale (qui fait face au sang) n'est pas composée de la même densité de transporteurs et de récepteurs que la face abluminale/basolatérale. De façon générale, le passage au travers de la BHE et des membranes peut être décrit en trois grandes voies principalement liées aux caractéristiques

intrinsèques des ECs (Fig 1.7).



**Figure 1.7 – Les mécanismes de transport au travers de la BHE**

Les transporteurs sont classés dans deux grandes catégories, les transporteurs actifs consommant de l'ATP et les transporteurs passifs. Le mécanisme de diffusion est lorsque les molécules traversent passivement entre les cellules (paracellulaire) ou à travers les cellules (transcellulaire). La transcytose est le mécanisme par lequel la membrane va s'invaginer pour former un endosome qui pourra traverser la cellule. Ce mécanisme peut être déclenché par un récepteur ou par adsorption.

**La diffusion.** Cette voie est la plus simple et ne requiert pas d'énergie. Les cellules endothéliales ne possédant pas de fenestration, cette voie est donc limitée aux molécules de petite taille, généralement inférieures à 600 Da. Selon le gradient de concentration, la molécule diffusera passivement entre les cellules (voie paracellulaire) ou au travers de la membrane (voie transcellulaire). La voie paracellulaire est régulée par la présence des jonctions serrées, alors que la voie transcellulaire sera limitée par la présence de transporteurs à efflux.

**Le transport.** Cette voie utilise la présence de protéines transmembranaires pour faciliter, ou activement déplacer, des molécules de part et d'autre de la membrane. Les transporteurs sont spécialisés et ne déplacent que certaines molécules, protéines et acides aminés (AAs) spécifiques. Le transport facilité ne consomme pas d'énergie et utilisera différents gradients d'ions pour permettre le passage des molécules. Le transport actif, quant à lui, consommera de l'ATP pour déplacer les molécules, mais contrairement au transport passif, il pourra également le faire contre le gradient de concentration.

**La transcytose.** Cette voie utilise des récepteurs (*receptor mediated transcytosis*, RMT) ou des

mécanismes d'adsorption pour déplacer majoritairement de gros objets ou protéines. La transcytose va déclencher un mécanisme d'invagination de la membrane cellulaire conduisant à une vésicule. La vésicule ainsi formée sera en mesure de traverser la cellule pour venir délivrer son contenu du côté basolatéral. Contrairement aux deux précédentes voies, les objets ainsi transportés ne rentrent pas en contact avec le cytoplasme de la cellule. Il est à noter que les ECs de la BHE expriment un nombre réduit de ces mécanismes comparés aux autres cellules du même type.

Dans cette section nous verrons en détails les différentes caractéristiques des ECs de la BHE qui les rendent si particulières.

### 1.2.3.1 Les principaux récepteurs

Les récepteurs qui induisent l'endocytose sont le mécanisme de transport utilisé majoritairement par les protéines les plus larges, telles que la transferrine (*transferrin*, Tf), l'insuline, et les lipoprotéines à faible densité (*Low-density lipoprotein*, LDL). De façon générale, le taux de transport en mole des peptides et des protéines utilisant des récepteurs est trois fois moins important comparé aux transports des larges acides aminés [60]. Il y a trois types de récepteurs ayant été décrits pour leurs propriétés à induire la transcytose [61].

**Le récepteur à la transferrine** (*Transferrin receptor*, TfR). La transferrine est une protéine plasmatique de 80 kDa qui possède plusieurs sites de fixation du fer, et elle est responsable de son transport au cerveau. Le récepteur de la transferrine est un homodimère transmembranaire composé de deux monomères identiques d'une masse d'environ 90 kDa. La région la plus grande est orientée à la surface de la cellule et est composée des résidus de 89 à 769 AAs. Ce site est sensible à la trypsine et contient le site de liaison à la transferrine. Ce récepteur va déclencher l'endocytose et la formation de vésicules recouvertes de clathrines. Le fer sera alors relâché dans le cytoplasme et le récepteur sera recyclé au niveau de la membrane [62]. La ferristatine est une petite molécule connue pour inhiber la TfR [63]. Ce récepteur est intensivement étudié pour le transport de molécules ou de nanoobjets à travers la BHE. Des anticorps anti-TfR, avec une affinité réduite pour le récepteur, ont été produits ; néanmoins, l'endosome produit par l'activation du TfR n'induit pas dans la majorité des cas la transcytose. Ceci est un facteur limitant pour atteindre le cerveau [61].

**Le récepteur à l'insuline.** L'insuline est une protéine jouant le rôle de régulateur de la glycémie. Au niveau du cerveau, elle exerce un rôle neuroprotecteur. Un changement en niveau d'insuline est lié aux maladies neurodégénératives, telles que l'Alzheimer ou Parkinson. Néanmoins, il semblerait que le récepteur à l'insuline ne soit pas le seul moyen par lequel l'insuline pénètre le cerveau [64]. Tout comme pour le TfR, des anticorps ont été développés pour induire l'endocytose de cargo auquel était greffé l'anticorps. Cependant, le récepteur à l'insuline est présent sur de nombreuses cellules. Lors du tout premier essai clinique utilisant cette voie, une hypoglycémie



transitoire a été observée [61]. Un inhibiteur sélectif de ce récepteur est le peptide S961, décrit en 2008 par Schaffer *et al.* [65].

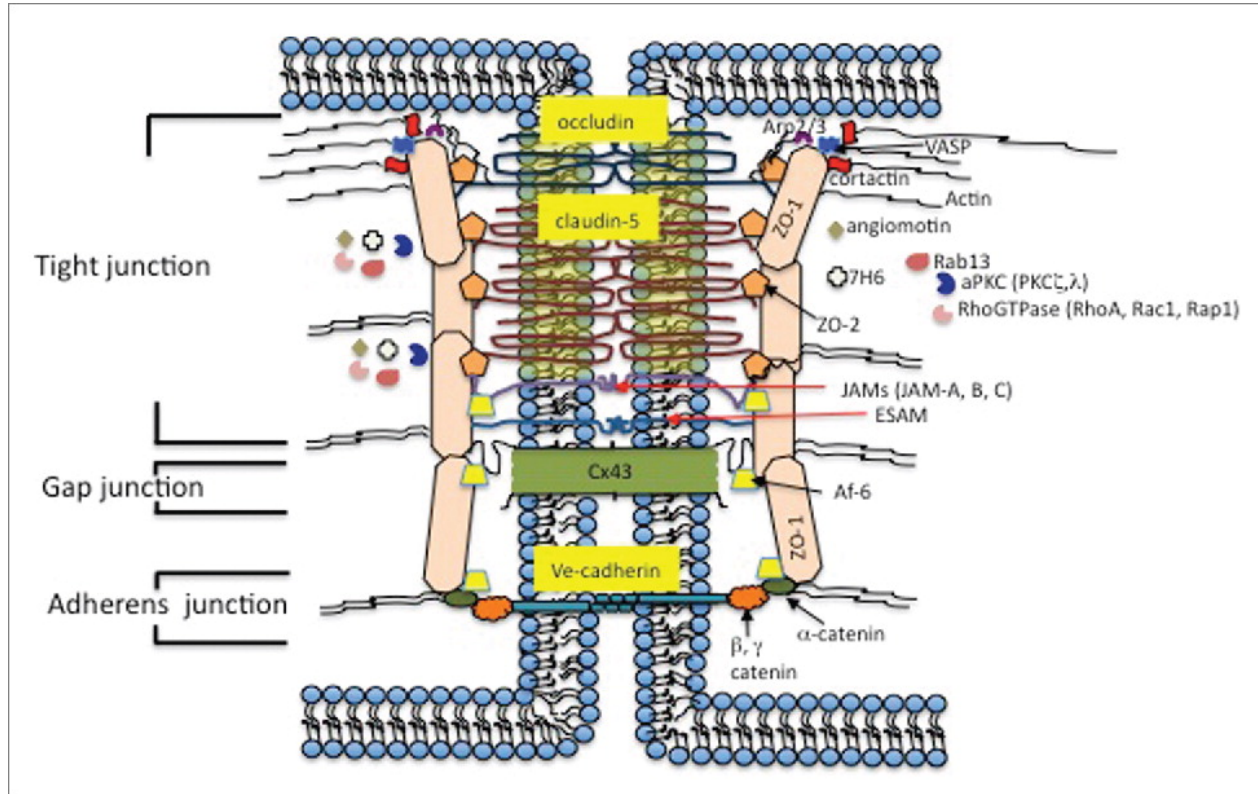
**Le récepteur aux lipoprotéines de faible densité** (*Low-density lipoprotein receptor*, LDLR). Ce récepteur est responsable de faire transiter les LDL contenant le cholestérol [66]. Le cholestérol est un composant capital pour la fluidité des membranes et joue un rôle dans les interactions entre molécules de signalisation par la création du radeau lipidique [67]. Le LDLR est une protéine transmembranaire dont le site de liaison des LDL est l'apo B-100. Ce récepteur est hautement régulé et verra sa présence diminuée si la cellule contient une grande quantité de cholestérol [68]. Lors d'hypercholestérolémie, la quantité de LDL augmente pour prendre en charge le cholestérol excédentaire présent dans le sang. Cette abondance de cholestérol peut conduire à une accumulation des LDL dans les cellules endothéliales qui seront alors oxydées et formeront des plaques conduisant à l'athérosclérose. Au niveau de la BHE, cela peut conduire à une augmentation de la perméabilité des molécules avec une haute masse molaire [67].

Finalement, une autre méthode a été employée pour trouver d'autres récepteurs induisant la transcytose. C'est le cas des anticorps à domaine unique (*Single domain antibodies*, sdAbs) FC5 et FC44 qui ont été développés pour leur capacité à déclencher la transcytose [61]. Ces deux sdAbs ont été obtenus en utilisant la méthode de mise en avant des phages (*phage displayed library*) [69], puis utilisés dans plusieurs études de perméabilité *in vitro* et *in vivo* [61]. C'est après leur découverte que le mécanisme ainsi que le récepteur impliqué a été trouvé ; il s'agirait du  $\alpha(2,3)$  — sialoglycoprotéin, exprimé du côté luminal des ECs [70].

### 1.2.3.2 Les principales jonctions

Les jonctions sont des structures protéiques permettant de lier les cellules endothéliales entre elles et aussi à la matrice qui les entourent. Les complexes formés par les jonctions sont des structures dynamiques qui changent pour répondre aux stimuli physiologiques et pathologiques. Les jonctions sont la première structure responsable de fermer l'espace entre les cellules. Par leur présence, le transport de part et d'autre des ECs est restreint. Ainsi, seules les molécules avec un faible rayon (de l'ordre de 3 nm) sont en mesure de diffuser passivement entre les jonctions. La perte des structures formées par les jonctions est une des causes ou des conséquences de nombreuses pathologies affectant le SNC. Les jonctions sont séparées en trois grandes familles : les jonctions serrées (*tight junctions*, TJs), les jonctions adhérentes (*adherens junctions*, AJs) et les jonctions communicantes (*gaps junctions*, GJs) (Fig 1.8). Les TJs et les AJs ferment le passage paracellulaire en formant des structures comparables à une fermeture à glissière. Les GJs permettent, quant à elles, la communication directe entre les cellules en formant des canaux par lesquels les molécules et les ions peuvent transiter [71].





**Figure 1.8 – Jonctions serrées, communicantes et adhérentes.**

Il y a trois familles de jonctions, les jonctions serrées (*Tight junction*), les jonctions communicantes (*Gap junction*) et les jonctions adhérentes (*Adherens junction*). Toutes ces jonctions sont directement connectées au cytosquelette de la cellule ou par l'intermédiaire de protéine d'ancrage. Reproduit et modifié avec permission de Taylor & Francis [72].

### Les jonctions serrées

Les jonctions serrées des cellules endothéliales de la BHE sont composées de protéines transmembranaires qui vont venir interagir avec les jonctions des cellules adjacentes, formant ainsi une structure anastomosée. Contrairement aux cellules épithéliales, les jonctions des ECs sont des barrières à part entière qui entraînent un repliement des membranes et scellent, en plus, l'espace entre les cellules. Ces protéines transmembranaires sont fixées dans le cytosquelette des cellules endothéliales par l'intermédiaire de protéines d'ancrages [72].

La première grande famille de jonctions serrées sont **les claudines**, avec les sous-catégories les plus étudiées qui sont les claudines-5, -3, -12 et -1. Ce sont des protéines comprises entre 20 et 24 kDa dont présentement 24 isoformes ont été identifiés. Chaque claudine est spécifique d'un type de tissu. Dans la BHE, la claudine-5 est la plus représentative. Ainsi, cette protéine est 1000 fois plus exprimée en termes d'ARN que les claudines-1, 3 et 12. L'absence de claudine-5 entraîne la mort des animaux pour cause d'œdème [73, 74]. La claudine-3 jouerait un rôle dans le

développement embryonnaire et postnatal de la BHE, mais son expression est par la suite réduite chez l'adulte. Cependant, il semblerait que l'absence de claudine-3 n'introduise pas de modification de la BHE [75]. La claudine-1 aurait une structure proche des claudines-3 et -5 et interagirait avec ces dernières. Quant à la claudine-12, très peu d'homologie a été trouvée avec les autres membres de la famille des claudines. Les claudines-1 et -12 sont considérées comme pouvant être induites en réponse à différentes contraintes. Ainsi, la claudine-12 a été la seule claudine à être surexprimée dans les souris déficientes en claudine-5 [72].

**L'occludine** est la deuxième jonction serrée la plus importante mais la première à avoir été décrite. Contrairement à la claudine-5, les souris déficientes en occludine ne présentent pas de BHE avec une perméabilité accrue et possèdent des jonctions serrées correctement exprimées. Cette observation semble impliquer que l'occludine ne jouerait pas un rôle direct dans l'étanchéité de la barrière mais plutôt un rôle de régulation. D'un point de vue structurel, l'occludine est composée de 4 domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires [76]. En effet, l'occludine interagirait avec la claudine-5, permettant l'organisation des brins de cette dernière. De plus, tout comme les claudines, l'occludine interagirait avec les protéines d'ancrage telles que la zonula occludine-1 et -2 (ZO-1, ZO-2), ainsi que l'actine, pour former les complexes de jonctions serrées [72].

La troisième grande famille de jonctions serrées sont **les molécules d'adhésion jonctionnelles** (*junctional adhesion molecules*, JAMs). Les JAMs font partie de la superfamille des protéines immunoglobulines. Contrairement aux claudines et à l'occludine qui possèdent plusieurs sous-domaines transmembranaires, les JAMs possèdent un seul domaine. Ils forment des interactions avec d'autres sous-familles de JAMs, tels que JAMs-A, -B, et -C. Leurs rôles sont la formation de tubules dans les complexes de jonctions, ainsi que la régulation de l'adhésion des leucocytes et leur migration à travers la barrière. L'absence de JAM-A ne semble pas induire une augmentation de la perméabilité à travers la BHE [77]. Les JAMs permettent également la polarisation des cellules en contrôlant la localisation de la ZO-1 et de l'occludine [76, 72].

La dernière famille, proche structurellement des JAMs, sont **les molécules d'adhésion sélective aux cellules endothéliales** (*Endothelial cell-selective adhesion molecule*, ESAMs). Les ESAMs seraient impliquées dans le développement vasculaire et l'extravasation des neutrophiles durant la première phase de l'inflammation mais ne seraient pas exprimées chez les cellules épithéliales [77, 72]. Leur absence chez la souris n'a pas causé d'augmentation de la perméabilité au niveau de la BHE [77].

Ces jonctions serrées sont ancrées au cytosquelette de la cellule par l'intermédiaire de complexes appelés **protéines d'échafaudage** (*scaffolding proteins*) qui font le lien entre les jonctions serrées et l'actine. Leur rôle est également de moduler les interactions entre les protéines en fonction des molécules signalées qui interagissent avec les protéines d'échafaudages [76]. Elles sont classées en deux catégories : celles contenant le domaine PSD95/Large Disk et zonula occludens

(PSD95/Disc Large and Zonula occludens, PDZ), et celles ne le contenant pas. Celles contenant le PDZ ont pour but de faire le lien entre les différentes jonctions serrées et le cytosquelette, ainsi que de les localiser à des régions spécifiques de la membrane plasmique. Parmi les protéines qui composent le PDZ, on retrouve la famille des zonula occludens (ZO)-1, -2 et -3 [78, 72].

### Les jonctions adhérentes

Les AJs partagent une organisation similaire avec les jonctions serrées. Sur les cellules endothéliales, elles sont généralement plus proches du côté basolatéral. Les AJs, dont la famille principale est les cadhérines, contiennent des protéines transmembranaires. Elles vont s'ancrer dans la cellule directement en se liant aux protéines d'actine ou par l'intermédiaire de protéines d'échafaudages de la famille des caténines [72]. Les AJs, contrairement aux TJs, ont pour vocation de promouvoir la maturation, la maintenance, et la plasticité de la membrane endothéliale par les interactions qu'elles permettent entre les cellules adjacentes [79].

La protéine la plus importante dans les jonctions adhérentes des cellules endothéliales est **la cadhérine vasculaire endothéliale** (*Vascular endothelial cadherin*, VE-cadherin). La VE-cadhérine va interagir avec les filaments d'actine par l'intermédiaire des protéines d'échafaudages  $\beta$ -caténines et  $\gamma$ -caténines [72]. Dans la même famille, on retrouve la N-cadhérine qui sera exprimée dans d'autres types cellulaires, là où la VE-cadhérine est exclusivement exprimée dans les cellules endothéliales. La VE-cadhérine joue un rôle dans la communication entre cellules endothéliales. Son absence, tout comme la claudine-5, introduit une mortalité prématurée des embryons. Chez la souris adulte, le blocage de la VE-cadhérine par un anticorps dirigé contre elle introduit des altérations de l'angiogenèse et un dysfonctionnement du système vasculaire. Cet effet est amplifié et entraîne la mort des animaux dépourvus d'ESAM [77]. Cela démontre l'importance de la VE-cadhérine dans le fonctionnement des vaisseaux, et plus particulièrement son rôle dans la formation et le maintien des structures des jonctions serrées. Son absence entraîne également un réarrangement des TJs au niveau de la BHE [80].

Dans la catégorie des AJs, on trouve également, même si sa classification est encore controversée, **la molécule d'adhésion endothéliale plaquettaire** (*platelet endothelial adhesion molecule*, PECAM) [81] qui, tout comme les JAMs, fait partie de la superfamille des immunoglobulines. Son existence a été mise en évidence par le fait que les leucocytes adhèrent aux cellules endothéliales par l'intermédiaire de PECAM. De plus, PECAM ne semble pas être liée aux propriétés d'étanchéité de la barrière car il a été démontré *in vivo* que la perméabilité du bleu Evans n'était pas augmentée sur des souris knock-out [77]. Néanmoins, PECAM est surtout étudiée pour son rôle ambivalent dans l'inflammation, à la fois comme modulateur positif et négatif de la réponse inflammatoire [82].

### Les jonctions communicantes

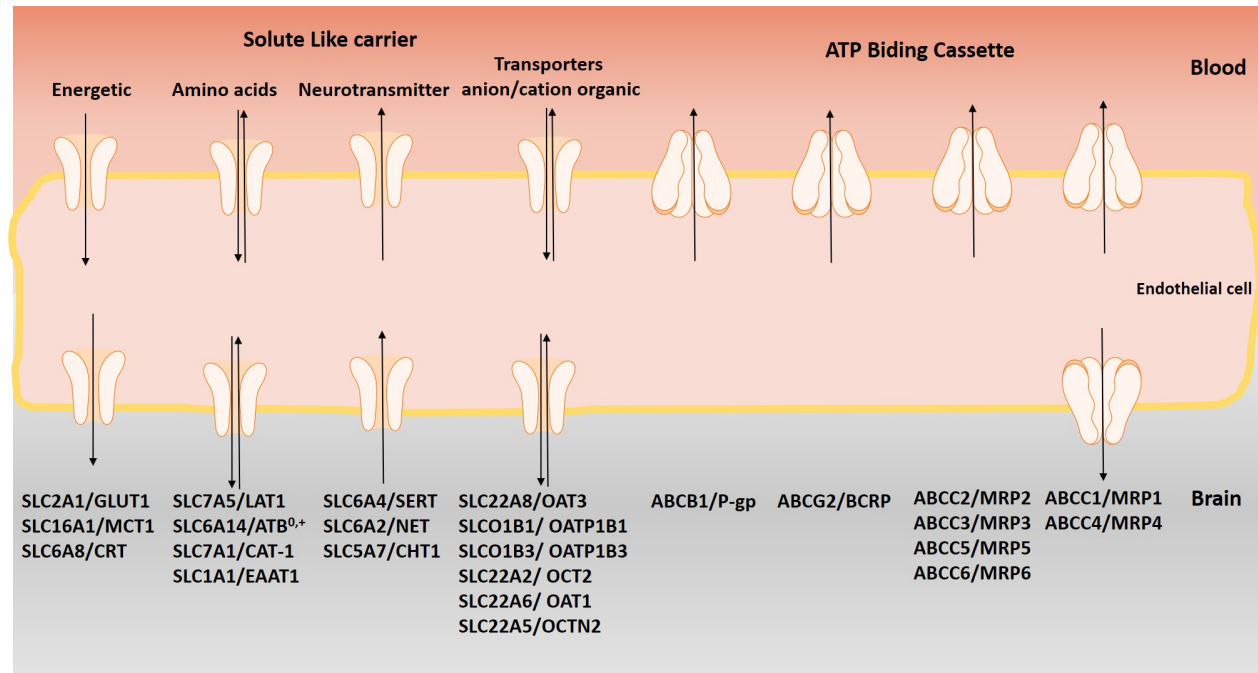
Les GJs sont principalement formées de protéines de la famille des **connexines** (*connexin*, Cx) contenant 21 isoformes. Ces protéines sont exprimées spécifiquement dans chaque type cellulaire, mais plus de la moitié d'entre elles sont exprimées dans le cerveau [83]. Dans le cas des cellules endothéliales de la BHE, on retrouve majoritairement les Cx37, Cx40, et Cx43. Les Cx forment des canaux aqueux peu sélectifs qui se connectent aux Cx des cellules adjacentes et leur rôle principal est la communication entre cellules [72]. La formation des GJs est dépendante de la présence des TJs, mais également des protéines d'ancrage, telles que la ZO-1. Ce type de connexion, dont la Cx43 est la plus étudiée dans les ECs de la BHE, permet la circulation de molécules telles que l'ATP, ou encore d'information telle que des brins de microARN [84]. Cette fonction est également utilisée par le virus de l'immunodéficience humaine pour faire circuler de l'information génétique entre les cellules [85]. Le fonctionnement des Cx est relié à la concentration intra- et extracellulaire de  $Ca^{2+}$ , la présence de radicaux libres, ainsi qu'aux différents types de stress cellulaire (ischémie, cisaillement du fluide, inhibition métabolique). Le rôle précis des Cx au niveau de la BHE est moins connu que pour les cellules gliales ; néanmoins plusieurs études tendent à montrer que les Cx exerceraient une fonction dans la propriété de barrière de la BHE. En effet, le blocage de la Cx43 et les modulations de la concentration intracellulaire de l'ion calcium entraînent une augmentation de la perméabilité [83].

Comme nous avons pu le voir, les TJs ont été principalement étudiées car elles sont principalement responsables de la nature étanche de la BHE. Néanmoins, les études semblent démontrer que le rôle des TJs est supporté par la présence des AJs et les GJs dans la formation de la BHE. Le transport paracellulaire étant plus que limité, les ECs de la BHE possèdent de nombreux transporteurs afin de réguler finement les échanges entre le sang et le cerveau.

#### 1.2.3.3 Les principaux transporteurs

Les deux grandes familles de transporteurs que l'on trouve au niveau de la BHE, exprimées par les ECs, sont les transporteurs de soluté (*Solute carrier*, SLC) et les transporteurs en cassette liant l'ATP (*ATP-binding cassette*, ABC) (Fig 1.9). Ces familles de transporteurs ont pour but de fournir les nutriments nécessaires au bon fonctionnement du SNC mais également d'éliminer des métabolites et autres xénobiotiques [86, 87]. Les SLCs sont responsables du déplacement des substrats énergétiques tels que le glucose, les monocarboxylates, la créatine, les acides aminés, les neurotransmetteurs et leurs précurseurs, ainsi que les ions. Les SLCs fonctionnent majoritairement dans le sens luminal à basolatéral [87], alors que les ABCs fonctionnent dans le sens inverse. Ils transportent leurs substrats du SNC et de l'intérieur des cellules vers le côté luminal dans la circulation sanguine. La famille des ABCs contient majoritairement des transporteurs dits à efflux qui recon-

naissent : le cholestérol, les lipides, les xénobiotiques (dont de très nombreux principes actifs), des métabolites, des anions, des molécules conjuguées et pour finir des stéroïdes [86]. Les ABCs transporteurs font l'objet de nombreuses études car certains membres de cette superfamille de transporteurs sont responsables d'une grande majorité des échecs thérapeutique dans le traitement des maladies du SNC [81].



**Figure 1.9 – Les transporteurs de la BHE.**

Figures reprenant les principaux transporteurs de la BHE de la famille des transporteurs de solutés (SLC) et des transporteurs en cassettes liant l'ATP (ABC) transporteurs. De haut en en bas et de gauche à droite. GLUT1 : transporteur glucose 1 ; MCT1 : transporteur monocarboxylate 1 ; CRT : transporteur de la créatine ; LAT1 : transporteurs des acides aminées L 1 ; ATB<sup>0+</sup> : transporteur d'acide aminé neutre ; CAT1 : transporteur d'acide aminé cationique ; EAAT1 : transporteur d'acide aminés excitateurs ; SERT : transporteur de la sérotonine ; NET : transporteur de la norépinephrine ; CHT1 : transporteur de la choline 1 ; OAT : transporteur d'anion organique ; OATP : transporteur de polypeptide organique ; OCT : transporteur de cation organique ; OCTN2 : transporteur de cation/carnitine organique ; P-gp : P-glycoprotéine ; BCRP : la protéine de résistance au cancer du sein ; MRP : protéine de résistance multiple.

### Les transporteurs de soluté (SLC)

La famille des SLCs est encodée par plus de 300 gènes identifiés et comporte plus de 52 sous-familles. Comme mentionné précédemment, cette famille transporte majoritairement des composés polaires hydrophiles [87]. Ces transporteurs sont présents sur la majorité des cellules du fait de la nature des substrats qu'ils transportent. Le fonctionnement de ces protéines est majoritairement du

transport facilité lié aux gradients électrochimiques produits par des ions tels que le sodium (Na) ou l'hydrogène (H), mais aussi directement par le gradient du soluté [88]. Les SLCs sont souvent décrits et regroupés selon leur substrat. Nous décrirons ici les 4 grands groupes de SLCs.

**Les SLC transporteurs de substrat énergétique.** Dans cette catégorie, on retrouve le transporteur du glucose, le SLC2A1, également appelé GLUT1. Ce transporteur, présent dans toutes les cellules, fut le premier identifié. Le cerveau étant l'organe qui en consomme le plus, les études ont montré que les ECs de la BHE exprimaient en grande quantité ce transporteur et dans une moindre mesure la GLUT2 et 3 [89]. L'expression et la localisation de ce transporteur varient d'une espèce à l'autre mais on retrouve majoritairement cette protéine du côté basolatéral. Le transport semble être régulé par un gradient de  $\text{Ca}^{2+}$ . De plus, la GLUT1 peut transporter la forme oxydée de la vitamine C ainsi que certains sucres modifiés. D'autres formes de substrat énergétique peuvent être utilisées par le cerveau ; c'est le cas de la cétone ou encore du lactate. Dans ce cas, ce sont les transporteurs de la famille monocarboxylate (SLC16) qui seront en charge du transport. Le principal transporteur de cette famille est le transporteur monocarboxylate 1 (MCT1, SLC16A1). Ce transporteur a également pour substrat le pyruvate ainsi que certaines chaînes courtes d'acide gras [88]. La dernière molécule utilisée comme substrat énergétique par le cerveau est la créatine. Son transporteur est codé par le gène SLC6A8 qui est traduit en transporteur de la créatine (CRT). Ce transporteur est, quant à lui, dépendant du couple  $\text{Na}/\text{Cl}^-$  pour fonctionner. Ces trois principaux transporteurs, lorsqu'ils sont absents, sont liés à des retards mentaux, l'épilepsie, ou encore des crises de convulsions [87].

Le SNC nécessite également la présence de nombreux acides aminés essentiels jouant un rôle majeur dans la synthèse des neurotransmetteurs. Ainsi, le transporteur le plus étudié est **celui des acides aminés L** (*L amino acid transporter 1*, LAT1, SLC7A5). Ce type de transporteur est présent des deux côtés de la cellule et est indépendant du gradient de sodium pour fonctionner. Ce transporteur est responsable du transit d'acides aminés neutres, tels que la L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), cruciale dans le traitement de la maladie de Parkinson. De façon générale, les acides aminés essentiels sont majoritairement transportés du sang vers le cerveau, et c'est l'inverse pour les acides aminés non essentiels. D'ailleurs, la concentration plasmatique en acides aminés est de 10 à 20 fois plus élevée dans le sang que dans le cerveau, ce qui implique une grande quantité de transporteurs sodium dépendant du côté adluminal des cellules. On peut citer **le transporteur d'acides aminés à large spectre** (ATB<sup>0</sup>, SLC6A14), **le transporteur d'acides aminés cationique** (CAT-1, SLC7A1), et **les transporteurs d'acides aminés excitateurs** (excitatory amino acid transporters, EAAT1, 2 et 3, SLC1A1, 2 et 3).

La régulation de certains neurotransmetteurs ou de leurs précurseurs peut être attribuée aux transporteurs de la famille des SLCs. Ainsi, le glutamate, qui est un exciteur du système neurologique, peut entrer dans le SNC par l'intermédiaire des **transporteurs EAATs**. L'antagoniste

du glutamate est l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA), ce dernier peut également être transporté du cerveau au sang par l'entremise des transporteurs GAT1, 3 et 4. *A contrario*, les acides aminés L-tyrosine et le tryptophane, tous deux précurseurs respectivement des catécholamines (tel que l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine) et de la sérotonine, peuvent pénétrer le SNC par l'intermédiaire de la LAT1 et l'ATB<sup>0</sup>. La sérotonine est également substrat d'un transporteur (SERT, SLC6A4) ainsi que la norépinephrine (NET, SLC6A2). Il est intéressant de noter que seul le SERT est présent des deux côtés de la cellule, alors le NET semble l'être seulement du côté basolatéral. Le dernier précurseur est la choline, utilisée dans la synthèse de l'acétylcholine dont le transporteur est la CHT1 (SLC5A7). Les ECs de la BHE sont donc composés de transporteurs capables de moduler l'homéostasie des neurotransmetteurs en éliminant ou en captant au cerveau le glutamate, le GABA, la sérotonine, ainsi que la norépinephrine du cerveau au sang et vice versa.

La dernière grande famille est celle des SLC22 codant pour **les transporteurs des anions organiques** (OAT) ainsi que des cations organiques (OCT). L'une des plus connues est l'OAT3 (SLC22A8) qui est présente du côté luminal et basolatéral. Ce transporteur, majoritairement d'efflux, est en mesure de débarrasser le cerveau des métabolites de la dopamine et de la sérotonine. Néanmoins, sa présence des deux côtés de la membrane en fait une cible thérapeutique potentielle intéressante [89]. Proche structurellement de la famille des SLC22s, on retrouve les SLC21s, qui codent pour **des transporteurs de polypeptides anioniques** (*organic anion transporting polypeptide*, OATP). Tout comme l'OAT3, l'OATP-A est présent des deux côtés de la membrane cellulaire, et il a été reconnu pour être un transporteur d'efflux pour les métabolites tels que les glucuronides sulfates et le glutathion conjugué. De plus, les agonistes aux récepteurs  $\delta$ -opioïde, tels que l'acide valproïque utilisé dans le traitement de l'épilepsie, en sont également substrat. Du côté **des transporteurs cationiques**, l'OCTN2, SLC22A5 a démontré *in vitro* sa capacité à transporter l'antibiotique  $\beta$ -lactame. Cette famille de transporteurs est ambivalente : elle est à la fois responsable d'éliminer du cerveau certains métabolites, mais elle possède également de nombreux transporteurs d'influx capables de transporter certains composés du sang au cerveau et donc d'être utilisée comme porte d'entrée pour le SNC [87].

Les SLCs jouent principalement un rôle de soutien dans l'homéostasie du SNC. De nombreux transporteurs ont été identifiés comme facilitant l'apport de nutriments essentiels. Néanmoins, comme on a pu le voir avec les SLC22s, les transporteurs d'anions et de cations organiques, ce rôle est plus ambigu car ces derniers semblent pouvoir transporter des molécules du cerveau au sang. D'un point de vue du développement du médicament, la classe de transporteurs la plus problématique reste tout de même la famille des ABCs.

### Les transporteurs en cassette liant l'ATP (ABC)

La famille des ABCs est la plus étudiée car elle contient de nombreux transporteurs d'ef-

flux. Deux transporteurs et une famille de transporteurs sont responsables du transport d'un grand nombre de composés des ECs vers le sang, limitant ainsi l'accès des composés au SNC. Chez l'humain, 48 transporteurs ABCs ont été identifiés et classés en 7 familles de ABC-A à ABC-G. C'est parmi ces 7 familles de transporteurs que l'on retrouve la protéine associée à la résistance des médicaments-1 plus communément appelée P-glycoprotéine (MDR1, P-gp, ABCB1). Une autre protéine très importante dans la protection du cerveau est celle de la résistance du cancer du sein (*Breast cancer resistance protein*, BCRP, ABCG2). Tout comme la P-gp, la BCRP reconnaît un très grand nombre de substrats dont la majorité d'entre eux sont des xénobiotiques, et bien souvent des molécules thérapeutiques destinées au SNC. La dernière famille souvent étudiée de transporteurs d'efflux reconnaissant un grand nombre de médicaments est constituée des protéines associées à la résistance multiple (*multi-resistance protein*, MRP, ABCC). Physiologiquement, dans le même esprit que certains transporteurs de la famille des SLCs, les ABCs transporteurs décrits plus haut ont la charge de protéger le cerveau. Néanmoins, le spectre des molécules que ces protéines transportent est un obstacle majeur dans le développement de médicament. En effet, de nombreuses molécules développées contre les tumeurs cérébrales, pour le traitement de l'épilepsie, certains troubles psychiatriques, la maladie d'Alzheimer, ou encore de Parkinson, ne sont pas en mesure de traverser la BHE à cause de la présence de ces transporteurs [86]. Nous allons par la suite décrire en détail la P-gp, la BCRP, ainsi que les MRPs.

**La P-gp** est exprimée dans un grand nombre de cellules formant une barrière épithéliale, telles que les cellules hépatiques, rénales, intestinales, placentaires et endothéliales cérébrales. La P-gp est également présente dans une moindre mesure chez les péricytes, les astrocytes, et les neurones. Au niveau des ECs de la BHE, la P-gp est majoritairement exprimée du côté luminal des cellules mais la quantité de protéines présentes à leur surface varie d'une région à l'autre du cerveau [86]. La P-gp est une protéine composée de 12 domaines transmembranaires, pour une masse totale de 170 kDa [88]. Il est maintenant bien établi que la P-gp limite l'accumulation de substrats intracellulaires et facilite également le transport de substrats produits par la cellule, ainsi que les déchets métaboliques [90]. L'importance de la P-gp liée à la résistance des médicaments a été démontrée lorsque des animaux dépourvus de P-gp se retrouvaient avec une concentration vingt fois supérieure dans le cerveau en ivermectine, digoxine, ou encore en nelfinavir comparés aux animaux naïfs [91]. Depuis cette étude, c'est plus de 300 composés pharmacologiques qui ont été identifiés comme substrats de la P-gp [90]. De nombreuses stratégies ont été développées afin d'inhiber la P-gp, car, en plus de bloquer de nombreux traitements destinés au cerveau, certaines tumeurs développent des résistances en surexprimant la P-gp [90, 81]. C'est dans ce contexte que 7 brevets pour des inhibiteurs ont été déposés entre 2011 et 2018, afin de moduler l'activité de la P-gp. Il est intéressant de noter que le vérapamil, qui est un des premiers substrats de la P-gp décrit, est encore utilisé aujourd'hui dans des études *in vitro* afin d'évaluer si les nouvelles molécules développées



en sont également le substrat [92].

**La BCRP** est plus petite que la P-gp, avec une masse de 72 kDa. Contrairement aux autres transporteurs ABCs, la BCRP n'est qu'un demi-transporteur qui contient seulement un site de liaison et 6 domaines transmembranaires [88]. Ce transporteur est également présent sur de nombreuses cellules et son rôle principal est également la protection des différents tissus en déplaçant de nombreux composés endogènes et xénobiotiques du tissu vers le sang. De très nombreuses molécules qui sont substrats de la BCRP le sont également pour la P-gp, ainsi que certaines MRP [86]. Néanmoins, ces résultats sont controversés. En effet, la mitoxantrone a une concentration dans le cerveau augmentée chez des animaux traités avec un cocktail d'inhibiteurs pour la P-gp et la BCRP. Cependant, lors de l'utilisation d'animaux n'exprimant par la BCRP, la concentration de la molécule n'était pas différente de celle des animaux naïfs [88]. Tout comme la P-gp, plusieurs inhibiteurs ont été trouvés pour la BCRP, comme par exemple l'acrylonitrile, plusieurs antiviraux utilisés contre le VIH (l'iopinavire, la nelfinavire, la delavirdine, l'efavirenz, et la saquinavir), ainsi que de très nombreuses molécules de la famille des flavonoïdes [93].

La dernière famille de transporteurs connue pour être impliquée dans les propriétés imperméables de la BHE sont **les protéines associées à la résistance multiple** (*multi-resistance protein*, MRP). Cette famille est composée de 9 isoformes identifiés dont les membres les plus étudiés sont les MRP1 à 6 (ABCC1 à 6). Contrairement à la P-gp, les MRPs ont un profil plus restrictif des substrats qu'elles prennent en charge. De façon générale, il est encore difficile de séparer précisément les propriétés et le fonctionnement des 9 isoformes, dont plusieurs d'entre elles ont les mêmes substrats [88]. La MRP1 possède de nombreux substrats en commun avec la P-gp et la BCRP. Contrairement à ces dernières, la MRP1 est majoritairement exprimée du côté basolatéral des ECs. Cependant au niveau de la BHE, il semblerait que la MRP1 soit exprimée de part et d'autre de la cellule [86]. Les MRP2, 3 et 6 sont très proches structurellement de la MRP1 et se retrouvent également au niveau de la BHE. La MRP4 est différente des autres MRPs car elle est composée de seulement deux domaines transmembranaires. De plus, la MRP4 possède moins de substrats en commun que peuvent en avoir les MRP1, 2 et 3. La MRP5 semble posséder le plus de substrats en commun avec la MRP4 [88].

Nous avons vu que la plupart des transporteurs de la famille des SLCs ainsi que des ABCs, sont en mesure d'interagir avec un très grand nombre de médicaments. À l'heure actuelle, l'agence de réglementation de la nourriture et des médicaments américaine (*Food and Drug Administration*, FDA) ainsi que l'agence européenne du médicament (*European Medicines Agency*, EMA) recommandent d'identifier si les médicaments développés sont substrats de certains des transporteurs. Nous trouvons dans cette liste les transporteurs suivants : la P-gp (ABCB1), OATP1B1 (SLCO1B1), OATP1B3 (SLCO1B3), OCT2 (SLC22A2), OAT1 (SLC22A6), OAT3 (SLC22A8) et

BCRP (ABCG2) [94, 95]. Il est à noter que, présentement, les agences ne demandent pas encore d'identifier l'impact de certaines MRPs, telles que la MRP1, dont les études tendent à démontrer de plus en plus l'importance [81, 86, 88].

#### 1.2.3.4 Isolation des cellules endothéliales

Les premières isolations des ECs utilisées comme modèle pour l'étude de la BHE ont été obtenues à partir des années 70 [8]. Depuis, de très nombreux protocoles ont été publiés pour différentes espèces telles que l'humain, la souris, le rat, le porc, le bovin, et le singe [96]. Bien que la méthode ait pu évoluer, les techniques de base restent toujours les mêmes. L'idée principale est d'isoler les capillaires cérébraux contenus dans le cerveau. La première étape consiste à réduire le tissu en plus petits morceaux à l'aide d'une réduction mécanique (utilisation d'une lame de scalpel ainsi que différentes tailles d'aiguilles) ou en utilisant des broyeurs de tissus. La deuxième étape consiste à séparer les capillaires de l'ensemble du tissu. La méthode la plus ancienne, mais encore utilisée pour certaines espèces telles que l'humain, consiste à filtrer le broyat au travers de filtres de différentes tailles, retenant ainsi les capillaires à la surface du filtre. Les méthodes plus récentes utilisent différentes digestions enzymatiques pour réduire le broyat tissulaire et séparer les capillaires de l'ensemble du tissu. La séparation des capillaires des autres constituants du cerveau est obtenue par une centrifugation différentielle. La dernière étape est l'ensemencement des capillaires obtenus dans un contenant en plastique (flasques, boîte de pétri, ou plaque contenant des puits) préalablement revêtu de collagène de type I ou IV. Dans les premiers protocoles, le milieu de culture était complété avec de la vincristine afin de sélectionner spécifiquement les cellules endothéliales des capillaires. Cette méthode est basée sur le fait que les ECs expriment de nombreuses P-gp à sa surface et qu'elles étaient donc capables de survivre à un traitement à la vincristine. À partir de 2005, à la suite de l'étude de Perrière *et al.* [97], la puromycine sera utilisée car elle produit de meilleurs résultats de pureté [98]. La pureté est calculée à partir du signal obtenu en quantifiant certains marqueurs spécifiques des cellules endothéliales. Les marqueurs les plus utilisés sont PECAM (CD31) et la VE-cadhérine qui sont des jonctions adhérentes que nous avons décrites précédemment. Le dernier facteur considéré comme spécifique aux ECs est le facteur Von Willebrand (VWF) [98, 99].

#### 1.2.4 Les autres éléments en lien avec la barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique est également supportée par d'autres types cellulaires, tels que les microglies et les neurones [30]. De plus, la BHE est composée de plusieurs matrices extracellulaires, la lame basale des ECs, et la membrane basale du parenchyme cérébral [100]. Les études se sont souvent concentrées sur les constituants principaux de la BHE tels que les ACs, les PCs, et les ECs que l'on a décrit précédemment. Néanmoins, à mesure que notre compréhension de

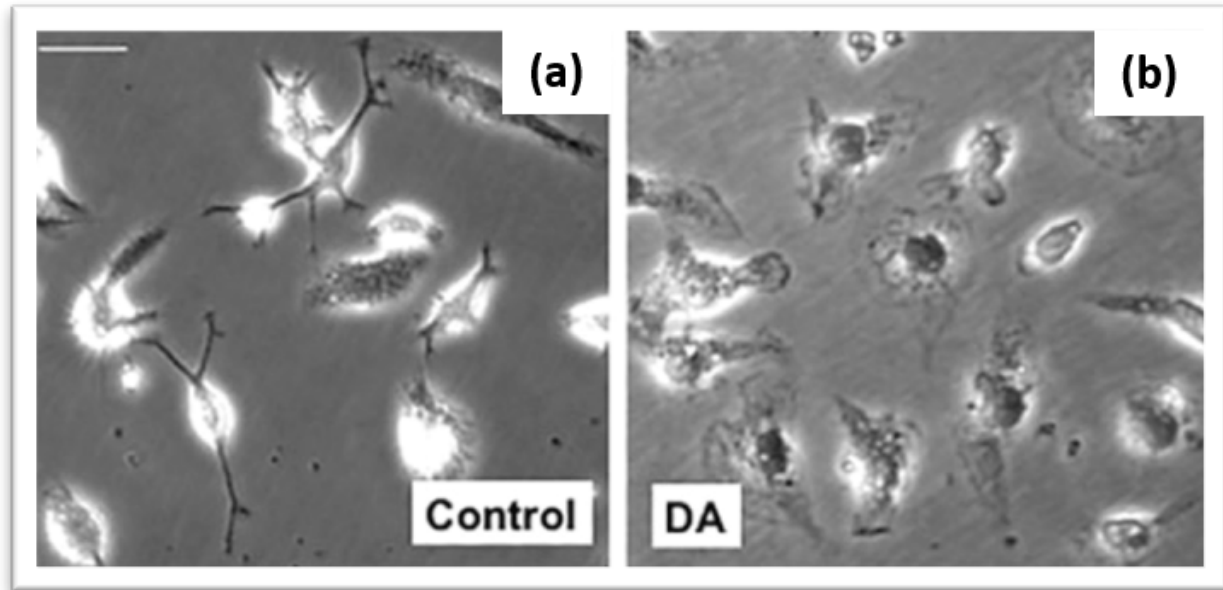
la BHE avance, d'autres mécanismes de fonctionnement sont mis en évidence. Nous verrons ici les connaissances les plus récentes et l'impact qu'ont les microglies et les neurones, ainsi que les matrices extracellulaires, sur le fonctionnement de la BHE.

#### 1.2.4.1 Les autres types cellulaires

Les deux autres types cellulaires impliqués dans l'unité neurovasculaire qui comprend les cellules de la BHE sont les microglies et les neurones. Ces types cellulaires semblent jouer un rôle lors du développement de la BHE mais, une fois mature, cette dernière ne semble pas entretenir de lien direct avec les microglies et les neurones [101].

##### Les microglies

Les microglies sont distribuées dans tout le cerveau et en sont les principales cellules immunitaires. Elles s'activent principalement en réponse à une inflammation, un traumatisme, ainsi que dans certaines pathologies. Il s'agit de petites cellules présentant un noyau dense présentant une à plusieurs projections (Fig 1.10-a). L'activation des microglies se traduit par un changement de morphologie. Elles passent alors d'une structure très ramifiée à une structure amiboïde (Fig 1.10-b). De plus, les microglies activées vont produire des médiateurs pro-inflammatoires, tels que l'oxyde nitrique, le peroxyde d'hydrogène, et le TNF- $\alpha$  [96]. Étant donné leur nature proche des macrophages, les microglies vont phagocyter des cellules apoptotiques, des débris tissulaires, ou des bactéries [30]. L'activation des microglies, et plus précisément le fait qu'elles soient en mesure de produire des molécules inflammatoires, va impacter la BHE [88]. Ainsi, les microglies sont en mesure de modifier l'expression des jonctions serrées (ZO-1, claudine-5, occludine) et la perméabilité de la BHE [102]. Néanmoins, leur absence chez la souris ne produit pas de modification de la perméabilité de la BHE, ce qui indiquerait que les microglies ne semblent pas avoir de rôle dans le maintien des fonctions de la BHE [103] mais bien seulement dans les cas pathologiques [104]. Les microglies sont souvent identifiées par le fait qu'elles soient positives aux marqueurs de l'intégrine M alpha (CD11b) et intermédiaires ou négatives au marqueur de la protéine de la tyrosine phosphatase de type C (CD45) [98].



**Figure 1.10 – Changement de morphologie de microglies primaires de souris après activation par la dopamine.**

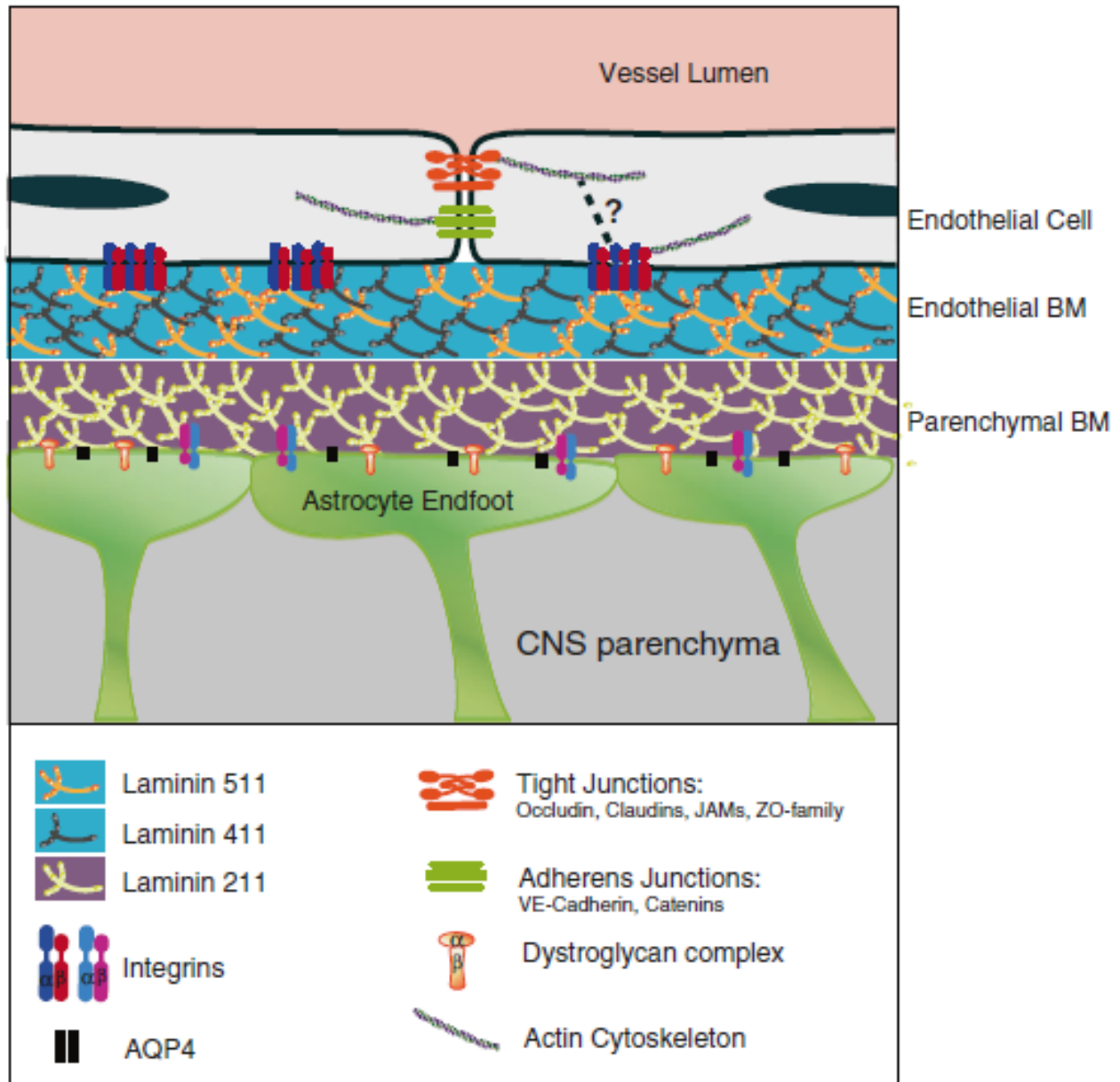
(a) Les cellules microgliales primaires présentent un petit corps cellulaire et de multiples processus. (b) Après un traitement à la dopamine (DA, 2  $\mu\text{m}$ ) pendant 30 min, elles ont acquis une morphologie aplatie et la surface des cellules est augmentée de manière significative, accompagnée d'une diminution du nombre de cellules ayant des projections multiples. Reproduit et modifié avec permission de Creative Commons Attribution License [105].

### Les neurones

Le cerveau contient plus de 180 zones composées de différents types de neurones dont certains sont uniques aux régions qu'ils occupent. De façon générale, les neurones du cortex sont catégorisés en deux classes : **les neurones excitateurs glutamatergiques** et **les neurones inhibiteurs GABAergiques** [106]. Lors du développement embryonnaire, les précurseurs neuronaux et les premiers neurones semblent être la source principale de facteurs favorisant la vascularisation et la formation de la BHE. Une fois la BHE mature, les neurones n'auront plus d'interaction directe avec les ECs de la BHE. La maintenance de la BHE semble seulement être reliée aux PCs et ACs comme nous avons pu le voir précédemment. Cependant, les ACs, en plus de moduler l'espace synaptique, sont également responsables de la transmission de l'information des neurones aux ECs, ce qui aurait pour effet d'influencer la physiologie de la BHE [101]. À l'heure actuelle, les neurones ne semblent pas avoir d'impact connu sur la maintenance de la BHE dans des conditions saines.

### 1.2.4.2 Les constituants non cellulaires

Les tissus qui forment les organes sont des assemblages plus ou moins complexes de différents types cellulaires. Afin de produire les différents agencements cellulaires nécessaires à la formation des tissus, les cellules sont supportées par une structure appelée la matrice extra-cellulaire (*extra cellular matrix*, ECM). Dans le cas de la BHE, on retrouve différents types de ECMs (Fig 1.11). La première ECM est la MB dans laquelle les ECs et les PCs seront enchâssées [101]. Cette structure, également appelée *basale lamina* (BL), est composée d'un réseau de collagène IV et un réseau de laminine. Ces deux réseaux sont liés entre eux par le protéoglycane de sulfate d'héparane, le perlécane, l'agrine, et le nidogène. La deuxième structure est la MB du parenchyme, qui permet l'adhésion des pieds astrocytaires à la structure formée par les ECs et les PCs. La MB du parenchyme présente la même structure que la BL, à quelques exceptions, comme le type de laminine présent. Dans le cas de la BL, les isoformes majoritaires seraient des laminines 511 et 411, alors que pour la MB du parenchyme, il s'agirait de la laminine 211. C'est d'ailleurs la laminine qui serait utilisé comme point d'ancrage par les ECs et les pieds des ACs. Les ECs exprimeraient 3 couples d'hétérodimères composés d'intégrines alpha et bêta et qui seraient également fixés au filament d'actine de la cellule. Les pieds astrocytaires exprimeraient seulement une paire d'intégrines alpha et bêta ainsi que des complexes de dystroglycane. L'absence de collagène IV entraîne la mort prématurée des animaux. De plus, toute modification génétique dans la structure des chaînes de collagène ou de laminine entraîne une déstabilisation de la BHE [100].



**Figure 1.11 – Représentation schématique des membranes basales.**

Les membranes basales sont composées de différents types de laminines. Les intégrines et les complexes de dystroglycane servent d'ancrage aux cellules. Reproduit et modifié avec permission de Springer Nature [100].

## 1.3 La barrière hémato-encéphalique dans un contexte d'inflammation

Le dysfonctionnement de la barrière hémato-encéphalique est ambivalent dans les pathologies associées au SNC. En effet, dans le cas des maladies telles que la sclérose en plaques, l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer, le dysfonctionnement de la BHE est suggéré comme étant la cause de la pathologie [1]. Alors que dans les maladies telles que les tumeurs et l'accident vasculaire cérébral, la BHE verra son fonctionnement altéré par la pathologie [107]. La BHE est également affectée par de nombreux facteurs environnementaux, comme le stress oxydatif, le déséquilibre hormonal ou encore le microbiote [108]. Ainsi, la liste des éléments ayant un effet direct sur l'intégrité de la BHE est régulièrement mise à jour. Parmi ces éléments, on peut citer les cytokines, les espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS), l'acide nitrique et les médiateurs vasoactifs [47]. Plus récemment, l'âge serait également une piste privilégiée pour expliquer une défaillance de la BHE. Plus précisément, les ECs deviendraient sénescents, ce qui se caractériserait par l'acquisition d'un phénotype sécrétoire pro-inflammatoire en réponse au dommage de l'ADN et autres stress cellulaires. Ceci pourrait être une des causes des maladies cérébrales liées à l'âge [109].

Un point commun des nombreuses maladies affectant le SNC est l'apparition précoce ou tardive d'événements inflammatoires, événements auxquels la BHE participe activement. Dans le cas des maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, Huntington, sclérose en plaque et sclérose latérale amyotrophique), il semblerait que ces maladies soient une conséquence de l'inflammation chronique. Cette inflammation chronique serait, quant à elle, liée au vieillissement des cellules neuronales qui induiraient une réponse neuronale inflammatoire. Cette inflammation chronique aurait pour effet d'activer et de faire proliférer les cellules gliales, conduisant à la libération de facteurs pro-inflammatoires [110]. Le signal induit par une condition pathologique, appelé motif moléculaire associé aux agents pathogènes (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), sera reconnu par différents récepteurs de reconnaissance de motifs (*pattern recognition receptor*, PRR). Les cellules gliales résidentes du parenchyme, telles que les astrocytes (voir 1.2.1) et les microglies (voir 1.2.4.1), sont les cellules principales contribuant à la réponse inflammatoire du SNC et possèdent une grande variété de PRRs [111]. Cela leur donne la capacité d'initier une réponse inflammatoire robuste [112, 113].

Banks W. *et al.* décrivent les perturbations de la BHE de trois points de vue différents [114]. Le premier point de vue serait une apparition tardive des dérèglements de la BHE liés à des erreurs dans les processus de réparation de cette dernière. La deuxième possibilité serait d'ordre physiologique, comme dans le cas de la diapédèse des cellules immunitaires qui se produit dans des conditions saines. Le dernier dérèglement serait en lien direct avec les maladies neuro-inflammatoires. Dans tous les cas, la régulation de l'intégrité de la BHE semble être assurée par les cytokines,

que ce soit dans des conditions pathologiques ou même physiologiques [114]. Les molécules pro-inflammatoires les plus souvent impliquées sont le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ), l'interleukine 1 bêta (IL1- $\beta$ ) et l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ). Dans le cas des méningites bactériennes et les septicémies, le lipopolysaccharide (LPS) reconnu comme endotoxine aura des effets sur la BHE comparables aux cytokines citées précédemment [115].

Les cytokines ne sont pas les seuls éléments à intervenir dans l'inflammation. On peut citer les cellules T CD4. Ces lymphocytes T, avec les CD8, sont connues pour détruire la myéline causant les lésions de la sclérose en plaque. Ces cellules sont activées dans la périphérie et elles interagissent avec les ECs pour moduler l'intégrité de la BHE [116]. Parmi les cellules agissant sur les propriétés de la BHE dans des conditions inflammatoires, on retrouve également les neutrophiles, les monocytes et les mastocytes. Les neutrophiles activés une fois dans l'espace périvasculaire, en plus de produire des cytokines, produiront aussi des ROS qui perturberont la BHE et faciliteront le passage de lymphocyte T [117]. Les monocytes jouent un rôle de sentinelle et elles sont connues pour passer la BHE via des interactions avec ALCAM, JAM-A et le récepteur de type 2 aux chimiokines (*C-C chemokine receptor type 2*, CCR2). Les mastocytes sont présentes dans différentes régions du cerveau, lorsqu'ils sont activés en plus de sécréter des cytokines, ces cellules produiront d'autres médiateurs de l'inflammation. Parmi les médiateurs sécrétés, il y a l'histamine et deux enzymes qui sont la chymase et la tryptase. Ces différents médiateurs affectent la perméabilité de la BHE directement ou indirectement via l'activation de la métalloprotéinase matricielle -2 (MMP-2) et de la MMP-9, deux enzymes induisant la dégradation de la matrice extracellulaire. Certains anticorps dirigés contre l'hôte comme l'anti-AQP4 IgG, qui est dirigé contre les aquaporines des astrocytes perturbent ainsi l'équilibre du cerveau et induisent également des changements dans la BHE [108]. Les glioblastomes sont les tumeurs les plus fréquentes (> 70 %) affectant le SNC. La progression des glioblastomes est dépendante des mécanismes de l'angiogénèse. La création de nouveaux vaisseaux sanguins est régulée par plusieurs acteurs dont le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) et l'angiopoïétine. Les voies de signalisation de ces acteurs sont davantage actives dans les glioblastomes. Cette stimulation excessive conduit à la déstructuration de la BHE [118]. L'interruption de la circulation sanguine dans le cerveau est une des causes majeures de mort et d'invalidité dans le monde. L'accident vasculaire cérébral (AVC) cause une perturbation de la BHE qui dans de nombreux cas peut conduire à une hémorragie. L'hémorragie entraînera une ischémie des tissus mais également une inflammation et des œdèmes. L'inflammation est principalement neuronale mais dans les cas de reperfusion tardives, des ROS et des MMP seront relâchés par les leucocytes infiltrés [118]. Par leur rôle de support, les astrocytes et les péricytes sont également des éléments pouvant induire des changements dans la BHE dans un contexte tel que l'inflammation. Un exemple est que les astrocytes, sous la stimulation de la bradykinine, suite à un AVC ou un traumatisme cérébral, vont stimuler la



production de cytokine (IL-6) qui induira l'ouverture de la BHE [115]. Les plaquettes sont un des premiers types cellulaires à atteindre le site de lésions vasculaires. Tout comme les leucocytes, les plaquettes seraient en mesure de rouler et de s'attacher à la surface des ECs pendant l'inflammation du SNC. Les plaquettes seraient également responsables de l'induction de l'inflammation vasculaire et elles contribueraient à la progression de certaines maladies (AVC, Alzheimer et la sclérose en plaque) [115].

Dans cette section nous nous attarderons sur les mécanismes cellulaires associés à l'activation des ECs par l'IFN- $\gamma$ , l'IL1- $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et le LPS. Nous verrons ensuite les changements liés à l'activation des ECs et l'impact de ses effets sur la BHE. Nous compléterons cette introduction en décrivant les impacts connus de l'inflammation sur la perméabilité de petites molécules au travers de la BHE. Il est important de noter que, lors de ces travaux de recherche, nous nous sommes concentré uniquement sur les ECs et quelques molécules pro-inflammatoires. Or, les PCs, les ACs, les microglies et les neurones sont une part importante des interactions induisant des modifications des ECs dans un contexte inflammatoire [119]. De plus, cette remarque est à relativiser en fonction de la provenance des cytokines soit le SNC ou la périphérie.

### 1.3.1 Les principales molécules pro-inflammatoires et leurs mécanismes d'action

#### 1.3.1.1 Interféron gamma

L'IFN- $\gamma$  appartient à la famille des interférons de type II. Cette cytokine intervient principalement dans la réponse immunitaire adaptative en recrutant et en activant les lymphocytes sur le site d'infection. L'action de l'IFN- $\gamma$  sur la BHE est souvent seulement associée à son rôle dans le recrutement des leucocytes, mais les ECs sont aussi capables de répondre directement à la stimulation par l'IFN- $\gamma$ . Cette cytokine jouerait un rôle principalement lors d'infections du SNC par des bactéries ou des virus. L'IFN- $\gamma$  induirait une sous-expression ou une internalisation des jonctions serrées. Cette modification des jonctions aurait pour but de faciliter le passage des leucocytes au travers de la BHE [120]. Très récemment, Bonney *et al.* ont découvert que l'IFN- $\gamma$  induisait une perturbation de l'intégrité de la BHE en réduisant le contact entre les cellules via des contractions cytosquelettiques médiées par la Rho kinase (ROCK). De plus, cette augmentation de la perméabilité serait induite par des changements morphologiques et une réduction du nombre de péricytes, pouvant expliquer également la perte d'étanchéité de la BHE [121]. Il est à noter que le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  sont souvent utilisés de concert pour leurs effets synergiques lors d'études d'inflammation [122].

### 1.3.1.2 Facteur de nécrose tumorale alpha

La superfamille des TNF- $\alpha$  est un groupe de cytokines principalement impliquées dans l'initiation et la promotion de la mort cellulaire. Le TNF- $\alpha$  est la plus étudiée des cytokines de cette famille, principalement pour ses effets comme molécule pro-inflammatoire [123], mais elle remplit également une fonction anti-inflammatoire en diminuant, par exemple, les poussées dans la maladie de la sclérose en plaque [124]. Dans les ECs, le TNF- $\alpha$  induirait la production de ROS, par l'intermédiaire de la NADPH oxydase. La production de ROS conduirait à une diminution de la transcription des gènes de certaines protéines et complexes jonctionnels (1.2.3.2). Plus spécifiquement, les ROS activeraient la cascade liée à la protéine kinase activée par des agents mitogènes (*mitogen activated protein kinase*, MAPK) et certains facteurs de transcription tels que le facteur nucléaire kappa B (*nuclear factor kappa b*, NF- $\kappa$ B). Ces cascades induiraient une diminution de l'expressions des gènes, une augmentation du renouvellement des protéines jonctionnelles via le système ubiquitine-protéasome, une dégradation des jonctions paracellulaires par des métalloprotéases de la matrice (MMP, MMP-2, MMP-9) surexprimées et à une dérégulation de la signalisation du cytosquelette d'actine [125].

### 1.3.1.3 Interleukine 1 bêta

L'IL1- $\beta$  est la forme prédominante d'interleukin-1 dans le SNC parmi 7 agonistes connus. L'IL1- $\beta$  est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par les macrophages et les monocytes, dont le rôle premier est la régulation et la libération d'autres cytokines et intervient aussi dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose [126]. Cette cytokine peut également provenir de la périphérie et pénétrer dans le cerveau [114]. L'IL1- $\beta$  est également impliquée dans la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. La présence de l'IL1- $\beta$  a également été rapportée dans le cas de dommage sur la BHE, ainsi que certaines maladies chronique reliées à l'âge, telles que les maladies neurodégénératives (cancer, Alzheimer et Parkinson)[127]. L'IL1- $\beta$  peut se lier à deux récepteurs, l'IL-1R1 et l'IL1-1R2, le IL-1R1 est le récepteur principal. L'IL1- $\beta$  n'a pas besoin de se lier à un grand nombre de récepteurs (moins de 100 liaisons) pour induire une réponse car elle active le NF- $\kappa$ B ainsi que des MAPKs entraînant une amplification du signal par les protéines kinases p38, p42/p44 et la kinase c-Jun N-terminale 1 (JNK1) [128]. Lorsque l'IL1- $\beta$  modifie la perméabilité des ECs, cela se produit par la surexpression du VEGF, et également du facteur R-spondin 3 (RSPO3), facteurs qui altèrent la composition des jonctions. Ces deux facteurs sont ainsi surexprimés suite à l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B[129].

#### 1.3.1.4 Lipopolysaccharide

Le lipopolysaccharide (LPS) est un glycolipide que l'on retrouve sur la membrane externe des bactéries à gram négatif. Ce glycolipide est couramment utilisé pour induire des modèles de neuro-inflammation [130]. Le LPS est composé d'une partie lipidique appelé lipide A (endotoxine), un noyau d'oligosaccharide non répétitif, et un polysaccharide distal (O-antigène) [131]. Le lipide A est la partie du LPS se liant au récepteur CD14 qui initierait la cascade MAPK, NF- $\kappa$ B et un transducteur de signal et activateur de transducteurs (*signal-transducer and activators of transducers*, STAT) [132]. Ceci conduirait à l'altération des jonctions serrées [133]. De plus, l'activation des ECs par le LPS ne serait pas le seul facteur à générer ces changements puisque le LPS induirait également la production de nombreuses cytokines et chimiokines, comme 5 interleukines (1 $\alpha$ , 1 $\beta$ , 6, 10, 13), le TNF- $\alpha$  et la protéine chimio-attractrice des monocytes-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*, MCP-1) ainsi que la protéine inflammatoire des macrophages-1 $\alpha$  (*macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$* , MIP-1 $\alpha$ ) [134]. De plus, le LPS peut induire l'apoptose, des anomalies dans la membrane ainsi que des dommages aux mitochondries. Parmi les anomalies induites par le LPS, on peut citer la dégradation du glycocalyx. L'effet du LPS peut également altérer le fonctionnement des astrocytes, réduisant leur soutien dans le maintien des fonctions de la BHE [119].

### 1.3.2 Les changements induits par l'inflammation sur les cellules endothéliales

Le dysfonctionnement de la BHE est le résultat d'un large spectre de phénomènes qui va d'une sur-expression de la E- et P-selectine, aux molécules d'adhésion, aux chimiokines, à l'altération de la localisation des jonctions serrées et des jonctions d'adhérence [108], sans oublier les transporteurs et les récepteurs. Dans cette sous-section, nous nous intéresserons uniquement aux changements produits par les molécules pro-inflammatoires décrites précédemment qui pourraient avoir un impact sur la perméabilité de petites molécules.

L'un des éléments les plus étudiés lorsque la BHE est inflammée, est la relocalisation et la diminution d'expression des protéines de jonction. Ainsi les cytokines IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$  réduisent principalement l'expression des jonctions serrées telles que l'occludine, la claudine-5, la ZO-1 et la JAM-A [108]. Plus précisément, un très grand nombre de modèles *in vitro* composés d'ECs traités avec du TNF- $\alpha$  ont mis en évidence un réarrangement spatial et une diminution de l'expression des protéines de jonction, plus particulièrement l'occludine, la claudine-5 et la zonula occludens 1 [125]. L'IFN- $\gamma$  provoque la diminution de l'expression des jonctions telles que la JAM-A, l'occludine, l'E-cadhérine et les claudines 1 et 4. De plus, la combinaison de l'IFN- $\gamma$  et du TNF- $\alpha$  produira des fenestrations entre les cellules induites par une relocalisation de certaines jonctions de la membrane à l'intérieur du cytoplasme, comme la claudine-4, la JAM-A et la

claudine-5. L'effet synergique pourrait être expliqué par le fait que l'IFN- $\gamma$  induit une augmentation du nombre de récepteurs au TNF- $\alpha$  présents à la surface des cellules [135]. L'IL1- $\beta$  produira une perte de VE-cadhérine et de  $\beta$ -catenine entraînant une diminution des interactions entre les ECs. De plus, *in vivo* l'IL1- $\beta$  a la capacité de moduler l'expression de la ZO-1 ainsi que de la vinculine, une jonction adhérente reliant les intégrines au cytosquelette d'actine [129]. Le LPS va toucher la structure même de la cellule en déclenchant la phosphorylation de la chaîne légère de myosine et le réagencement de la F-actine. De plus, l'expression de l'occludine et de la claudine-5 sera réduite [119].

Les transporteurs sont également modifiés par l'activation des ECs. Le TNF- $\alpha$  possède deux effets distincts sur l'expression et l'activité de la P-gp, selon la concentration du TNF- $\alpha$  ou le temps d'exposition. L'expression de la P-gp sera diminuée *in vitro* pour une faible concentration ( $1 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ , 1 h). Toutefois, pour une même concentration, lorsque le temps d'exposition est allongé (6 h), ce sont l'expression et l'activité de la P-gp qui sont augmentées. Dans une culture composée de cellules humaines endothéliales exposées 72 h à la TNF- $\alpha$ , l'expression de la P-gp a augmenté mais son activité est restée constante. Le LPS produit des effets similaires au TNF- $\alpha$  sur la P-gp. *In vitro* le LPS induira une augmentation de l'expression du gène MDR1 ainsi que celle de la protéine. Contrairement au TNF- $\alpha$ , une longue exposition à une forte concentration de LPS *in vivo*, chez la souris, diminue l'activité de la P-gp [136]. Dans un modèle *in vitro* composé de cellules primaires de porc, après 24 et 48 h d'exposition à l'IL1- $\beta$  le nombre de protéines de P-gp et BCRP présent est réduit mais seule la quantité d'ARN de la BCRP diminue [137]. Plus généralement, l'inflammation va induire une diminution des transporteurs d'anions organiques, de monocarboxylates, d'acides aminés, de la  $\beta$ -amyloïde, de la leptine et de la prostaglandine  $E_2$ . L'inflammation est également responsable de l'augmentation de certains transporteurs d'influx tels que celui de la TNF- $\alpha$ , de l'insuline, des monoamines, des enzymes lysosomales, des facteurs inhibiteurs de la leucémie et de la protéine virale gp120 [119]. Parmi les éléments affectés par les cytokines mais qui ne semblent pas intervenir dans la perméabilité des petites molécules, il y a les sélectines (P— et E—) ainsi que les jonctions d'adhésion (ICAM, VCAM, MCAM). Ces molécules seront régulées à la hausse afin de permettre la capture, le roulement et l'attachement des leucocytes aux ECs de la BHE, comme cela est observé lors des poussées dans la maladie de la sclérose en plaque [115].

L'inflammation induit en général une augmentation de la perméabilité de la BHE, augmentation qui est quantifiée par différents marqueurs paracellulaires : le sucrose radiomarqué pour l'*in vivo*, la fluorescéine sodique ou encore différentes tailles de dextran pour les modèles *in vitro*. Un marqueur paracellulaire fiable ne doit pas être un substrat de transporteur et avoir le moins d'interaction connue avec les cellules testées. De plus, il doit de préférence diffuser entre les cellules. Les marqueurs paracellulaires sont un des outils précieux pour évaluer l'étanchéité de modèle de la BHE. L'ouverture des jonctions est associée à une perméabilité plus grande, souvent généralisé

à toutes les petites molécules (< 1000 Da) [138]. Cependant, les mécanismes de passage au travers de la BHE des molécules pharmaceutiques sont pour la plupart peu étudiés et donc peu connus. Il est ainsi intéressant de développer des modèles capables d'étudier la perméabilité des molécules pharmaceutiques dans différentes conditions, saines et inflammatoires.

### 1.3.3 Inflammation et perméabilité des petites molécules à travers la barrière hémato-encéphalique

Nous avons vu, dans la section précédente, que l'inflammation entraînait des changements dans l'expression et le fonctionnement des protéines de jonction et des transporteurs, ce qui aboutit à une BHE moins sélective et plus perméable aux marqueurs. Cependant, la diversité des acteurs induisant des modifications de la BHE ainsi que la variété de composés thérapeutiques disponibles pour le SNC élargissent considérablement les études possibles sur la perméabilité de ces derniers. Le consensus actuel, basé sur différentes études *in vitro* et *in vivo*, est que le dysfonctionnement de l'unité neurovasculaire (NVU), la réduction d'expression des jonctions serrées et l'altération de la quantité de transporteurs d'influx et d'efflux présents affectent la perméabilité de la BHE [139].

Pour rappel, une petite molécule (< 1000 Da) hydrophobe empruntera majoritairement la voie transcellulaire (voir 1.2.3) alors qu'une molécule hydrophile, ne pouvant pas diffuser au travers de la membrane cellulaire, diffusera par la voie paracellulaire (voir 1.2.3). La présence des protéines de jonction limite davantage cette voie de passage au travers de la BHE [140]. Cependant, lors de l'inflammation, les jonctions sont impactées. Par exemple, le dérèglement de la claudine-5 et de l'occludine *in vivo* permet à des molécules de taille jusqu'à 3 kDa de diffuser par voie paracellulaire [141]. Dans le cas d'une molécule hydrophobe, plus susceptible d'utiliser la voie transcellulaire, les chances d'être substrat d'un transporteur d'efflux tel que la P-gp sont statistiquement élevées. C'est le cas, par exemple, de la statine et des corticostéroïdes qui sont substrats de la P-gp. Ces deux familles de molécules utilisées dans le traitement de maladies comme l'Alzheimer et les tumeurs cérébrales bénéficieraient de la réduction d'expression de la P-gp pour atteindre le SNC en concentrations thérapeutiques [142]. Cependant, en 2009, Lu *et al.* concluaient que l'inflammation affectait la perméabilité de la BHE mais que cet effet était modeste, complexe et dépendant de la petite molécule évaluée [143]. De façon similaire, Ronaldson *et al.* concluaient en 2011 qu'une BHE plus perméable entraîne une augmentation de la perméabilité pour certaines molécules thérapeutiques seulement [144]. Ces résultats sont à mettre en perspective avec l'étude de Gustafsson *et al.* Dans cette étude *in vivo*, les auteurs n'observent aucune différence dans la répartition, entre le sang et le SNC, de la digoxine, la lévofloxacine, la palipéridone, le diazépam et l'oxycodone sur des souris modèles des maladies de Parkinson et d'Alzheimer comparativement à des souris naïves [139]. Cette même équipe a utilisé des souris déficientes en péricytes (voir 1.2.2) pour réali-

ser le même type d'essais que précédemment. Ce modèle animal mime l'impact des maladies telles qu'Alzheimer et la sclérose latérale amyotrophique. Là encore, leurs résultats ont été surprenants. En effet, dans des études précédentes, l'absence de péricytes était généralement associée à une augmentation de la perméabilité de Dextran-FITC de masse molaire allant de 500 Da à 550 kDa. À l'inverse, Mihajilica *et al.* n'ont observé aucune différence de diffusion entre les souris naïves et celles ne possédant pas de péricytes. De plus, leurs choix de molécules couvraient la diffusion passive (diazépam), le transport d'efflux (digoxine et lévofloxacine) et même le transport d'influx (oxycodone) [145].

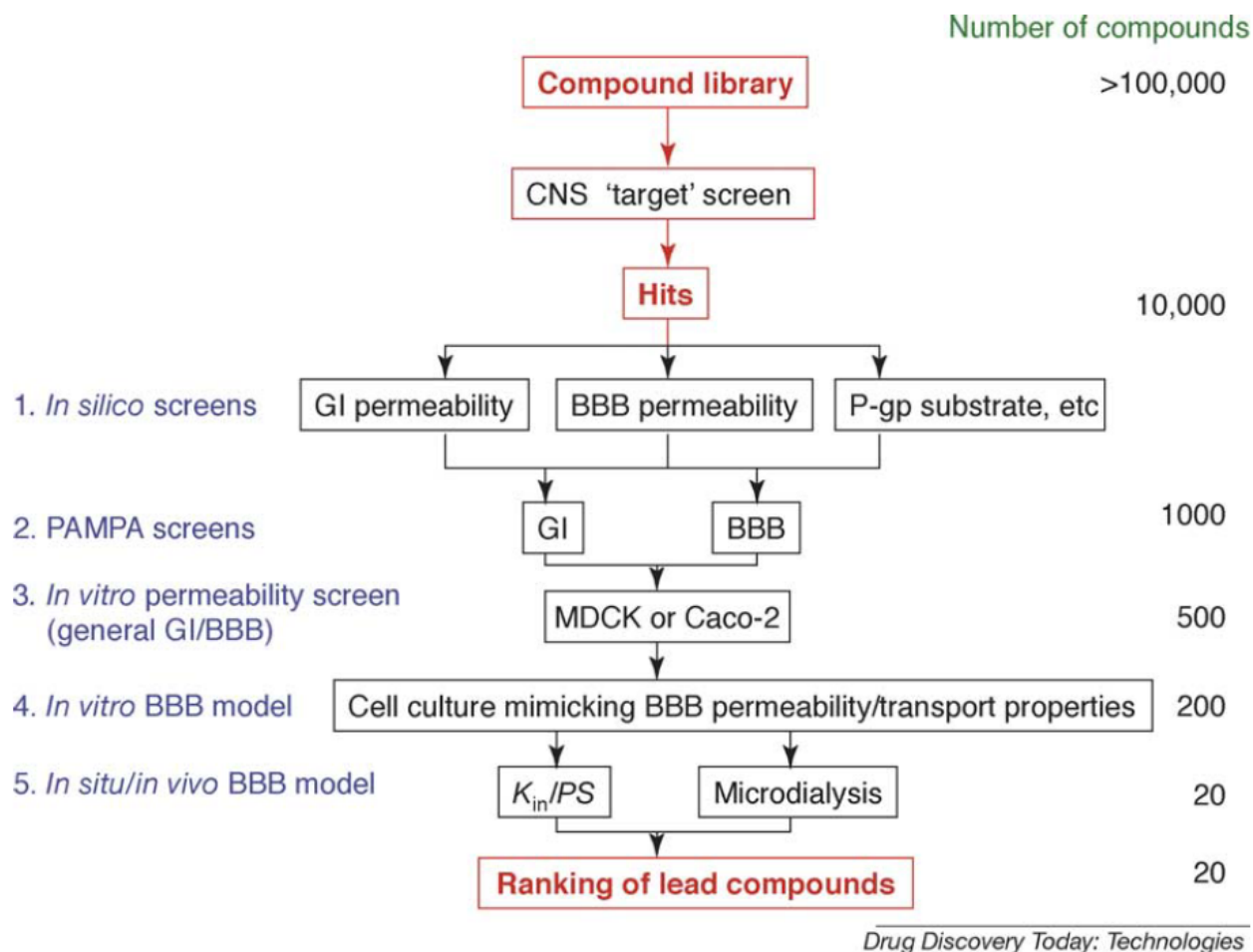
Le consensus actuel sur la perméabilité et l'état de la NVU devrait également inclure la possibilité qu'il n'y ait pas de changement de vitesse d'absorption pour certaines molécules thérapeutiques. Les résultats variés de la littérature sont d'excellents avocats pour le développement et l'étude approfondie de modèles pathologiques pour l'étude de la perméabilité au SNC. En effet, il semble nécessaire que des modèles sains utilisés dans le développement de médicament pour le SNC soient aussi transférés dans des contextes pathologiques.

## 1.4 Les modèles d'études de la perméabilité de la BHE

Étudier la perméabilité au travers d'une membrane peut être réalisé pour plusieurs raisons :

- Déterminer et classer de façon générale si un objet, une protéine, ou une molécule est en mesure de la traverser.
- Trouver quelle voie est empruntée pour passer au travers de la barrière.
- Étudier un mécanisme spécifique impliqué dans le passage.
- Évaluer les propriétés de la BHE dans différentes conditions.

Déterminer et classer les molécules en fonction de leur perméabilité est d'une importance capitale dans le développement de médicaments destinés au SNC. En effet, une molécule qui n'est pas absorbée au niveau de la BHE ne pourra pas agir à son site d'action. C'est dans cette optique que de nombreux modèles ont été développés afin d'obtenir très tôt, dans les phases précliniques, cette information (Fig 1.12).



**Figure 1.12 – Stratégie suggérée par Abbott en 2004 pour la prédiction de la perméabilité de nouvelles molécules au travers de la BHE.**

L'organigramme présente des suggestions de séquences de criblage pour trouver des composés ayant le potentiel d'atteindre le SNC, mais également pour faciliter le développement d'un composé optimisé pour le passage de la BHE. Reproduit et modifié avec permission de Elsevier [146].

Tous ces modèles ont pour but de prédire et classer un plus ou moins grand nombre d'objets dans leurs capacités à traverser la BHE. Il est évident que, même si les modèles se sont affinés avec le temps et que ces derniers apportent davantage d'informations, il n'en reste pas moins qu'ils sont complémentaires et qu'aucun modèle ne fournit suffisamment d'information à lui seul. Voici quelques arguments qui illustrent la pertinence de cette démarche.

**La mesure de la perméabilité** permet de déterminer si une molécule, une protéine, ou un objet est en mesure de traverser une membrane. Dès la moitié du vingtième siècle, des équations basées sur la loi de diffusion de Fick, plus ou moins corrigées selon différents facteurs comme le rayon hydrodynamique (équation de Stokes-Einstein), seront utilisées pour déterminer la vitesse de diffusion des molécules [147]. Les valeurs obtenues, *in vivo*, *in vitro*, ou plus récemment *in silico*,

seront comparées à des standards ou bien à un ensemble de molécules. Les classifications ainsi obtenues seront le début d'études pour affiner le développement de nouvelles molécules et vecteurs thérapeutiques. Les valeurs de perméabilité obtenues seront aussi le point de départ dans l'étude des voies et des mécanismes empruntés par les molécules.

**Les mécanismes impliqués dans la perméabilité** sont de mieux en mieux compris. Néanmoins, les modèles doivent permettre leurs études, voire la possibilité de les isoler d'autres mécanismes. Comme nous en avons discuté précédemment dans la partie sur les ECs, les différentes voies possibles sont la diffusion, le transport et la transcytose (voir 1.2.3). Dans la catégorie des diffusions, les molécules peuvent traverser entre les cellules ou directement à travers la membrane de ces dernières. Dans le cas de la BHE, le transport paracellulaire est quasi inexistant. La diffusion au travers de la membrane est favorisée pour les molécules lipophiles de petite taille (< 1000 Da), mais ne fonctionne pas pour les protéines ou les nanoobjets. De plus, bien souvent, les xénobiotiques de petites tailles seront le substrat de l'un des nombreux transporteurs à efflux. Le transport facilité ou actif par des protéines transmembranaires, telles que les transporteurs de la famille des SLCs, est intéressant d'un point de vue pharmacologique. Néanmoins, des connaissances approfondies sur les mécanismes et les substrats acceptés pour chaque transporteur sont requis. Finalement, les mécanismes induisant la transcytose par récepteur ou par adsorption sont très intéressants pour les protéines et les nanoobjets. Mais là encore, les mécanismes ne sont pas totalement compris et davantage d'études seraient nécessaires pour faciliter le développement de médicaments empruntant ces voies. Cependant, malgré le manque de connaissance, ces dernières décennies ont vu l'émergence de plus en plus d'outils en mesure de déterminer quels mécanismes sont empruntés par les molécules développées [81].

**Déterminer quels sont les mécanismes impliqués dans la perméabilité** d'une molécule ou d'un vecteur thérapeutique est **recommandé, voire obligatoire**, dans le cas de certains transporteurs. Ainsi, nous avons vu que la FDA et l'EMA recommandent lors de la soumission d'un dossier d'autorisation de mise sur le marché que le médicament présenté ne soit pas un substrat de certains transporteurs à efflux. Un avantage que peut également apporter la connaissance des mécanismes est la possibilité de développer des thérapies combinées à des inhibiteurs, mais également ciblant directement un récepteur induisant la transcytose ou utilisant un transporteur d'influx. Les avancées dans des domaines touchant de près ou de loin le développement du médicament tels que la biologie moléculaire, l'optique, et la quantification de composés, ont permis l'essor de nombreuses techniques permettant l'élucidation des mécanismes de la perméabilité. L'évolution des algorithmes *in silico* jusqu'au dernier développement en matière d'intelligence artificielle a fait apparaître des outils supplémentaires dans la quête du développement de vecteurs et de molécules destinées aux maladies du SNC.

**La BHE est une structure complexe** possédant des processus lui permettant de réguler fine-



ment les échanges entre le sang et le cerveau. Nous avons vu que tous les outils biologiques que possède la BHE, sont pour la plupart sensibles à tout changement physiologique : les jonctions, les transporteurs, les récepteurs. D'ailleurs, les études sur les pathologies du SNC ont toujours un lien direct ou indirect avec la BHE. Lorsqu'un changement dans la BHE induit une pathologie, le lien est direct, alors que lorsque la pathologie induit des changements dans le fonctionnement de la BHE, le lien est indirect. Le fait que la BHE soit aussi modulable demande que les points présentés précédemment soient également étudiés dans différentes conditions. La condition la plus commune est liée à l'inflammation de la BHE, présente dans la majorité des pathologies [119]. Ces dernières années, les études tendent à démontrer que les changements induits au niveau de la BHE, lorsque cette dernière est inflammée, ne produisent pas forcément une augmentation de la perméabilité de composés pharmaceutiques [143].

Dans cette section, nous verrons les différents modèles disponibles pour l'étude de la perméabilité.

### 1.4.1 Les modèles *in vivo*

Les modèles *in vivo* sont considérés comme étant les plus proches de la réalité. Ces modèles utilisent un système dynamique et vivant pour prédire les valeurs de perméabilité et sont, en général, plus faciles à traduire pour les études humaines. Le fonctionnement de la BHE de nombreux animaux, principalement des mammifères, dans des conditions saines, est relativement proche de celle de l'homme. De nombreuses techniques et espèces sont donc utilisées pour déterminer la perméabilité des médicaments à travers la BHE *in vivo* [148].

#### 1.4.1.1 Les différents animaux utilisés

##### Les rongeurs

Les souris et les rats sont les animaux les plus utilisés en science. En plus d'être des mammifères qui sont faciles à manipuler, de nombreux modèles transgéniques ont été développés. Ainsi, les études de perméabilité peuvent être réalisées dans de nombreuses conditions. Un autre avantage est que leur BHE présente des similitudes morphologiques, physiologiques, et pathologiques à celle de la BHE humaine. Ainsi, on retrouve les jonctions telles que la claudine-3 et 5, ZO-1, et occludine. De plus on retrouve chez la souris la P-gp et la GLUT-1 [149]. Parmi les différentes souris transgéniques disponibles commercialement, on retrouve des souris doublement knock-out pour les gènes *Mdr1a/1b*<sup>-/-</sup>, soit les deux isoformes de la P-gp, ainsi que pour d'autres transporteurs [146]. Une étude de 2008 sur 3300 composés a démontré que, chez la souris, 93 % des composés se superposent aux résultats humains lorsqu'ils sont transportés par la P-gp [150]. De plus, des méthodes utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM), les essais de liaison du

ligand radiomarqué, et la fluorescence avec la microscopie à deux photons, ont permis d'obtenir une confirmation visuelle des événements. Ces méthodes n'étaient pas initialement suffisamment précises pour la quantification, mais cela s'est amélioré avec le temps pour les essais radiomarqués ainsi que pour l'IRM. En parallèle, des techniques de chromatographie couplées à la spectrométrie de masse ont permis la quantification précise des composés testés, permettant ainsi d'obtenir leurs paramètres pharmacocinétiques [149].

### **Le poisson-zèbre**

Depuis un peu plus d'une décennie, le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est utilisé comme modèle fiable des essais sur la BHE *in vivo*. Tout comme les rongeurs, différentes études ont démontré que le poisson-zèbre possède une BHE fonctionnelle [151]. Plus précisément, le poisson-zèbre a la même structure cellulaire que les mammifères. Les ECs expriment les jonctions de la famille des claudines (1 et 5), ainsi que la ZO-1, mais la claudine-3 ou l'occludine n'ont pas encore été observées. On retrouve également des gènes orthologues à la P-gp, dont la similarité avec les transporteurs humains est aux alentours de 50 %. De plus, la P-gp est fonctionnelle à partir de 7 jours post-fertilisation (*day post fertilization*, DPF) démontrée avec de la rhodamine 123. Les poissons-zèbres possèdent également des gènes orthologues à la MRP et la BCRP. Des études ont mis en évidence que le poisson-zèbre pouvait être utilisé comme modèle *in vivo* dans l'étude des ratios cerveau/sang de plusieurs marqueurs fluorescents mais également de principes actifs. Les résultats, comparés valeurs obtenues chez la souris, montrent une corrélation entre les deux espèces animales. Pour finir, plusieurs modèles de poisson-zèbre pour des maladies telles que Parkinson ou Alzheimer ont été validés. Ces modèles de maladies conservent une grande homologie avec l'humain, couplés à la facilité d'administration des médicaments (directement dans le milieu des poissons). Le poisson-zèbre est une alternative séduisante aux autres modèles animales; cependant, son utilisation pour l'étude de la perméabilité au travers de la BHE est limitée car, à notre connaissance, aucune méthode de quantification exacte n'a été développée pour ce modèle [152].

### **Les primates non humains**

Les macaques rhésus (*Macaca mulatta/fascicularis*) sont des animaux qui représentent le mieux la physiologie de l'humain. Ce modèle de primate non humain est le plus adapté pour le développement et l'évaluation de l'administration de médicaments. En effet, la BHE des macaques rhésus est très similaire à celle des humains. Ainsi, les paramètres pharmacocinétiques étudiés sont similaires à ceux suivis chez l'Homme. L'avantage premier de ce modèle, comparativement à une étude réalisée chez l'humain, est que l'on peut mesurer précisément les concentrations de médicaments ayant atteint le cerveau et donc mesurer la perméabilité au travers de la BHE [149]. D'autres espèces de primates sont également utilisées comme modèle dans l'étude de maladies telles que Parkinson

dont les troubles moteurs mais également les études post-mortem corrélerent bien avec ce qui est observé chez l'humain [153]. Cependant, les coûts associés à l'utilisation des primates non humains sont très élevés comparés aux autres modèles décrits dans cette section.

### **La drosophile**

La drosophile (*Drosophila melanogaster*) a une BHE différente des vertébrés. En effet, la BHE des drosophiles est composée de cellules gliales dérivées de cellules épithéliales. La structure de la BHE est donc bien plus simple que celle des vertébrés. Cependant, la BHE des drosophiles contient des jonctions adhérentes et cloisonnées ainsi que des complexes limitant la diffusion à travers la BHE. De plus, leur BHE exprime les transporteurs ABC des classes B, C et G. Les drosophiles commencent à être utilisées comme modèles pour l'étude de la BHE principalement pour le fait qu'elles coûtent bien moins cher que les rongeurs. Néanmoins, les techniques développées sont principalement de l'imagerie par fluorescence, majoritairement dans des études d'inhibition de la P-gp. La fluorescence ne permettant pas une quantification exacte, les études de perméabilité en sont limitées. De plus, la P-gp des drosophiles ne présente que 42 % d'homologie avec celle des humains [154, 149].

### **Le chien**

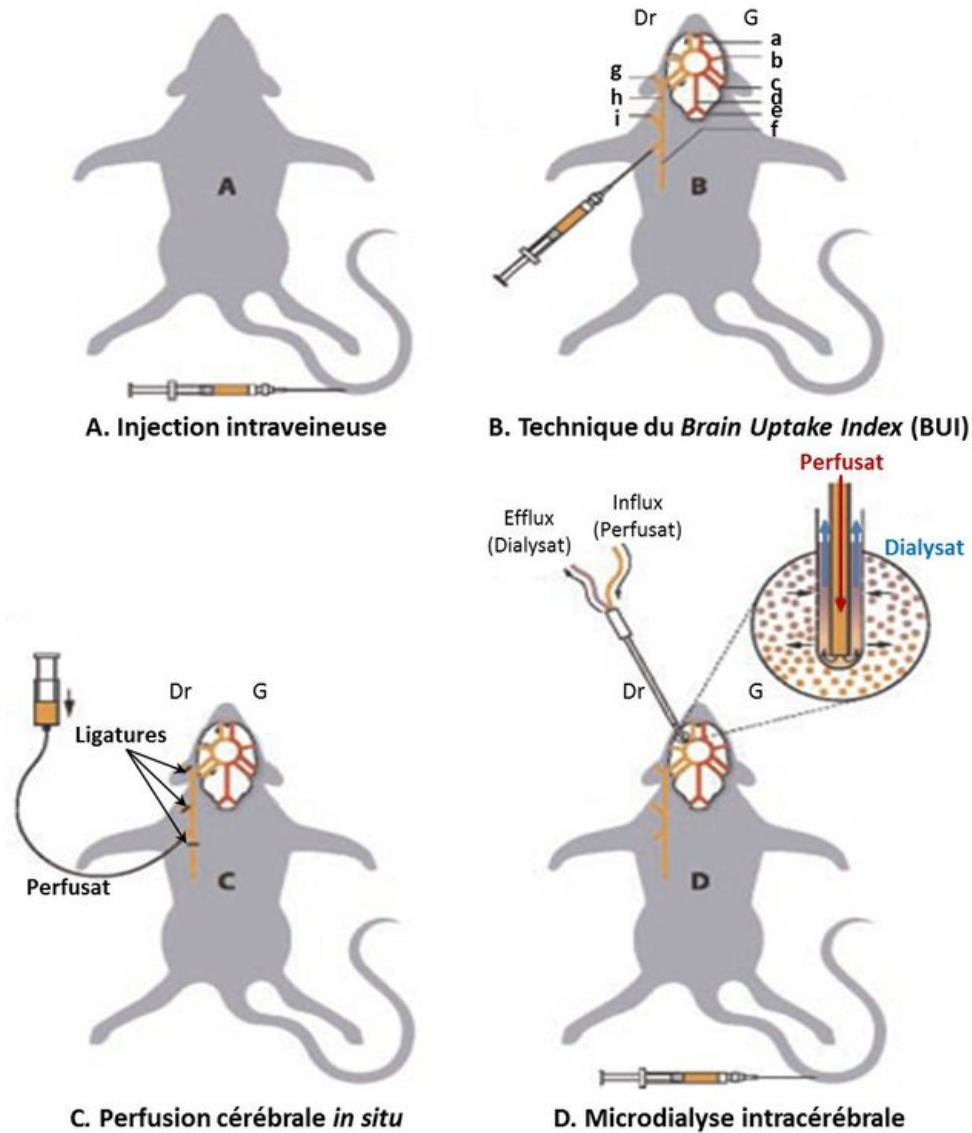
Le chien est un modèle important pour la découverte et le développement de médicaments, principalement dans les études d'innocuité. Récemment, les études ont démontré la présence de transporteurs de la famille des SLCs mais également des transporteurs ABCs [149]. Le chien est également un modèle intéressant pour les maladies neurovégétatives car, contrairement aux rongeurs qui sont modifiés génétiquement, les chiens développent spontanément certaines maladies, dont celles d'Alzheimer ou de Parkinson [155]. Un autre avantage des chiens (qui se retrouve chez les grands animaux en général) est que les études d'imagerie ne souffrent pas de limitations de résolution. Ainsi, des protocoles d'imagerie par résonance magnétique ont été développés permettant de suivre la dynamique des fluides et la perméabilité vasculaire au niveau du cerveau [156].

Les rongeurs semblent être pour l'instant le modèle le plus intéressant, tant d'un point de vue physiologique que pratique. En effet, commercialement, il existe de nombreuses souches de souris génétiquement modifiées, développant des modèles de maladie ou ne présentant pas certaines protéines. Cela facilite grandement l'étude du potentiel d'un médicament très tôt lors du développement préclinique. De nombreuses méthodes ont été développées pour les rongeurs et la littérature scientifique est abondante pour cette ordre. Bien que le prix d'utilisation des rongeurs soit plus élevé que le poisson-zèbre ou la drosophile, et que le nombre de nouveau-nés soit plus faible, les rongeurs restent peu dispendieux comparés aux grands animaux tels que les primates non humains

ou les chiens et ils soulèvent moins de questions éthiques. Ainsi, à l'heure actuelle, l'espèce murine reste le meilleur compromis. Cependant, le poisson-zèbre pourrait être l'alternative la plus pertinente aux mammifères dans les années à venir.

#### **1.4.1.2 Les techniques utilisées**

Dans cette section, nous verrons les techniques les plus couramment utilisées *in vivo* pour déterminer la capacité d'une molécule ou d'un vecteur thérapeutique à se rendre au cerveau en traversant la BHE (Fig 1.13). Il est à noter que les méthodes telles que l'échantillonnage de fluide cérébrospinal, l'autoradiographie quantitative, ou encore les techniques d'imagerie non invasives ne seront pas abordées [149].



**Figure 1.13 – Schémas des différentes techniques *in vivo* pour mesurer la diffusion d'une molécule au cerveau.**

(A) L'injection intraveineuse qui permet également la mesure du ratio cerveau/sang. (B) Technique de mesure de l'indice d'absorption cérébrale. (C) La perfusion *in situ*. (D) La microdialyse. a. Artère cérébrale antérieure b. Artère cérébrale moyenne c. Artère cérébrale postérieure d. Artère basilaire e. Artère vertébrale f. Artère carotide commune g. Artère ptérygo-palatine h. Artère carotide interne i. Artère carotide externe. Reproduit et modifié avec permission de Elsevier [157]. Reproduit et modifié avec permission de Creative Commons Attribution License (CC BY) [158].

### L'injection intraveineuse

Cette méthode est considérée comme une référence dans l'étude de la perméabilité de la BHE (Fig 1.13-A). En effet, elle est simple et efficace. Le composé est injecté par une canule dans l'ar-

rière fémorale ou directement dans la veine caudale de l'animal. Dans une étude pharmacocinétique, plusieurs prélèvements sanguins à intervalles réguliers seront réalisés. Les animaux seront ensuite euthanasiés et le cerveau isolé, homogénéisé, et le composé quantifié. La comparaison entre la quantité de médicaments présents dans le cerveau et le sang permet d'obtenir une représentation précise de ce qui est passé au cerveau. La quantité délivrée au cerveau peut être analysée avec un seul point dans le temps ou plusieurs. La quantification peut être réalisée par imagerie *in vivo* ou par chromatographie liquide couplée à deux spectromètres de masse (LC-MS/MS). L'avantage de cette méthode est que l'on peut également obtenir la cinétique du médicament dans le plasma et le cerveau, ce qui permet de calculer précisément l'exposition du cerveau au composé [149].

### Le ratio cerveau/sang

Cette méthode est un des standards pour tester la capacité d'un médicament à se rendre au cerveau (Fig 1.13-A). Le principe est simple : à la suite d'une injection en intraveineuse, l'animal est sacrifié à un temps donné et la concentration de la molécule dans le cerveau et le sang est quantifiée. Le logarithme de la concentration dans le cerveau sur la concentration dans le sang donne le ratio cerveau/sang (*Brain/Blood*), appelé le log BB. Les résultats obtenus sont dépendants de toutes les caractéristiques de la BHE et des voies empruntées par la molécule testée. De plus, le nombre d'échantillons, la dose injectée, la voie d'administration, et l'espèce utilisée sont modifiables, ce qui permet d'adapter les protocoles aux besoins des études. Il est à noter, néanmoins, que le log BB a une valeur qui ne tient pas compte de la fraction libre de la molécule dans le cerveau. De plus, les valeurs obtenues peuvent être biaisées par le fait que la molécule puisse être seulement adsorbée à la surface des ECs ou dans leurs cytoplasmes [149]. Cette technique reste cependant très intéressante pour les corrélations *in vitro* et *in vivo* dans l'étude de la perméabilité dans le développement de nouvelles molécules ou vecteurs thérapeutiques.

### L'indice d'absorption cérébrale (BUI)

L'indice d'absorption cérébrale (*Brain uptake index*, BUI) est une technique pour mesurer la perméabilité d'un médicament du sang au cerveau (Fig 1.13-B). La technique utilise deux composés : l'un étant celui à tester, et l'autre servant de référence. Le composé de référence doit être choisi pour sa capacité à passer librement la BHE. Le cerveau est perfusé pour environ 15 secondes avec la solution contenant les deux composés. L'animal est ensuite sacrifié et son cerveau est prélevé. Les deux composés sont alors quantifiés dans l'homogénat. L'indice est calculé en prenant le ratio du composé testé sur le composé de référence dans le cerveau et dans la solution injectée puis en divisant les deux valeurs obtenues l'une par l'autre. Cette méthode est une des plus anciennes utilisées pour quantifier la proportion d'une substance à pénétrer dans le cerveau. La technique a été développée initialement pour des composés radioactifs. De plus, elle fonctionne mieux avec

des molécules dont la quantité attendue qui pénètre le cerveau est moyenne ou élevée. Une autre limitation est que le temps d'exposition à la molécule est très court. De ce fait, le BUI ne tient pas compte du débit sanguin de la région du cerveau et de la différence de temps entre le moment de l'injection et l'échantillonnage. Pour finir, il est rare que la molécule ait le temps de se rendre dans le cerveau, ce qui limite l'interprétation des résultats [149].

#### **La perfusion du cerveau *in situ***

La perfusion *in situ* est une méthode développée en 1984 par Takasato [159] (Fig 1.13-C). Cette méthode, décrite la première fois chez le rat, consiste en une perfusion du cerveau par un composé à l'aide d'un cathéter via la carotide de l'animal. La vitesse de perfusion est contrôlée afin de maintenir une pression artérielle normale. À la fin de la perfusion, le cerveau est retiré puis homogénéisé avant d'être préparé pour la quantification. Cette méthode permet de mesurer la diffusion du composé et de calculer la perméabilité de surface (PS). Elle permet également de s'affranchir du métabolisme périphérique tout en contrôlant la composition et la vitesse de la perfusion. Cependant, passé 60 secondes, la BHE peut présenter des changements de perméabilité [149]. De plus, même après le passage d'une solution de rinçage, le composé ne peut être seulement qu'adsorbé à la surface des ECs ou encore à l'intérieur de ces dernières sans pour autant avoir traversé la BHE. Ceci peut fausser l'interprétation des résultats de perméabilité. Finalement, cette méthode demande des compétences en chirurgie et du temps. D'ailleurs, chez le rat, cette technique est fastidieuse car l'artère commune possède des ramifications au niveau du cou, l'expérimentateur doit donc toutes les ligaturer. De plus, la réalisation d'une cinétique demande un grand nombre d'animaux [157].

#### **La microdialyse**

La microdialyse est une technique inventée dans les années 60 pour prélever des échantillons de substances solubles dans un tissu [160] (Fig 1.13-D). La méthode consiste à insérer une sonde composée de deux compartiments imbriqués. Le premier compartiment est une canule entourée du deuxième compartiment qui est la membrane de dialyse. La canule va perfuser une solution physiologique, appelée perfusat, ne contenant pas les substances à étudier. Les molécules vont passer librement au travers de la membrane semipermeable et se retrouver entraînés dans le dialysat, qui sera collecté pour ensuite être quantifié. Cette méthode permet de quantifier l'exposition et la quantité libre de médicaments ayant pénétré le cerveau. La molécule à tester est injectée par intraveineuse, comme vue dans la section précédente et des échantillons du fluide extracellulaire sont prélevés en plus des échantillons sanguins [149]. Cette méthode présente plusieurs avantages comparés aux autres méthodes de perfusion. En effet, la sonde est plus petite qu'une canule, et le débit employé est également plus faible, limitant ainsi les dommages causés aux tissus perfusés. Néanmoins, cette technique reste invasive et, tout comme les techniques demandant l'utilisation

d'implant, des compétences en chirurgie sont nécessaires. De plus, le temps de préparation de chaque animal est long, bien que l'expérience ne dure que 10 min en moyenne pour réaliser le prélèvement. Pour finir, cette méthode donne de bonnes indications sur la distribution au cerveau, mais uniquement sur une zone précise du cerveau (celle qui reçoit la canule), et elle ne permet pas de mesurer la perméabilité au travers de la BHE [160].

### 1.4.2 Les modèles *in silico*

Les premiers modèles développés étaient une combinaison de la méthode de relation quantitative structure à activité (*Quantitative structure activity relationships*, QSAR) et la modélisation de la pharmacocinétique basée sur des paramètres physiologiques (*Physiologically based pharmacokinetic*, PBPK) [161]. Ces méthodes ont été utilisées et réunies sous l'appellation de développement rationnel des médicaments. Cette façon de développer des médicaments a permis la découverte de nombreuses molécules. Cependant, les molécules développées pour le SNC, nombreuses, n'ont connu que peu de succès. En effet, les résultats obtenus via ces modèles étaient principalement développés en utilisant les descripteurs physicochimiques liés à la diffusion passive des molécules. Ils ne tenaient donc pas compte des transporteurs et autres voies de la perméabilité [146, 162]. Les modèles développés par la suite se sont basés sur l'utilisation des réseaux de neurones utilisés dans différents domaines de l'intelligence artificielle (Artificial intelligence, AI). L'étude qui, pour l'instant, a donné les meilleurs résultats de prédiction de la perméabilité au travers de la BHE date de 2009 et a été publiée par Yang *et al.* [163]. En plus d'utiliser une machine à vecteurs de support (*support vector machine*, SVM) pour réaliser la classification des 1593 composées, les auteurs ont d'abord employé un algorithme de génétique (GA) pour choisir les paramètres et les ont ensuite optimisés avec une méthode du gradient conjugué (GC). Les paramètres étaient ensuite utilisés par le SVM. Brièvement, la méthode de SVM consiste en une séparation de deux hyperplans. Un hyperplan est un plan pouvant contenir une infinité de dimensions. Les deux plans à séparer sont ceux où la molécule passe la BHE et celui où la molécule ne passe pas. Les différentes dimensions sont des paramètres physicochimiques (masse molaire, charge, nombre d'azote ...) et autres descripteurs (solubilité, logarithme de la partition octanol/eau ...). Pour choisir lesquels sont les plus pertinents, les auteurs utilisent un GA. Le GA va sélectionner certains paramètres ; si ceux-ci améliorent le modèle, ces paramètres seront conservés et passés aux générations suivantes. Le dernier outil est l'optimisation de chaque paramètre par la méthode GC. Cette méthode va apporter deux paramètres appelés pénalité et noyau. Ces paramètres utilisés sur les descripteurs appliqueront plus ou moins d'importance à chacun d'entre eux dans le SVM [163]. Le meilleur modèle ainsi obtenu permet de classer en molécules passant ou non la BHE avec une précision de 96,8 %.

L'utilisation de l'AI est très prometteuse ; en effet, elle pourrait réduire le coût de développement des médicaments mais également le nombre d'animaux sacrifiés, tout en augmentant la vitesse



de mise sur le marché. Cependant, même après plus de 20 ans, la plupart des applications de l'AI est toujours considérée comme des boîtes noires dont il est impossible de déterminer précisément le fonctionnement. Si l'on reprend l'exemple de Yang *et al.*, le SVM catégorise des molécules selon un très grand nombre de descripteurs. Le nombre de dimensions formées par les descripteurs est tellement grand que notre cerveau humain n'est pas en mesure de l'apprécier. Cependant, même si ce modèle permet de classer plus de 1593 composés avec une grande précision, il n'est pas en mesure d'expliquer comment, avec l'ensemble des descripteurs utilisés, il produit la classification finale. Ce désavantage est le problème majeur auquel l'AI est confrontée dans tous les domaines qui l'emploient.

### 1.4.3 Les modèles *in vitro*

#### 1.4.3.1 Les modèles sans cellule

Les modèles *in vitro* n'utilisant pas de cellules sont très avantageux car bien souvent, en plus d'être des modèles peu dispendieux, ils sont également plus rapides à effectuer. En contrepartie, ce type de modèle tend à n'offrir qu'une vision très simpliste de l'ensemble des mécanismes impliqués dans la perméabilité au travers de la BHE. Ils sont donc souvent utilisés très tôt dans le développement du médicament, afin de réduire le nombre de candidats possibles.

**La chromatographie par membrane artificielle immobilisée** (*Immobilized artificial membrane, IAM*) était la première méthode employant un système mimant la membrane lipidique des cellules. La phase stationnaire des colonnes IAM est composée de différents types de lipides greffés de façon covalente à de la silice. Ces colonnes sont utilisées pour prédire la perméabilité des petites molécules au travers de la BHE. Cette méthode fut ensuite couplée à de la chromatographie en phase liquide permettant ainsi d'augmenter le nombre de composés testés par expérience mais également la qualité des résultats. Couplé à un spectromètre ultraviolet ou de masse, cette méthode permet de cribler rapidement et à un moindre coût, un grand nombre de composés tout en prédisant la perméabilité passive des molécules au SNC. Cependant, elle ne permet d'étudier que la diffusion passive. En effet, la membrane lipidique d'une colonne IAM est loin de représenter la bicouche fonctionnelle des ECs. [149].

**L'essai de perméabilité sur une membrane parallèle artificielle** (*Parallel artificial membrane permeability assay, PAMPA*) a été développé pour répondre à certaines problématiques soulevées par la méthode IAM. Ce modèle a été développé dans le but d'étudier la diffusion passive au travers des membranes, qui est la voie d'entrée principale de nombreux composés. Le premier PAMPA fut développé pour l'étude de la perméabilité gastro-intestinale. Plus tard, ce modèle a été décliné

pour différentes applications, dont l'étude de la perméabilité au niveau BHE (PAMPA-BBB). Le PAMPA-BHE est composé d'une plaque comportant des puits qui sont eux-mêmes divisés en deux compartiments. Les compartiments sont séparés par un filtre de polyfluorure de vinylidène (*Polyvinylidene fluoride*, PVDF) recouvert de lipides extraits du cerveau de porc (*Porcine brain lipids*, PBL). Les PBL sont généralement solubilisés dans du n-dodécane. Cette méthode, tout comme l'IAM, permet de classer les molécules selon leurs capacité à diffuser plus ou moins facilement au travers de la membrane des cellules. Le PAMPA-BBB est utilisé très tôt dans le développement du médicament [149]. En effet, c'est une des méthodes qui permet de cribler rapidement plusieurs molécules pour leurs propriétés à diffuser passivement au travers de la BHE. Les valeurs obtenues via le PAMPA-BBB corrént avec les données *in vivo* parfois mieux que certains modèles cellulaires [164].

#### 1.4.3.2 Les modèles avec cellules

Le principal défaut des modèles *in vitro* acellulaires est qu'ils ignorent une part non négligeable des mécanismes impliqués dans la perméabilité sang-organe. Même si la majorité des molécules diffusent passivement au travers de la BHE, plus une molécule est lipophile, plus elle sera susceptible d'être le substrat d'un transporteur d'efflux, tel que la P-gp. D'un autre côté, une molécule hydrophile ne sera pas en mesure de diffuser passivement au travers de la membrane. L'utilisation de cellules et la création de modèles *in vitro* les utilisant permettent d'obtenir un plus grand nombre d'information que les modèles précédemment décrits. Néanmoins, ces modèles sont plus coûteux, et ils nécessitent plus de matériels et d'expertise. Les premiers modèles cellulaires décrits utilisaient des cellules primaires. L'avancement des méthodes de biologie moléculaire a permis le développement de cellules immortalisées créées à partir de cellules primaires spécialisées, telles que les ECs de la BHE. Plus récemment, ces avancées ont permis l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (*Induced pluripotent stem cells*, iPSC) qui sont dérivées en ECs de la BHE. Ces trois différents types cellulaires présentent tous des avantages et des inconvénients. Les cellules immortalisées sont moins coûteuses, plus faciles à entretenir, et possèdent moins de variations entre lots. Cependant, elles ne possèdent que très peu des caractéristiques des cellules *in vivo* du tissu dont elles ont été obtenues. Les iPSC sembleraient induire des cellules proches des caractéristiques *in vivo*. Les iPSC sont des cellules difficiles à obtenir, demandant des techniques de culture et des milieux très spécifiques. De plus, l'induction des cellules souches en cellules spécialisées ne produit pas de culture hautement enrichie. Les cellules primaires sont un compromis entre ces deux types de culture. Elles sont plus faciles à obtenir que les cellules souches, mais sont plus coûteuses et fragiles que les cellules immortalisées. Différentes techniques ont également été développées pour représenter la BHE. Le choix du type cellulaire ainsi que de la structure dans laquelle les cellules sont utilisées a permis la conception de nombreux modèles *in vitro* de la BHE [151, 149]. Dans

cette section, nous présenterons brièvement les différents types cellulaires, ainsi que les techniques permettant la mesure de la perméabilité au travers de la BHE. D'autres informations sont présentes dans les introductions et les discussions des chapitres II et III.

### Les différents types de cellules

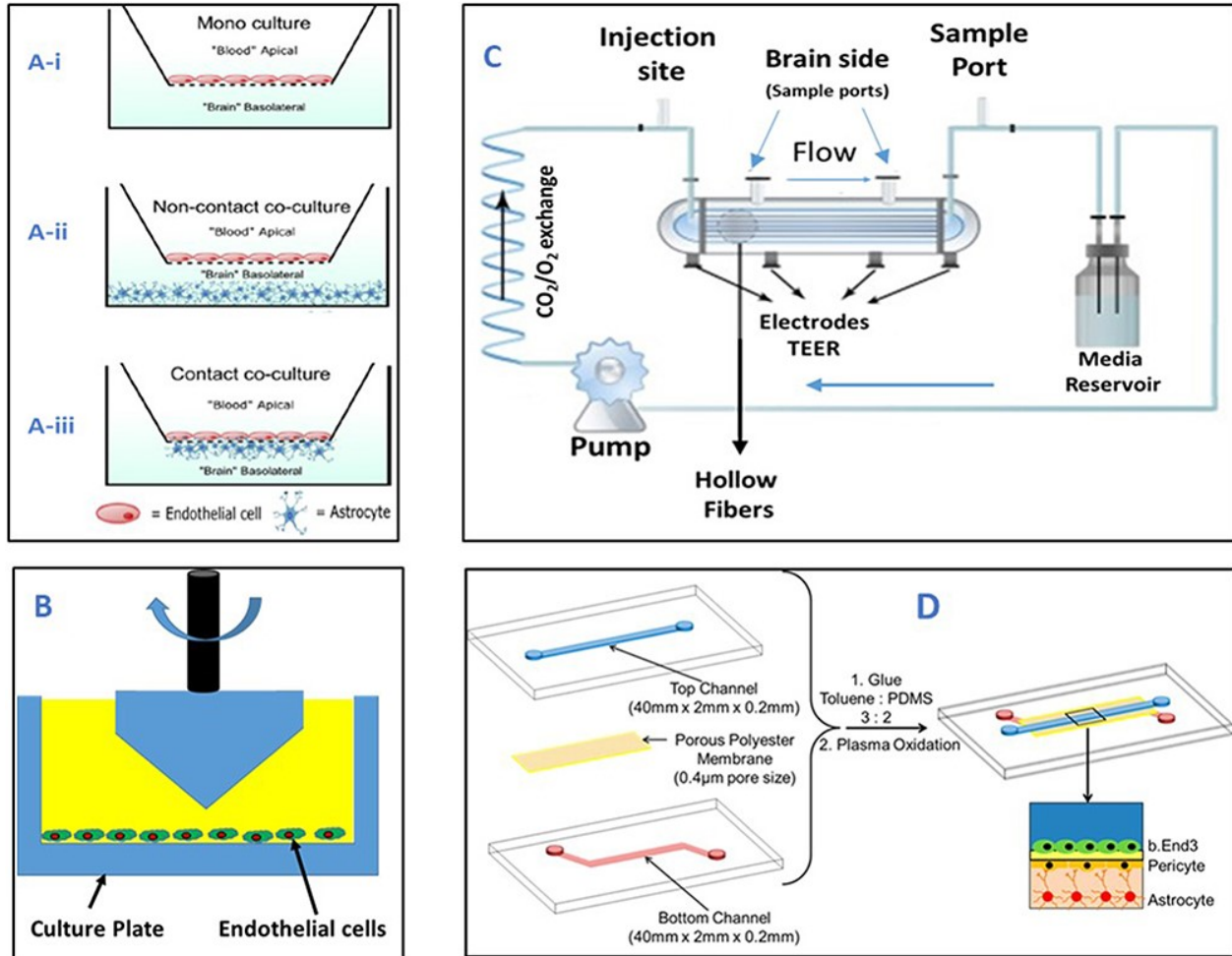
Le dilemme le plus commun lors du développement d'un modèle *in vitro* de la BHE est de savoir quel type de culture cellulaire utiliser. Le choix peut se porter sur trois différents types : les cellules immortalisées, les cellules primaires ou encore les iPSCs. Quel que soit le type de culture choisi, il est possible d'avoir des cellules de l'espèce humaine ; cependant, selon le type de culture employé, les cellules humaines ne sont pas forcément les plus adaptées.

**Les cellules immortalisées** sont des cellules le plus souvent faciles à cultiver, ne nécessitant pas de milieu de culture enrichi et dont le coût d'utilisation est le plus faible. Cependant, ces cellules ont, en général, perdu de nombreuses caractéristiques que l'on retrouve normalement *in vivo*. C'est, par exemple, le cas de l'expression de certaines jonctions, transporteurs mais également récepteurs des ECs. Ces cellules sont donc intéressantes pour le développement rapide d'étude de perméabilité, et elles peuvent potentiellement apporter plus d'informations qu'un modèle acellulaire, tout en restant un modèle simple et peu coûteux à mettre en place [98, 164].

**Les cellules primaires** sont isolées fraîchement chez l'espèce désirée. Un des avantages de ces cellules est leur capacité à conserver leurs caractéristiques *in vivo*. Utilisées dans un modèle adapté et validé, elles peuvent permettre la réduction du nombre d'animaux car le modèle de BHE ainsi formé pourra être aussi informatif que certaines techniques *in vivo*. Les inconvénients sont que les cellules nécessitent tout de même le sacrifice d'animaux ou, chez l'humain, l'utilisation de tissus pathologiques. De plus, le temps d'isolation des cellules d'intérêt combiné à l'utilisation de conditions de cultures spécifiques rend leur usage dispendieux comparé aux cellules immortalisées. La variation entre isolations peut être problématique selon les applications ; de plus, certaines cellules primaires ne se conservent pas dans l'azote liquide [98, 164].

**Les cellules souches** sont des cellules qui ont la possibilité de se diviser en un très grand nombre de cellules spécialisées. Les iPSC sont des cellules spécialisées que l'on a modifiées afin qu'elles retournent à l'état de cellules souches. Ce type de cellules peut donc être utilisé pour induire des ECs qui seront employées dans différents modèles de la BHE. Les iPSC permettent d'obtenir une grande quantité de cellules ; cependant, le protocole pour les obtenir nécessite plusieurs étapes de différenciation. Le résultat obtenu peut également varier selon la source de cellules utilisée initialement. De plus, la proportion de cellules induites n'est pas de 100 %, ce qui peut conduire à des problèmes de contamination lors de la création d'un modèle de BHE. Un avantage certain de cette méthode est la possibilité d'utiliser des cellules de patients pour produire des ECs de la BHE. Ce type de cellules permettrait l'étude de la BHE de nombreuses pathologies [165].

Les types de culture cités précédemment sont à la base de la création de modèles *in vitro* de la BHE (Fig 1.14). Ainsi, différentes techniques utilisant ces cellules sont présentées ci-dessous. Les techniques sont principalement utilisées pour déterminer la perméabilité d'une molécule, d'une protéine, ou d'un vecteur thérapeutique. Dans le cas de certaines techniques, les cellules sont utilisées dans l'étude des mécanismes impliqués dans la perméabilité dans des conditions saines ou pathologiques.



**Figure 1.14 – Représentation schématique des différents modèles de BHE *in vitro*.**

(A) Configurations pour les modèles statiques Transwell® utilisant des ECs (i) Modèles monocouches : construits en utilisant des ECs sur la face supérieure de la membrane semi-perméable microporeuse, (ii) Co-culture sans contact : ACs ensemencés au fond des puits de culture avec des ECs; (iii) Modèles de contact de co-culture 2D : les ECs sont cultivées sur la membrane d'un côté avec les ACs de l'autre. (B) Le modèle conique. (C) Modèle dynamique de la BHE : les ECs sont cultivées à l'intérieur des fibres recouvertes de fibronectine. Les ACs peuvent être cultivés sur la surface externe des fibres. (D) Modèles BHE basés sur la microfluidique : canaux polydiméthylsiloxane (PDMS) en couches prenant en sandwich une membrane en polyester et l'organisation des cellules endothéliales bEnd.3, des péricytes et des astrocytes dans le modèle de co-culture. Reproduit et modifié avec permission de Dove Press Limited [151].

### **Le modèle statique, Transwell®**

L'utilisation de plaque à puits Transwell® est une méthode standard dans l'étude de la perméabilité *in vitro* de composés (Fig 1.14-A). Cette technique est utilisée également pour les essais

d'absorption au niveau de la barrière gastro-intestinale. Contrairement au modèle PAMPA-BBB, les puits sont composés de filtres de polyester que l'on recouvre avec du collagène de type I ou IV. Les cellules endothéliales sont ensuite déposées dans le compartiment apical, plus communément appelé compartiment donneur. Les ECs, selon l'espèce et le type de culture, mettront environ une semaine à former une monocouche étanche. L'étanchéité de la barrière, ainsi formée, est mesurée par plusieurs méthodes telles que la résistance électrique trans endothéliale (*Trans endothelial electrical resistance*, TEER, voir 1.4.4.1) et la mesure de perméabilité d'un marqueur paracellulaire. Une fois la barrière formée, la molécule à tester sera déposée dans le compartiment donneur (apical). Selon la méthode de mesure utilisée, un ou des échantillons seront prélevés dans l'autre compartiment, le compartiment receveur (basolatéral). La perméabilité au travers de la BHE sera calculée à partir des valeurs de concentrations des échantillons obtenus. L'utilisation d'un seul type cellulaire est le plus pratique car la méthode ne nécessite pas de coordonner la croissance d'autres types cellulaires. Cette technique a également l'avantage d'être automatisable mais également de permettre l'étude de tous les mécanismes de l'absorption. Ces études sont facilitées par l'accès direct aux cellules et la facilité d'observation de ces dernières. Cependant, dans le cas des ECs de la BHE, il a été démontré que l'utilisation d'un autre type cellulaire (ACs principalement, ou encore PCs) améliore l'expression des jonctions ainsi que des transporteurs. L'utilisation des trois types cellulaires de la BHE a également montré un effet positif sur l'expression de marqueurs des ECs de la BHE. Cependant, l'ajout d'un ou plusieurs types cellulaires augmente rapidement la complexité du modèle, son coût, mais également sa reproductibilité. Les avantages cités précédemment font de ce modèle un très bon choix pour le criblage de molécules à plus ou moins haut débit. De plus, malgré des améliorations constantes des conditions d'isolation et de culture, de nombreux marqueurs des ECs ne sont pas exprimés au même niveau qu'*in vivo*. Ce constat est expliqué par la nature statique du modèle Transwell<sup>®</sup> due à l'absence de forces, telles que les contraintes de cisaillement. C'est dans l'optique d'améliorer les propriétés *in vitro* du modèle de BHE Transwell<sup>®</sup> que les modèles dynamiques, tels que la microfluidique, ont été développés [151, 164, 149].

### Les modèles dynamiques

L'utilisation de modèles incluant un flux de milieu générant une contrainte de cisaillement (Shear stress,  $\tau$ ) (Fig 1.14-B,C,D). Induit chez les ECs une plus grande expression des transporteurs des jonctions, telles que la ZO-1, qui conduisent à une diminution de la perméabilité. On trouve trois modèles différents : conique, dynamique, et microfluidique.

**Le modèle conique** a été développé initialement pour induire un  $\tau$  en utilisant un cône rotatif plongé dans le milieu de culture des cellules (Fig 1.14-B). Le problème d'un tel modèle, en plus de ne pas être pratique et de n'utiliser qu'un seul type de cellule, est qu'il produit des forces non uniformes sur la monocouche. Ce modèle est donc très peu utilisé [151].

**Le modèle dynamique** permet l'utilisation de différents types cellulaires tout en induisant une  $\tau$  (Fig 1.14-C). Le modèle dynamique est composé de deux compartiments séparés par des fibres poreuses. Les ECs sont cultivées à l'intérieur des fibres et les ACs sont cultivés sur l'extérieur. Par un système de pompe, le milieu de culture est poussé dans les tubulures pour atteindre une  $\tau$  proche des valeurs physiologiques ( $5 - 23 \text{ dynes/cm}^2$ ). Ce type de modèle a principalement été utilisé pour étudier différentes pathologies telles que l'ischémie ou encore l'épilepsie. Cependant, le modèle dynamique comporte de trop nombreux désavantages : il n'est pas possible d'observer directement les ECs dans les fibres, le nombre de cellules requis pour construire un seul modèle est très élevé (environ  $1 \times 10^6$ ), et pour finir, plus de jours sont nécessaires afin d'atteindre la formation d'une barrière que pour un modèle statique. Ce modèle n'est donc pas adapté au criblage de molécules. Afin de combler les lacunes du modèle précédent, le modèle microfluidique a été développé [151].

**Le modèle microfluidique** est composé de deux canaux séparés par une membrane poreuse (Fig 1.14-D). Cet agencement permet la culture des ECs et des ACs de part et d'autre de la membrane. Chaque canal, contenant le milieu de culture, est relié à une pompe qui induira la  $\tau$ . De plus, certains modèles possèdent des électrodes de chaque côté de la membrane, ce qui permet une lecture de la TEER. Contrairement au modèle dynamique, le nombre de cellules utilisées est réduit et les canaux font seulement entre 2 et 5 mm de large. La présence des deux chambres, le petit volume, ainsi que la possibilité de prélever facilement le milieu de culture font que le modèle microfluidique est utilisé pour l'étude de la perméabilité. D'autres modèles, tel que les *Organ Chips*, sont en cours de développement afin d'améliorer les contacts entre les cellules ainsi que la représentativité du modèle comparé à l'*in vivo* [166]. Le modèle microfluidique est intéressant, mais son coût d'utilisation ainsi que son matériel plus spécialisé limitent son utilisation dans le criblage à haut débit [151, 149].

## 1.4.4 Les formules associées à l'étude de la perméabilité

### 1.4.4.1 La résistance électrique trans endothéliale

La TEER a été mesurée pour la première fois en 1987 [47]. Cette mesure est, par la suite, devenue un des standards utilisés pour évaluer l'étanchéité de la construction de modèle de la BHE. En effet, il a été démontré qu'une valeur de TEER élevée est en lien avec la présence d'un modèle étanche aux passages des ions. Les flux d'ions de part et d'autre de la membrane sont grandement limités lorsque les cellules sont jointives et, par extension, que la formation des jonctions serrées est présente [47].

La TEER se mesure en mettant en vis-à-vis deux électrodes de part et d'autre de la membrane. Les électrodes sont alors reliées à un potentiomètre. Lors de la mesure, la tension et l'intensité étant constantes, on pourra calculer la résistance du modèle en appliquant la loi d'Ohm. La valeur

de résistance obtenue sera alors multipliée par la surface pour obtenir la TEER (Equation 1.1).

$$TEER = R_{cellules} - R_{filtre} \times S \quad (1.1)$$

Avec la TEER en  $\Omega \cdot cm^2$ , le  $R_{cellules}$  étant la résistance en  $\Omega$  d'un puits contenant les cellules et le  $R_{filtre}$  étant la résistance d'un puits contenant seulement le filtre. Pour finir,  $S$  est la surface du puits testé.

Néanmoins, la mesure de TEER seule ne suffit pas ; en effet, selon les modèles, une variation de TEER n'entraîne pas forcément un changement significatif de la perméabilité paracellulaire. La TEER doit être accompagnée de la mesure de perméabilité d'un marqueur paracellulaire. Ce marqueur ne doit pas être un ligand pour un récepteur ou un substrat de transporteur. De tels marqueurs permettent de vérifier, en plus des mesures de TEER, que le modèle construit est bien composé de cellules jointives [47].

#### 1.4.4.2 La vitesse d'absorption

Il y a deux composantes fondamentales pour étudier la perméabilité au travers de la BHE. La première est **la vitesse d'absorption** au niveau du cerveau à l'état initial. La deuxième est l'étendue de l'exposition cérébrale à l'état d'équilibre. Les techniques discutées précédemment sont développées pour étudier l'un de ces deux facteurs. La vitesse d'absorption est une mesure de la perméabilité au travers de la BHE, notée  $P_e$  ou  $P_{app}$  ( $cm \times s^{-1}$ ). Cette valeur nous indique la vitesse à laquelle un composé va traverser la barrière [146]. Ainsi un composé substrat de transporteurs à influx verra sa perméabilité augmentée comparée à de la diffusion passive qui sera aussi bien plus rapide que si le composé est substrat d'un transporteur à efflux. Le classement des molécules sera donc : influx > passif > efflux. Cependant cette valeur ne nous renseigne pas sur le temps qu'il faut au composé pour atteindre l'équilibre entre le sang et le cerveau.

**L'étendue d'exposition** est mesurée comme le ratio de la quantité dans le cerveau sur la quantité dans le sang qui sera ensuite transformé en utilisant le logarithme. Cette valeur est rapportée comme étant le log BB (Equation 1.2)[146].

$$\log BB = \log (C_{brain}/C_{blood}) \quad (1.2)$$

Avec la  $C_{brain}$  qui est la concentration mesurée dans le cerveau et la  $C_{blood}$  qui est la concentration mesurée dans le plasma. Ce ratio est utilisé pour comparer l'exposition du cerveau comparé à l'exposition du sang lorsque l'on approche de l'état d'équilibre. Lors de la diffusion passive de la molécule, en absence de l'action de transporteur, à l'état d'équilibre la concentration dans le cerveau sera la même que dans le sang. Ainsi, lorsque la molécule est substrat d'un transporteur à efflux, la concentration dans le cerveau diminuera, ainsi que le ratio cerveau/sang. *A contrario*,



si la molécule est substrat d'un transporteur à influx, le ratio sera augmenté. Malgré cela, un fort ratio cerveau/sang ne traduit pas une meilleure exposition. En effet, une molécule doit être libre pour agir sur son site d'action. Ainsi, si une molécule possède un faible ratio mais que la quantité de molécule libre est suffisante, la molécule aura un effet thérapeutique. Un exemple intéressant est le midazolam qui possède un ratio faible, inférieur à 1, mais est pourvu d'un effet thérapeutique. Les composés peuvent avoir une grande vitesse mais seulement une faible exposition et *vice versa*, ce qui implique que des composés peuvent avoir la même valeur de ratio cerveau/sang mais posséder une différence de perméabilité importante. La perméabilité et le ratio cerveau/sang, soit la vitesse d'absorption et l'exposition d'un composé, sont donc les seules mesures nous permettant d'apprécier la capacité d'un composé à traverser la BHE [167].

Pour mesurer la perméabilité au travers d'une membrane, deux calculs sont utilisés. Le premier calcul est la **perméabilité apparente de la molécule testée**. Cette méthode standard est très utilisée dans l'industrie pharmaceutique. En partant de la loi de diffusion de Fick (Equation 1.3).

$$J = P_e C_1 - C_2 \quad (1.3)$$

Avec  $J$  étant le flux à travers la membrane ( $mol \times s^{-1} \times cm^{-2}$ ),  $P_e$  est le coefficient de perméabilité (propriété de la substance) ( $cm \times s^{-1}$ ), et  $C_1 - C_2$  ( $mol \times mL^{-1}$ ) est la différence de concentration entre le compartiment donneur (1) et receveur (2). Si l'on considère que la concentration dans le puits receveur est négligeable, nous sommes alors dans des conditions sink, ce qui permet d'ignorer les changements de gradient de concentration. Dans ce cas-là, l'équation se simplifie (Equation 1.4).

$$J = P_e \times C_1 \equiv P_e = JC_1 \quad (1.4)$$

Ainsi on peut calculer de façon empirique la perméabilité apparente (Equation 1.5) d'une molécule et la classer en fonction d'un groupe.

$$P_{app} = (dQ/dt) \times (1/C_0 A) = C_r \times V_r/t \times A \times C_0 \quad (1.5)$$

Avec  $P_{app}$  étant la perméabilité apparente ( $cm \times s^{-1}$ ),  $dQ/dt$  est l'augmentation de la quantité de médicament ( $mol$ ) dans le compartiment receveur par intervalle de temps ( $s$ ),  $C_0$  est la concentration initiale dans le puit donneur ( $mol \times mL^{-1}$ ) et  $A$  est l'aire de la membrane ( $cm^2$ ).  $C_r$  et  $V_r$  sont respectivement la concentration ( $mol \times mL^{-1}$ ) et le volume receveur ( $mL$ ) à  $t$  un temps donné ( $s$ ).  $P_{app}$  n'est pas corrigée par rapport au filtre et ne tient pas compte de l'effet des transporteurs. Cependant, si le filtre est suffisamment poreux, que la couche cellulaire est suffisamment étanche (pour limiter la diffusion passive des molécules à travers les jonctions et la voie paracellulaire) et que les couches d'eau non agitées sont minimisées, alors un classement utile de la perméabilité des

médicaments peut être obtenu via ce calcul.

Le deuxième calcul est **la perméabilité mesurée en utilisant le principe de clairance** pour obtenir une valeur qui est indépendante de la concentration. Le volume de la clairance représente le plus petit volume virtuel déplacé pour apporter la molécule dans l'autre compartiment. Calculé selon l'équation 1.6 :

$$\text{Cleared volume (mL)} = (C_{\text{compart. receveur}} \times V_{\text{compart. receveur}}) / C_{\text{compart. donneur}} \quad (1.6)$$

Avec la  $C_{\text{compart. receveur}}$  étant la concentration du compartiment receveur ( $\text{mol} \times \text{mL}^{-1}$ ),  $V_{\text{compart. receveur}}$  étant le volume du compartiment receveur ( $\text{mL}$ ),  $C_{\text{compart. donneur}}$  la concentration de la molécule dans le compartiment donneur ( $\text{mol} \times \text{mL}^{-1}$ ). Le volume cumulatif est ensuite déterminé à plusieurs temps et la perméabilité de la surface (PS,  $\text{mL} \times \text{s}^{-1}$ ) en fonction de la surface du filtre ( $\text{cm}^2$ ) est calculée en déterminant la pente de la droite du volume cumulatif en fonction du temps. La PS de la monocouche de cellules est calculée en utilisant l'équation 1.7.

$$1/PS_{\text{monocouche}} = 1/PS_{\text{total}} - 1/PS_{\text{filtre seul}} \quad (1.7)$$

Avec  $PS_{\text{monocouche}}$  ( $\text{cm}^3 \times \text{s}^{-1}$ ) étant le produit de la  $P_e$  de la monocouche de cellules en fonction de la surface du filtre ( $\text{cm}^2$ );  $PS_{\text{total}}$  est le produit de la  $P_e$  du modèle testé (monocouche et filtre) en fonction de la surface du filtre ( $\text{cm}^3 \times \text{s}^{-1}$ );  $PS_{\text{filtre seul}}$  est le produit de la  $P_e$  du filtre seul en fonction de la surface du filtre ( $\text{cm}^3 \times \text{s}^{-1}$ ). La valeur ainsi obtenue est divisée par la surface pour obtenir le coefficient de perméabilité ( $P_e$ )(Equation 1.8).

$$P_e (\text{cm/s}) = PS_{\text{monocouche}} / S_{\text{filtre}} \quad (1.8)$$

Cette méthode a l'avantage d'offrir une valeur de perméabilité qui peut être comparée pour des essais réalisés dans différents modèles *in vitro* et *in vivo*. En effet, comme la valeur de perméabilité est proportionnelle à la mobilité du médicament (indépendamment de la concentration) dans le système testé, cette valeur changera d'un système à l'autre, mais pour des raisons précises liées à l'état de la membrane [168, 164].

## 1.5 Hypothèse et objectifs de recherche

### 1.5.1 Hypothèse de recherche

De nombreux phénomènes biologiques de la BHE ne sont pas encore entièrement connus. Les zones d'ombre sont, à l'heure actuelle, une part essentielle des travaux de recherche menés. Le manque de connaissance est l'une des principales causes de l'échec dans le développement de mé-

dicaments destinés au SNC ou dans la compréhension de certaines pathologies affectant le cerveau [20]. Une des méthodes pour améliorer notre compréhension de la BHE est l'utilisation de modèles. Les modèles *in vitro* ne sont pas toujours validés pour leurs fiabilités à prédire la perméabilité *in vivo* des médicaments. De plus, certains des modèles *in vitro* ne permettent pas d'étudier finement les mécanismes de la perméabilité des médicaments. Finalement, les modèles actuels sont principalement axés sur l'étude de la perméabilité dans des conditions non pathologiques. Notre hypothèse de recherche est que :

*Le développement et la validation d'un modèle in vitro composé de cellules primaires de la BHE permettrait l'étude de la perméabilité des médicaments et des mécanismes sous-jacents dans différentes conditions saines et pathologiques.*

Nous formulons les sous- hypothèses suivantes qui sont évaluées dans les différents chapitres mentionnés :

#### **Chapitre 2 :**

- Il est possible d'isoler et d'enrichir des cellules de la BHE provenant du cerveau de souris.
- Les cellules isolées et enrichies conservent des caractéristiques essentielles de l'*in vivo*.
- Les cellules primaires isolées peuvent être utilisées pour former un modèle *in vitro* de BHE.

#### **Chapitre 3 :**

- Les cellules primaires isolées expriment davantage de marqueurs de la BHE que les cellules immortalisées.
- Les cellules primaires forment un modèle de BHE plus proche de l'*in vivo* que les cellules immortalisées.
- Le modèle de BHE composé de cellules primaires donne des valeurs de perméabilité *in vitro* qui corrélerent le mieux avec la perméabilité *in vivo* comparée aux modèles sans ou avec cellules immortalisés.

#### **Chapitre 4 :**

- Le modèle de BHE peut être inflammé pour produire un modèle pathologique.
- Le modèle de BHE pathologique influence la perméabilité des petites molécules.
- Le modèle de BHE pathologique peut être utilisé pour étudier les mécanismes modifiés par l'inflammation impactant la perméabilité.

### 1.5.2 Objectifs de recherche et méthodologies

Nous avons vu dans l'introduction que le modèle *in vivo* est le plus pertinent pour l'étude de la perméabilité. Cependant, un modèle humain *in vivo* préclinique n'existant pas, différentes espèces sont utilisées. Ces espèces présentent des variations physiologiques plus ou moins importantes avec l'humain mais leurs principaux défauts sont leurs coûts et la difficulté d'isoler et d'observer directement les phénomènes ayant lieu au niveau de la BHE. L'utilisation de modèles *in vivo* est donc réservée aux dernières phases des études précliniques du médicament. Il y a donc un intérêt certain dans l'utilisation de modèles *in vitro* qui seraient moins dispendieux et chronophages mais qui permettraient de prédire le plus fidèlement possible la perméabilité attendue *in vivo*. Parmi les différents modèles *in vitro*, disponibles le plus standard à l'heure actuelle est le modèle Transwell® utilisant des cellules. Cet assemblage, composé de deux compartiments séparés par un filtre recouvert d'une matrice et de cellules, est celui qui semble offrir le meilleur compromis en termes de temps, d'informations obtenues, ainsi que de coût. Néanmoins, ce modèle peut être raffiné selon les cellules utilisées. Ainsi, les trois types de cultures disponibles actuellement sont les cellules immortalisées, les cellules primaires, et les iPSC. Ici, le meilleur compromis semble être les cellules primaires, qui conservent plus de caractéristiques *in vivo* de la BHE que les cellules immortalisées et sont plus facilement obtenues que les iPSC.

### 1.5.3 Objectif 1 — Isoler et caractériser les cellules de la barrière hémato-encéphalique

Le choix de l'espèce est la souris, pour les différentes raisons précédemment évoquées (voir 1.4.1.1) : le nombre de publications, le coût, et la disponibilité, dont celle de souches knock-out. Nous avons également vu que l'isolation et l'enrichissement des cellules endothéliales, des péricytes, et des astrocytes ont fait l'objet de nombreuses recherches (voir 1.2). Cependant, les différents protocoles présents dans la littérature scientifique ne rapportent pas toutes les informations nécessaires pour comparer et apprécier leurs disparités. Ainsi, le développement d'un protocole regroupant l'isolation des trois types cellulaires majeurs de la BHE, incluant leurs caractérisations et l'étude de leurs fonctionnalités, était notre premier objectif.

### 1.5.4 Objectif 2 — Développer et valider un modèle de BHE pour l'étude de la perméabilité

L'utilisation de cellules primaires, qui nécessite des sacrifices d'animaux, doit démontrer une forte valeur ajoutée dans la formation d'un modèle de BHE. Notre intérêt dans le développement d'un modèle de la BHE *in vitro* est qu'il nous donne la possibilité de calculer une valeur de perméabilité

qui sera le reflet le plus proche possible de la capacité de la molécule à traverser la BHE *in vivo*. Cette information peut être obtenue avec un modèle composé de cellules immortalisées ou même en l'absence de cellules. C'est pour cette raison que nous devons nous assurer que le modèle de BHE composé de cellules primaires serait plus pertinent à représenter la BHE *in vivo* que des modèles composés de cellules immortalisées ou seulement formées d'un revêtement de lipides.

### 1.5.5 Objectif 3 — Application du modèle à l'étude de la perméabilité dans un contexte pathologique

Dans la plupart des cas, l'utilisation de médicaments destinés au SNC a lieu dans un contexte où la BHE est inflammée. Nous avons vu précédemment que cette inflammation est responsable de différents changements physiologiques et morphologiques au niveau de la BHE. De plus, il est maintenant couramment accepté que des changements d'expression de jonctions ou de transporteurs influent sur la capacité de la BHE à former une barrière étanche et sélective. La BHE inflammée serait donc plus perméable, ce qui pourrait induire une exposition supérieure du SNC au médicament. Cette perméabilité doit donc être évaluée, mais également les mécanismes qui sont impactés par l'inflammation de la BHE. Dans ce dernier objectif, nous cherchons à utiliser le modèle précédemment validé comme modèle dans l'étude de la perméabilité des molécules dans des conditions d'inflammation.

## 1.6 Contribution des auteurs

Contribution des auteurs aux articles scientifiques présentés dans cette thèse, selon la [taxonomie CRediT](#). De plus, je déclare avoir réalisé au minimum la moitié des travaux de recherche qui ont conduit à la rédaction des articles proposés. Je déclare également avoir participé activement à la rédaction et à la correction des articles proposés.

† : Les auteurs marqués de ce symbole sont copremiers auteurs.

### 1.6.1 Article 1

Bernard-Patrzynski F<sup>†</sup>, Lécuyer M-A<sup>†</sup>, Puscas I, Boukhatem I, Charabati M, Bourbonnière L, Ramassamy C, Leclair G, Prat A and Roullin VG. *Isolation of endothelial cells, pericytes and astrocytes from mouse brain*. PLOS ONE. 2019;14(12):e0226302. [10.1371/journal.pone.0226302](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226302).

**Bernard-Patrzynski F** : Conception de l'étude, méthodologie, analyse formelle, investigation réalisation des expériences, collecte de données et de preuves, conservation des données, rédaction du

manuscrit, visualisation et présentation des données.

**Lécuyer M-A** : Ressources, investigation, réalisation des expériences, conservation des données, rédaction du manuscrit

**Puscas I** : Investigation, réalisation des expériences, examen critique du manuscrit.

**Boukhatem I** : Investigation, réalisation des expériences, examen critique du manuscrit.

**Charabati M** : Méthodologie, examen critique du manuscrit.

**Bourbonnière L** : Ressources, examen critique du manuscrit.

**Ramassamy C** : Acquisition du soutien financier, examen critique du manuscrit.

**Leclair G** : Acquisition du soutien financier, validation, examen critique du manuscrit.

**Prat A** : Méthodologie, administration du projet, acquisition du soutien financier, validation, examen critique du manuscrit.

**Roullin VG** : Méthodologie, conception de l'étude, administration du projet, acquisition du soutien financier, validation, rédaction du manuscrit et examen critique du manuscrit.

#### 1.6.1.1 Acquisition des données brutes menant aux figures

**Bernard-Patrzynski F** : 2.1 ; 2.2-a,b ; 2.3 ; 2.4-a,b (NaF) ; 2.5-b,c ; S2.1 ; S2.2-a,b ; S2.5 ; S2.6 ; S2.7 ; S2.8 ;

**Lécuyer M-A** : 2.2-c,d,e ; S2.2-a,b ; S2.3 ; S2.4

**Puscas Ina** : 2.4-a,b (150kDa-Dextran)

**Boukhatem I** : 2.5-a

#### 1.6.1.2 Traitements, analyses et présentations des données

**Bernard-Patrzynski F** : Toutes les figures

### 1.6.2 Article 2

Puscas I<sup>†</sup>, Bernard-Patrzynski F<sup>†</sup>, Jutras M, Lécuyer M-A, Bourbonnière L, Prat A, Leclair G and Roullin VG. *IVIVC Assessment of Two Mouse Brain Endothelial Cell Models for Drug Screening*. *Pharmaceutics*. 2019;11(11). [10.3390/pharmaceutics11110587](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110587).

**Puscas I** : Conception de l'étude, méthodologie, analyse formelle, investigation réalisation des expériences, collecte de données et de preuves, conservation des données, rédaction du manuscrit, visualisation et présentation des données.

**Bernard-Patrzynski F** : Conception de l'étude, méthodologie, analyse formelle, investigation réalisation des expériences, collecte de données et de preuves, conservation des données, visualisation et présentation des données, examen critique du manuscrit.

**Jutras M** : Méthodologie, ressources, examen critique du manuscrit.

**Lécuyer M-A** : Méthodologie, Examen critique du manuscrit.

**Bourbonnière L** : Méthodologie, Examen critique du manuscrit.

**Prat A** : Acquisition du soutien financier, examen critique du manuscrit.

**Leclair G** : Conception de l'étude, méthodologie, acquisition du soutien financier, validation, examen critique du manuscrit.

**Roullin VG** : Méthodologie, conception de l'étude, administration du projet, acquisition du soutien financier, validation, rédaction du manuscrit et examen critique du manuscrit.

### 1.6.2.1 Acquisition des données brutes menant aux figures

**Puscas I** : 3.1 ; 3.3 ; 3.4 ; 3.5-b,c,d ; S3.2 ; S3.3 ; S3.4 ; S3.5

**Bernard-Patrzynski F** : 3.2 ; 3.5-a,d ; S3.1

### 1.6.2.2 Traitements, analyses et présentations des données

**Puscas I** : 3.1 ; 3.3-b ; 3.4 ; S3.2 ; S3.3 ; S3.4 ; S3.5

**Bernard-Patrzynski F** : 3.2 ; 3.3-a ; 3.5-a,b,c,d ; S3.1 ; S3.5

## 1.6.3 Article 3

Bernard-Patrzynski F, Lécuyer M-A, Ramassamy C, Prat A, Leclair G and Roullin VG. *Acute inflammation of the blood-brain barrier has an unexpected impact on the permeability of small drugs in a validated in vitro model.* Article écrit pour le journal : journal of pharmaceutical sciences.

**Bernard-Patrzynski F** : Conception de l'étude, méthodologie, analyse formelle, investigation réalisation des expériences, collecte de données et de preuves, conservation des données, rédaction du manuscrit, visualisation et présentation des données.

**Lécuyer M-A** : Méthodologie, examen critique du manuscrit.

**Ramassamy C** : Acquisition du soutien financier, examen critique du manuscrit.

**Prat A** : Acquisition du soutien financier, examen critique du manuscrit.

**Leclair G** : Conception de l'étude, méthodologie, acquisition du soutien financier, validation, examen critique du manuscrit.

**Roullin VG** : Méthodologie, conception de l'étude, administration du projet, acquisition du soutien financier, validation, rédaction du manuscrit et examen critique du manuscrit.

### 1.6.3.1 Acquisition des données brutes menant aux figures

**Bernard-Patrzynski F** : 4.1 ; 4.2 ; 4.3\* ; 4.4 ; S4.1 ; S4.2 ; S4.3

\* Les données de séquençage ont été obtenues via la plateforme de génomique de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC) de l'Université de Montréal.

### **1.6.3.2 Traitements, analyses et présentations des données**

**Bernard-Patrzynski F** : 4.1 ; 4.2 ; 4.3\* ; 4.4 ; S4.1 ; S4.2 ; S4.3

\* Les données de changement d'expression ont été obtenues via la plateforme de bioinformatique de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC) de l'Université de Montréal.



## Chapitre 2

### ***Article 1 - Isolation of Endothelial Cells, Pericytes and Astrocytes from Mouse Brain.***

Florian Bernard-Patrzynski<sup>†,1</sup>, Marc-André Lécuyer<sup>†,2,3</sup>, Ina Puscas<sup>1</sup>, Imane Boukhatem<sup>1</sup>, Marc Charabati<sup>2</sup>, Lyne Bourbonnière<sup>2</sup>, Charles Ramassamy<sup>4</sup>, Grégoire Leclair<sup>1</sup>, Alexandre Prat<sup>2</sup> and V Gaëlle Roullin<sup>2</sup>

† these authors equally contributed to this work.

1. Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada.
2. Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada.
3. Institute for Multiple Sclerosis Research and Neuroimmunology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany
4. Institut national de la recherche scientifique - Armand-Frappier Institute, Laval, Québec, Canada.

Published: December 18, 2019 in PlosONE, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226302>

## 2.1 Abstract

Primary cell isolation from the central nervous system (CNS) has allowed fundamental understanding of blood-brain barrier (BBB) properties. However, poorly described isolation techniques or suboptimal cellular purity has been a weak point of some published scientific articles. Here, we describe in detail how to isolate and enrich, using a common approach, endothelial cells (ECs) from adult mouse brains, as well as pericytes (PCs) and astrocytes (ACs) from newborn mouse brains. Our approach allowed the isolation of these three brain cell types with purities of around 90%. Furthermore, using our protocols, around 3 times more PCs and 2 times more ACs could be grown in culture, as compared to previously published protocols. The cells were identified and characterized using flow cytometry and confocal microscopy. The ability of ECs to form a tight monolayer was assessed for passages 0 to 3. The expression of claudin-5, occludin, zonula occludens-1, P-glycoprotein-1 and breast cancer resistance protein by ECs, as well as the ability of the cells to respond to cytokine stimuli (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) was also investigated by q-PCR. The transcellular permeability of ECs was evaluated in the presence of pericytes or astrocytes in a Transwell<sup>®</sup> model by measuring the transendothelial electrical resistance (TEER), FITC-dextran and sodium fluorescein permeability. Overall, ECs at passages 0 and 1 featured the best properties valued in a BBB model. Furthermore, pericytes did not increase tightness of EC monolayers, whereas astrocytes did regardless of their seeding location. Finally, ECs resuspended in fetal bovine serum (FBS) and dimethyl sulfoxide (DMSO) could be cryopreserved in liquid nitrogen without affecting their phenotype nor their capacity to form a tight monolayer, thus allowing these primary cells to be used for various longitudinal *in vitro* studies of the blood-brain barrier.

## 2.2 Introduction

The blood-brain barrier (BBB) is composed of specialized endothelial cells (ECs) surrounded by two basement membranes, pericytes (PCs) and astrocytes (ACs) [1]. These ECs express high levels of tight junction proteins that strongly minimize paracellular diffusion and cellular transmigration in homeostatic conditions [2]. The presence of very few pinocytotic vesicles and a high concentration of efflux transporters has also been previously described on blood-brain barrier forming ECs [3, 4]. Together, those characteristics generate a physically sealed barrier allowing brain capillaries to control the passage of compounds from the blood into the central nervous system (CNS).

The BBB, due to its highly selective permeability, represents a major challenge to overcome in the development of new treatments targeting CNS diseases. In 2005 William M. Pardridge highlighted the necessity to improve our knowledge on the fundamental properties of the BBB [5] and since then, extensive studies have led to a better understanding of molecules, pathways and cells

able to generate and maintain the BBB [6]. These efforts have been complemented by the design of several *in vitro* models and systems to evaluate the BBB in healthy and pathological conditions. Among these *in vitro* models, endothelial cell monocultures, co-cultures and tri-cultures with pericytes and astrocytes, either in static or dynamic culture conditions, have been described [7]. One of the caveats of these *in vitro* models resides in the fact that scientists predominantly rely on immortalized cell lines, which can deviate significantly from their *in vivo* counterparts in terms of morphology and intrinsic characteristics. Furthermore, careful interpretation of previously published results is warranted due to the use of contaminated cell lines by other cell types and in some cases, the misidentification of the original cells used to generate the cell lines [8, 9].

Alternatively, isolated primary ECs, PCs and ACs used in *in vitro* models offer several advantages compared to cell lines and *in vivo* studies. The combination of primary cells allow the study of intra- and intercellular interactions without the complexity of all cellular and molecular players normally involved *in vivo* [10]. Furthermore, contrary to immortalized cell lines, primary cells are known to keep most of their *in vivo* characteristics. As such, *in vitro* models based on primary cells isolated from the BBB offer a reliable means to evaluate drug delivery [7], immune cell infiltration [11] or protein expressions under pathological conditions [12].

Primary BBB cells have been isolated from various species. The most commonly investigated originate from murine, porcine, bovine and human tissues [13]. Undoubtedly, primary human cell cultures are the best proxy to *in vivo* human cells and as such, they represent the best way to expand our knowledge of the human BBB and improve treatment of human CNS diseases. Nonetheless, mouse primary cells are still the most used in scientific studies investigating human pathologies, mainly due to their availability [7]. Indeed, mice are the most used laboratory animals worldwide and the completion of the first draft sequence of its genome in 2002 facilitated the generation of genetically-modified strains, allowing the investigation of gene-specific functions [14, 15].

In this study, three protocols used to isolate, enrich and characterize primary mouse endothelial cells, pericytes and astrocytes are presented. ECs cells were isolated from adult mouse brains (between 6 and 15 weeks old), whereas PCs and ACs were obtained from newborn mice (3-5 days old). After mechanical dissociation and enzymatic digestion, fragments of brain microvessels were used to generate enriched cell cultures. The presence of cell-specific markers was assessed in each cell type using flow cytometry and confocal microscopy. EC characteristics were further studied by measuring their ability to produce a tight monolayer and to react to cytokine stimuli. Furthermore, primary ECs were able to survive cryopreservation and display similar low permeability post-thawing, as compared to freshly isolated primary ECs. This study aims to underline various essential characterizations to be performed on freshly isolated BBB primary cells to guarantee their suitability for further investigations.

## 2.3 Materials and Methods

To abridge the text, all reagents, consumables and equipment used in this study are listed in [S2.2](#), [S2.3](#) and [S2.4](#) Tables, respectively. This study was approved by Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) of the University of Montreal. CDEA is mandated by the Canadian Council on Animal Care (CCAC). Approved protocol: 16-083-Experimentation. Mice were sacrificed by CO<sub>2</sub> in an euthanasia chamber, strictly following the animal facility guidelines.

### 2.3.1 Brain Extractions

Brains were extracted from 6-8-week-old (n=20) and 1-3-day-old (n=10), wild type male and female mice (C57Bl/6). All animals 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 (protocol # 16-083). Adult mice were euthanized with CO<sub>2</sub> whereas neonatal mice were laid onto a paper put on ice prior to being beheaded with scissors. Brains were stored in cold DMEM/penicillin/streptomycin (1×).

### 2.3.2 ECs Isolation and Enrichment

Endothelial cells (ECs) were isolated from adult mice. Each extracted brain was separated in three parts. The brains were cut along the longitudinal fissure to separate the two hemispheres and cut between the cerebellum and the midbrain to separate the cerebellum, pons and medulla from the rest of the brain. The meninges and choroid plexuses were removed by rolling the individual parts on P8 grade filter paper. A mechanical reduction was performed by mincing the brain pieces using surgical blades and then forcing them through sterile 18G, 20G and 22G needles, in this consecutive order. The homogenate was centrifuged (800 g, 8 min, 4 °C) and the precipitate was digested in DMEM containing 1.05 mg × mL<sup>-1</sup> type II collagenase and 58.5 U × mL<sup>-1</sup> type I DNase for 75 min on a benchtop orbital shaker (100 RPM) at 37 °C. The reaction was stopped by adding ice-cold DMEM and the homogenate was pelleted by centrifugation (800 g, 8 min, 4 °C). The myelin was separated by resuspending the pellet in DMEM containing 20% BSA and centrifuging (1,000 g, 20 min, 4 °C). To maximize brain microvessels recovery, the collected supernatant and floating myelin layer underwent another centrifugation cycle (same conditions), while the pellet was kept on ice. The combined pellets were then digested in DMEM containing 1 mg × mL<sup>-1</sup> collagenase/dispase and 39 U × mL<sup>-1</sup> type I DNase for 60 min on a benchtop orbital shaker (100 RPM) at 37 °C. During the digestion, a 33% continuous isotonic Percoll gradient was obtained by mixing 1 mL of 10× HBSS, 9 mL of Percoll, 1 mL of 1× HBSS and 1 mL of fetal bovine serum (FBS). The isotonic

Percoll mix was then centrifuged (30,000 g, 60 min, 4 °C). The digested homogenate was then washed in ice-cold DMEM and the homogenate was pelleted by centrifugation (800 g, 8 min, 4 °C). In order to separate microvessels from brain cellular contaminants, the pellet was resuspended in 1 ml of ice-cold DMEM and overlay on top of the cold 33% continuous isotonic Percoll gradient and then centrifuged (1,000 g, 10 min, 4 °C, slow acceleration, slow deceleration). The microvessel layer (found close to the bottom of the ultra-centrifuge tube) was collected and washed in ice-cold DMEM by centrifugation (800 g, 8 min, 4 °C). Brain microvessels were then seeded at a dilution corresponding to one brain per well on 6-well plates previously coated for 4 h with type IV collagen ( $5 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ). Microvessels were cultured in high glucose DMEM supplemented with 20% FBS, penicillin/streptomycin (1×),  $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  basic fibroblast growth factor (bFGF) [16],  $100 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  heparin [17],  $1.4 \mu\text{M}$  hydrocortisone [18],  $8.4 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Insulin/  $7.6 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Transferrin/  $10 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$  Sodium Selenite supplement (ITS) and  $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  puromycin [19]. The culture medium was replaced every other day using fresh ECs culture medium containing only  $4 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  puromycin. Once the cells reached 90–95% confluence, the cultures were passaged using 0.25% Trypsin/EDTA. Confluent cells, around 7 days after seeding the microvessels, were labelled as passage 0 (P0) ECs. Thereafter, the passage number was increased by one after each trypsinization.

### 2.3.3 PCs Isolation and Enrichment

Pericytes (PCs) were isolated from neonatal mouse brains. While the brains were kept in cold PBS, the meninges were removed from the brains under a dissection microscope. Then, the brains were mechanically minced in the same way as mentioned above in the ECs isolation protocol and the homogenate was similarly centrifuged. The cell pellet was then digested in DMEM containing  $1.05 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$  type II Collagenase and  $58.5 \text{ U} \times \text{mL}^{-1}$  type I DNase for 10 min at room temperature (RT). The reaction was stopped by adding ice-cold DMEM and the cells were collected by centrifugation (800 g, 8 min, 4 °C). The cell mixture was directly cultured in T25 flasks, at a dilution corresponding to 5 brains per flask, in low glucose DMEM (to avoid the proliferation of ECs) supplemented with 20 % FBS, penicillin/streptomycin (1×),  $42 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Insulin/  $38 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  Transferrin/  $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$  Sodium Selenite supplement (ITS),  $100 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  heparin and Smooth Muscle Growth Supplement (1x). The medium was changed two days later. Then, every other day, 50% of the volume was discarded and replaced by an equivalent volume of fresh medium. To obtain enriched pericyte cultures, the cells were trypsinized using 0.25% Trypsin/EDTA once they reached 90–95 % confluence. Following centrifugation, the cells were resuspended in fresh culture medium and were left in a flask to settle for 1 h. Subsequently, adherent cells were discarded and only the cells in suspension were kept in culture. This process was repeated after every trypsinization.

### 2.3.4 ACs Isolation and Enrichment

The astrocytes (ACs) were isolated from neonatal mouse cortices (other brain parts being discarded). While the brains were kept in cold PBS, the meninges were removed from the brains under a dissection microscope. A mechanical dissociation of the cortices was performed by passing the tissue through a 22G sterile needle. The homogenate was then centrifuged (800 g, 8 min, 4 °C) and the cell pellet was digested in DMEM containing 1.05 mg  $\times$  mL<sup>-1</sup> type II Collagenase and 58.5 U  $\times$  mL<sup>-1</sup> type I DNase for 10 min at RT. The reaction was stopped by adding ice-cold DMEM and the cells were pelleted by centrifugation (800 g, 8 min, 4 °C). The collected cell mixture was cultured in T75 flasks previously coated with poly(L-ornithine) (8  $\mu$ g  $\times$  cm<sup>-2</sup>) at a dilution corresponding to 1 brain per flask, in low glucose DMEM supplemented with 20% FBS, penicillin/streptomycin (1 $\times$ ), 15 mM HEPES. Once the cells reached 85–90 % confluence, the cultures were passaged by using 0.25% Trypsin/EDTA.

### 2.3.5 Cell Characterization

#### 2.3.5.1 Optical Microscopy

Cells were observed daily under an optical microscope, with  $\times$ 10 and  $\times$ 20 magnifications, to monitor cell growth. Images were recorded using a ZEISS AXIOVERT S100 microscope equipped with a Moticam 3+ camera.

#### 2.3.5.2 Flow Cytometry Assays

Flow cytometry (FACS) experiments were performed on a BD Biosciences LSR II flow cytometer using BD FACSDiva<sup>TM</sup> software (v8.0.1). FACS results were then analysed using FlowJo<sup>TM</sup> software (v10.0.7). Antibodies used for FACS analysis are detailed in [Table S2.5](#). Extracellular and intracellular stainings were performed as previously described [12]. Briefly, cells were trypsinized at different passages. Isolated cells were labelled with the following antibodies against surface markers: CD11b, CD45, CD31, PDGFR- $\beta$ , GFAP and GLAST-1. Cell viability was assessed with a Live/Dead marker. Intracellular staining was performed using the eBioscience fixation/permeabilization kit. The nonspecific background staining was assessed using appropriate fluorochrome-matched isotype antibodies ([Table S2.5](#)).

Cells positive for CD31 and negative for CD45, CD11b, PDGFR- $\beta$ , GFAP and GLAST-1 were identified as endothelial cells. Cells positive for PDGFR- $\beta$  and negative for CD45, CD11b, CD31, GFAP and GLAST-1 were identified as pericytes (Fig S1). Finally, cells positive for GFAP or GFAP and GLAST-1 and negative for CD45, CD11b, CD31 and PDGFR- $\beta$  were identified as astrocytes. Cells positive for CD11b, CD45<sup>int</sup> and negative for CD31, PDGFR- $\beta$ , GFAP and GLAST-1 were

identified as microglia.

### 2.3.5.3 Confocal and Fluorescence Microscopy Imaging

Cells were seeded on collagen-coated IbiTreat<sup>TM</sup>  $\mu$ -Slides VI 0.1 for ECs, iBiTreat  $\mu$ -Slide VI 0.1 for PCs and poly(L-ornithine) pre-coated  $\mu$ -Slide VI 0.1 for ACs, following the manufacturer's instructions. Briefly, the cells were diluted to reach a concentration of  $5 \times 10^5$  cells  $\times$  mL<sup>-1</sup>, then 30  $\mu$ L of cell suspensions were filled in each channel and incubated for 1 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Finally, 60  $\mu$ L of medium was added in each side reservoir. When the cells reached confluence, the medium was removed and the cells were washed three times with PBS, fixed with 70% ethanol for 5 min at room temperature and then washed again three times with PBS. The cells were subsequently permeabilized with a PBS/Tween 20 (0.05%) solution for 5 min. After permeabilization, the cells were washed and blocked with 10% species-specific sera of the secondary antibody host. The blocking solution was washed away with PBS/Tween 20 (0.05%). The cells were then incubated for 1 h at RT with primary antibodies diluted in 3% serum. Following 7 washes with PBS/Tween 20 (0.05%), the cells were incubated for 45 min at RT with secondary antibodies. Finally, the cells were covered by gelvatol reagent containing Topro-3. Each experiment included negative controls, *i.e.* cells incubated with secondary antibodies only. Primary and secondary antibody information are listed in [Table S2.6](#). Confocal fluorescence acquisition was performed using a Leica Confocal Microscope SP5 platform (Leica Microsystems). Fluorescence images were obtained with a fluorescence microscope Olympus IX81 (Olympus Corporation) equipped with a Retiga 2000R CCD camera (QImaging, Canada). Images were acquired with MetaMorph Advanced software (version 7.8.9.0). Image processing and analysis was performed using Image J (version 1.51).

## 2.3.6 Cellular Functionality

### 2.3.6.1 Cell Impedance

ECs, PCs and ACs (P1) were seeded at  $4.5 \times 10^5$  cells/well on two 8W10E+ gold electrode arrays (Applied Biophysics, Troy, NY), pre-coated with collagen type IV ( $5 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2}$ ) for ECs, and with poly(L-ornithine) ( $8.0 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2}$ ) for ACs. Cells from each cell type were seeded in 4 wells whereas the fifth (uncultured) served as a negative control. The cells were cultured in their specific media, as previously described. The impedance of the cell monolayers was measured until a plateau was reached. The impedance measurements were then recorded at 4,000 Hz over a 72h period at a rate of 16 measurements per hour. For inflammatory conditions, primary endothelial cells at passage 0 and passage 1 were allowed to grow until the impedance reached a plateau, then the medium was replaced by fresh medium containing  $100 \text{ U} \times \text{mL}^{-1}$  of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . The impedance measurements were then recorded for the following 36h. The relative resistance

was calculated by subtracting the resistance reached during the plateau phase by each resistance following treatment.

### 2.3.6.2 Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR)

ECs (P0) were used on day 7 of culture, at a concentration of 1 brain/well in four 6-well plates, whereas ECs (P1) were used seven days after cell seeding at  $1 \times 10^5$  cells/well in four 6-well plates. The confluent ECs monolayers were treated with  $100 \text{ U} \times \text{mL}^{-1}$  of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in fresh medium or fresh medium alone as negative control. Twenty-four hours later, the cells were harvested and the mRNA isolated. qPCR was performed as previously described [20] and following Pfaffl method [21]. Briefly, total mRNA was extracted from the primary culture of ECs using RNeasy Mini Kit and transcribed into cDNA using QuantiTect Reverse Transcription kit, according to the manufacturer's instructions. The cDNA was quantified using Applied Biosystems ViiA 7. The primer sequences used are listed in Table S2.7. Relative quantification (RQ) was first calculated for each gene of interest (GOI) following equation 1. Then, a normalized factor (NF) was calculated following equation 2, using three housekeeping genes: hypoxanthine phosphoribosyltransferase (Hprt), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) and TATA-box binding protein (Tbp). Finally, normalized relative quantifications were computed for each GOI following equation 2.3.

$$RQ_{GOI} = 2^{CT_{calibrator} - CT_{condition}} \quad (2.1)$$

$$NF_{experiment,sample} = (RQ_{Hprt} RQ_{Gapdh} RQ_{Tbp})^{13} \quad (2.2)$$

$$NRQ_{GOI} = \frac{RQ_{GOI}}{NF_{experiment,sample}} \quad (2.3)$$

### 2.3.6.3 Permeability

Twenty-four well Transwell<sup>®</sup> Costar inserts were pre-coated with collagen type IV ( $5 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2}$ ) or with poly-L-ornithine ( $8 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2}$ ). Five different setups were investigated: EC monolayer, EC/PC bi-culture, with PCs seeded at the bottom of the wells (B) or on the reverse side of the insert (R) and EC/AC bi-culture, with ACs seeded at the bottom of the well (B) or on the reverse side of the insert (R). First, ACs or PCs were seeded at a density of  $3 \times 10^4$  cells  $\times \text{cm}^{-2}$ , and then the inserts were seeded with ECs at a final density of  $1.5 \times 10^5$  cells  $\times \text{cm}^{-2}$ . All cells were cultured in their respective media until ECs were seeded, then only the ECs medium was used until the cells reached confluence. When necessary, the inserts were flipped over for 24 h to allow cells to adhere. The inserts were then replaced in the plate and seeded with ECs. For experiments



with cells seeded at the bottom of the wells, ECs were added on the inserts 24 h after ACs or PCs seeding. The medium was changed every 2–3 days. The permeability tests were performed on day 7 after ECs seeding. The permeability of the different *in vitro* models was assessed using fluorescein dextran (FITC-Dextran 4 kDa or 150 kDa) and sodium fluorescein (NaF). To perform the permeability assay, the culture medium was removed from the upper and bottom chambers and replaced with 100  $\mu\text{L}$  of FITC-Dextran  $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$  or NaF  $100 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  diluted in X-DMEM and 600  $\mu\text{L}$  of X-DMEM alone, respectively. After 200 min for FITC-Dextran or 60 min for NaF, 10  $\mu\text{L}$  from the top chamber medium was sampled, as well as 100  $\mu\text{L}$  from the bottom chamber medium. The concentration of FITC-dextran and NaF in each compartment was calculated by measuring the fluorescence using a Saffire plate-reader (Tecan, Canada) and comparing the values to a pre-established calibration curve in X-DMEM. Excitation/emission wavelengths were set at 492/518 nm. The apparent permeability (Papp) was calculated using equation 2.4 [22],

$$P_{app} = \frac{\frac{dQ}{dt}}{A \times C_0} \quad (2.4)$$

where Papp is the apparent permeability ( $\text{cm} \times \text{s}^{-1}$ ),  $dQ/dt$  is the quantity of dextran (mg) in the bottom chamber at any given time, A is the insert surface area ( $\text{cm}^2$ ),  $C_0$  is the initial concentration of dextran in the top chamber ( $\text{mg} \times \text{cm}^{-3}$ ).

#### 2.3.6.4 Transendothelial Electrical Resistance (TEER) Measurement

The transcellular resistance of the *in vitro* BBB models was measured by transferring the individual inserts in the Endhom-6 cup (World Precision Instrument, FL, United States) previously filled with 800  $\mu\text{L}$  of medium. Values were recorded using the Milli ERS voltmeter (Millipore, MA, United States). The transendothelial electrical resistance (TEER) value ( $\Omega \times \text{cm}^2$ ) was computed by subtracting the resistance ( $\Omega$ ) of the filter alone to each condition and multiplying the result by the total surface of one well (0.33  $\text{cm}^2$ ) (Equation 2.5). The TEER values of each cell type combinations were measured before the dextran permeability tests on the same day.

$$TEER = (\text{Resistance}_{condition} - \text{Resistance}_{filter}) \times \text{Surface}_{insert} \quad (2.5)$$

#### 2.3.7 Endothelial Cell Cryopreservation

Freezing procedure: freezing media were prepared by using either EC culture medium or FBS supplemented with 10% v/v sterile dimethyl sulfoxide (DMSO). Trypsinized P0 ECs were centrifuged (800 g, 8 min, RT) and counted using a Malassez' counting chamber. The cells were centrifuged again and resuspended in freezing media to reach a final cell concentration of  $1 \times$  or  $2 \times 10^6$  per

mL. The cell suspensions were subsequently rapidly transferred into 1-mL cryovials and placed into a freezing container (Mr Frosty™, Thermo Fisher) at -80 °C for 24 h. Finally, cryovials were transferred into liquid nitrogen for at least 48 h.

Thawing procedure: cryovials were removed from the liquid nitrogen and rapidly hand-warmed before being transferred into sterile tubes containing warm culture medium (8 mL). The tubes were then centrifuged (800 g, 8 min, 4 °C) and the pellets were resuspended in warm culture medium.

Viability assessment: the cell suspensions were mixed with Trypan blue solution (1:1) and cells were counted twice by two independent operators (n=4 counts) with a haemocytometer (Malassez model). Equation 2.6 was used to determine the cell viability with Trypan blue.

$$\text{cell viability (\%)} = 100 \times \frac{\text{concentration of viable cells after thawing}}{\text{concentration of cryopreserved cells}} \quad (2.6)$$

### 2.3.8 Data Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using PRISM Graphpad™ software. Underlying assumptions of the ANOVA and student's test were verified: (i) the normality of data distribution; (II) the homoscedasticity of all data subgroups. The normality of data distribution was confirmed by Q-Q plots. Where homoscedasticity was evaluated using Bartlett's test and Brown-Forsythe's test ( $\alpha = 0.05$ ). When tests rejected homoscedasticity multiple comparison procedures of Man-Whitney's test ( $\alpha = 0.05$ ) were applied to identify the sample means that were significantly different from each other. Otherwise an unpaired t-test with Welch's correction or Tukey's test was applied. Significant results are marked with \* following those rules: \* P-value < 0.05, \*\* P-value  $\leq$  0.01, \*\*\* P-value  $\leq$  0.001. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

## 2.4 Results

### 2.4.1 Isolated BBB Cells Express Cell-Specific Lineage Markers

The purity of the enriched primary cell cultures was assessed by flow cytometry (Fig 2.1-b,e,h). ECs (Passage 1, P1) were identified as CD31/PDGFR- $\beta$ <sup>-</sup>/GFAP<sup>-</sup>/GLAST-1<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup> cells, PCs (P3) were identified as PDGFR- $\beta$ /CD31<sup>-</sup>/GFAP<sup>-</sup>/GLAST-1<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup> cells (Fig S2.1) and ACs (P1) were identified as GFAP/GLAST-1 or GFAP/GLAST-1<sup>-</sup> and PDGFR- $\beta$ <sup>-</sup>/CD31<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/CD11b<sup>-</sup> cells.

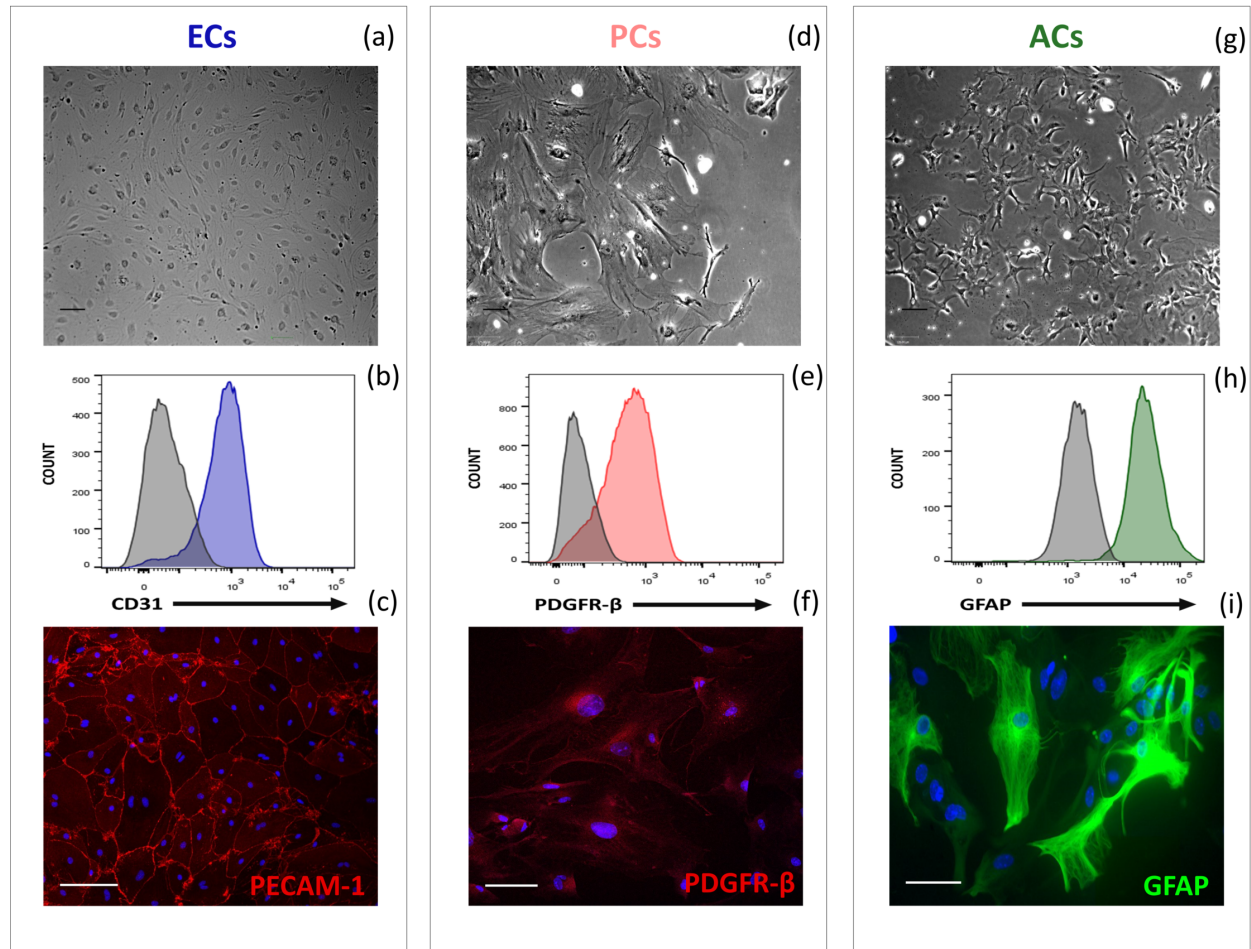
ECs in culture were able to form a tight monolayer, presenting a characteristic cobblestone-like shape (Fig 2.1-a). A majority of the cells expressed platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31), as confirmed by FACS analysis, resulting in a culture purity of over 90%

at P1 (Fig 2.1-b, Fig S2.2-a). Using  $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  of puromycin instead of  $4 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  in the enrichment medium for the first two days improved the purity of the EC cultures (Fig S2.2-c). Contaminants were mostly identified as microglia and ACs (Fig S2.2-b). PECAM-1 proteins were located on the EC membrane, predominantly at the intercellular junction under homeostatic conditions, as outlined by confocal microscopy (Fig 2.1-c). Two other adhesion proteins previously characterized on ECs, namely activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), were also observed by confocal microscopy (Fig S2.3). Junction molecules, involved in maintaining the intercellular barrier characteristic of BBB vessels, such as claudin-5 (Cldn5), vascular endothelial-cadherin (VE-cadh; CD144/cadherin-5), occludin (Ocln), zonula occludens-1 (ZO-1), zonula occludens-2 (ZO-2) and junctional adhesion molecule-A (JAM-A) were also expressed by the primary ECs in culture, as demonstrated by confocal microscopy (Fig S2.3) ([2]).

In contrast, isolated PCs were rectangular in shape and formed an irregular monolayer (Fig 2.1-d). The expression of platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFR- $\beta$ /CD140b) was confirmed by flow cytometry, for a culture purity of 90% at P3 (Fig 2.1-e, Fig S2.2-a). Contaminants were mostly identified as microglia and ACs (Fig S2.2-b). As expected for pericytes, PDGFR- $\beta$  was found uniformly distributed throughout the cell membrane (Fig 2.1-g). Neural/glial 2 (NG2), melanoma cell adhesion molecule (MCAM) and a weak expression of alpha smooth muscle actin (aSMA) were also observed in primary PCs in culture (Fig S2.4). The expression of these four biomarkers in conjunction with the absence of the fibroblast-specific protein 1 (FSP1, Fig S2.5) is commonly accepted to firmly identify cells as pericytes [23, 24].

Finally, ACs were found to be star-shaped when observing sub-confluent monolayers, spreading on flask bottoms with a tendency to overlap each other (Fig 2.1-g). FACS analysis at P1 showed that a majority of the isolated cells expressed glial fibrillary acid protein (GFAP) (87% , Fig 2.1-h, Fig S2.2-a).

Moreover, 33 to 87% (culture dependant) of GFAP cells also expressed glutamate aspartate transporter 1 (GLAST-1). GFAP distribution in the cells revealed fibrillary protein structures (Fig 2.1-i), characteristic of this cytoskeleton component widely used as an astrocyte lineage marker [25]. The expression of GLAST-1 and S100 calcium-binding protein B (S100b), two other proteins studied in astrocytes, was also confirmed by confocal microscopy [26] (Fig S2.4).



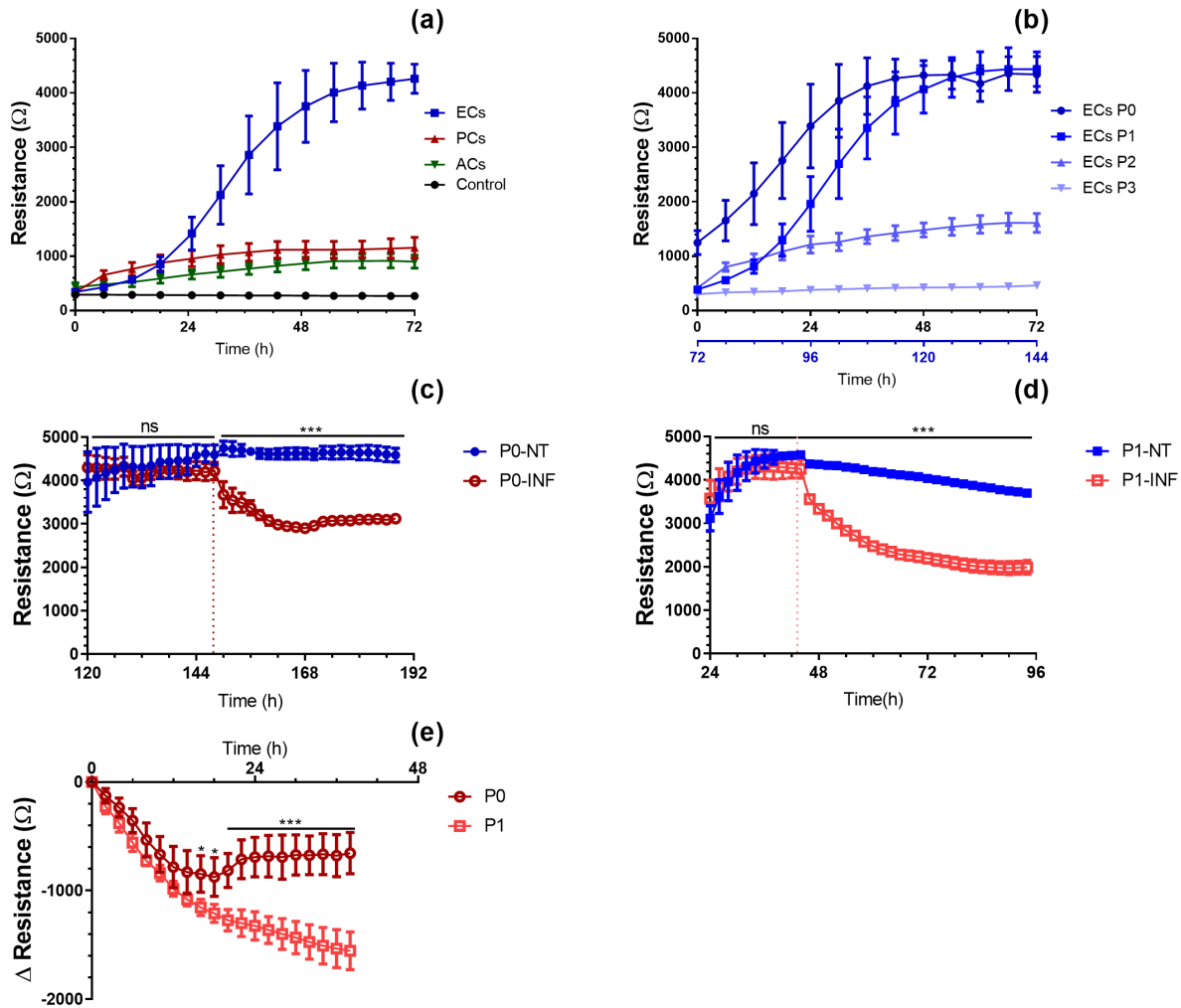
**Figure 2.1 – Identification of isolated brain cells from mice.**

(a, b, c) Endothelial cells (ECs) at P1; (d, e, f) Pericytes (PCs) at P3; (g, h, i) Astrocytes (ACs) at P1. (a, d, g) Differential interference contrast (DIC) images ( $\times 20$ ) of the above mentioned cell types. (b, c) Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1, CD31), (e, f) beta-type platelet-derived growth factor receptor (PDGFR- $\beta$ ) and (h, i) glial fibrillary acidic protein (GFAP) protein expression as assessed by (b, e, h) flow cytometry and (c, f, i) immunofluorescence confocal microscopy ( $\times 40$ ). Representative of  $n=5$ . (b, e, h) Mean fluorescence intensity plots (control isotype in grey) are shown. (c, f, i) Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars represent  $100 \mu\text{m}$ .

#### 2.4.2 Isolated Primary ECs Display Blood-Brain Barrier Characteristics

In addition to the qualitative analysis of specific tight junction proteins, we sought to quantify the expression of those tight junction markers and assess the permeability of isolated ECs in culture. ECs forming the CNS microvasculature are known to form an impermeable barrier, preventing most paracellular and transcellular immune cell trafficking and selectively allowing a very small number of molecules to permeate into the parenchyma under homeostatic conditions [27]. In order to assess

if primary ECs in culture possess similar qualities, the impedance of the monolayers was measured, as the resistance to electron transfer from one spot of the cultured surface to another is a function of cell adherence and cell-cell junctional properties [28]. Using the Electric Cell-substrate Impedance Sensing (ECIS) technology, primary ECs were found to form a tight monolayer, displaying a high resistance of around 4,000  $\Omega$ , 120 – 144h after seeding freshly isolated brain microvessels (P0 cells) (Fig 2.2-a,b & Fig S2.6). To compensate for the initial growth phase of freshly isolated primary ECs as compared to trypsinized cells, P0 EC values are shown on a different axis (Fig 2.2-b). No significant difference was observed in the maximum electrical resistance values (plateau) measured with P0 (120-144h) and P1 (48 to 72h) ECs. Importantly, ECs were not able to form a tight monolayer when passaged more than once (P2 and P3). The maximum electrical resistance values of these cell layers were found to be significantly lower than those of ECs at P0 and P1 (Fig 2.2-b and Fig S2.6). Of note, changing the culture medium appears to negatively influence the resistance of P1 cells, which could perhaps indicate a higher sensitivity to a sudden sheer-stress or to changes in CO<sub>2</sub> concentration (Fig S2.7). PCs and ACs, which are adherent cells involved in the formation of a functional BBB but do not form tight junctions, were used as negative controls. Both control cell types displayed significantly lower electrical resistance values, around 1100  $\Omega$  for ACs and 850  $\Omega$  for PCs (48h-72h in cultures).



**Figure 2.2 – Electrical resistance of primary cultures of pericytes, astrocytes and endothelial cells, as measured by ECIS Z $\theta$ .**

(a) Transcellular electrical resistance comparison between pericytes (PCs), astrocytes (ACs) and endothelial cells (ECs) at passage 1 (n=4). (b) Transendothelial electrical resistance measured from P0 to P3. The second x-axis in (b) is used to compare ECs (P0) to the other passages at similar resistance values (n=4). (c, d) Transcellular electrical resistances of confluent monolayers of ECs at (c) passage 0 (P0) or (d) passage 1 (P1) either inflamed with  $100 \text{ U} \times \text{mL}^{-1}$  of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (INF) or non-treated (NT) (P0: n=5, P1: n=4). The vertical dotted lines denote the addition of the pro-inflammatory cytokines. (e) Transcellular electrical resistance comparison of P0 and P1 ECs treated with TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  (normalized at the treatment time point). Two-way ANOVA; \* P-value  $\leq 0.05$ , \*\* P-value  $\leq 0.01$ , \*\*\* P-value  $\leq 0.001$ . Each point represents the mean resistance measured every 6 hours (a, b) or 2 hours (c, d, e)  $\pm$  standard deviations.

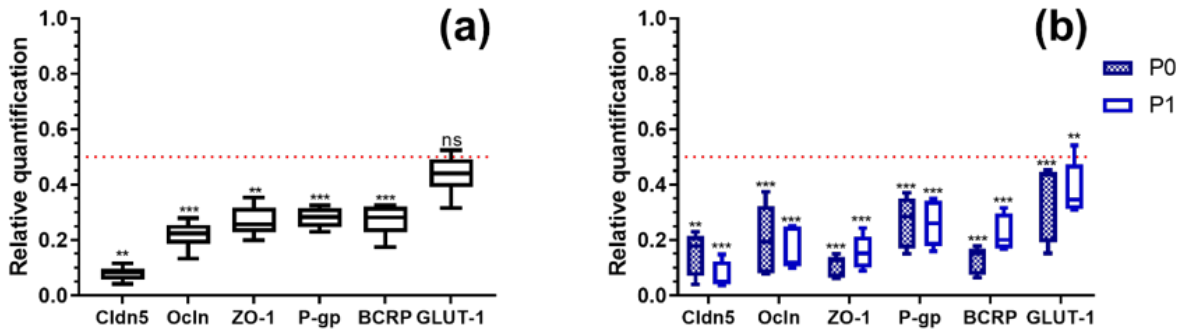


### 2.4.3 Endothelial Cells Cultured in Inflammatory Conditions

The loss of BBB integrity upon inflammation has been well studied in both *in vitro* [29, 30] and *in vivo* models [31]. It is predominantly characterized by a reduction in the expression of junctional molecules, and their apparent disorganization as well as an upregulation of cell adhesion molecules. In order to verify that the isolated primary ECs could still respond to pro-inflammatory stimuli, the cells were treated with a combination of TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$  at  $100 \text{ U} \times \text{mL}^{-1}$  (Fig 2.2-c,d,e). Both cytokines have been shown to upregulate the expression of several adhesion molecules on ECs and to disrupt tight junctions, promoting leukocyte trafficking through the BBB and playing a crucial role in several pathologies such as neuroinflammation, infections and cancers [20, 32]. ECs at P0 and P1 showed similar behaviours upon inflammation, characterized by a rapid and persistent reduction of the transcellular electrical resistance (Fig 2.2-c,d). However, ECs at P0 were able to partially recover after 24h with a relative resistance around  $-800 \Omega$  (as compared to values prior to inflammation), whereas the relative resistance of ECs at P1 constantly decreased, with a minimum value measured around  $-1600 \Omega$  at the end of the recorded session (Fig 2.2-e), denoting perhaps an increased sensitivity to pro-inflammatory cytokines.

To verify the validity and relevance of such results, the mRNA expression of *Cdln5*, *Ocln* and *Tjp1* (ZO-1) from ECs at P0 and P1, under normal (untreated) and inflamed conditions was quantified using q-PCR (Fig 2.3). ECs at P1 showed a significant decrease in the mRNA expression levels of these junctional molecules compared to ECs at P0 (Fig 2.3-a), albeit the differences did not strongly impact the resistance values of the cells, as previously observed (Fig 2.2-b). A closer examination of the relative mRNA expression of the junctional molecules upon inflammation showed that both EC passages displayed similar decreased mRNA levels, as compared to untreated ECs at the same passage (Fig 2.3-b).

Moreover, the mRNA expression of transporter proteins was also verified in similar conditions (Fig 2.3-a,b). P-glycoprotein-1 (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP) and glucose transporter-1 (GLUT-1) were selected as representative transporters normally present on the luminal membrane of brain endothelial cells [33]. Similar to junctional molecules, a statistically significant decrease in mRNA levels of the measured transporters was observed when comparing P1 to P0 ECs as well as TNF- $\alpha$ /IFN- $\gamma$ -treated to untreated ECs (Fig 2.3-a,b).



**Figure 2.3 – Relative quantification of the mRNA of junction and transporter proteins in primary endothelial cells.**

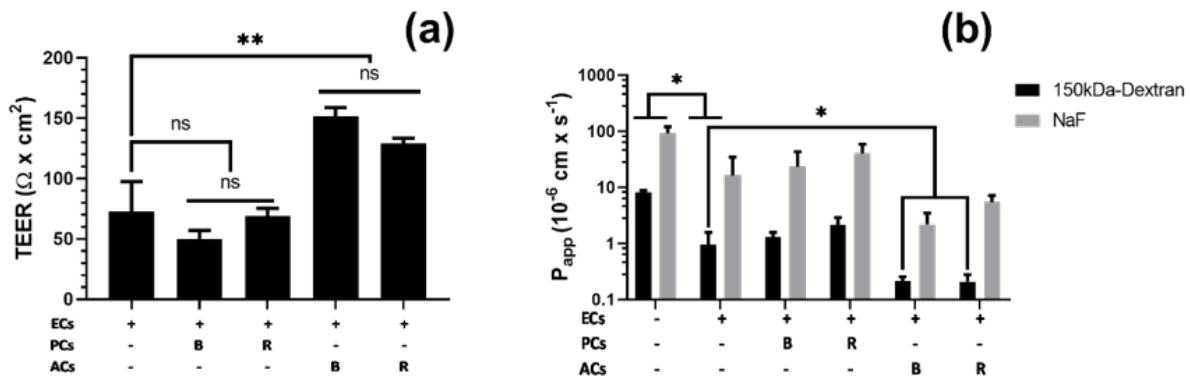
Analysis of the mRNA expression of (a) junction proteins: claudin-5 (Cldn5), occludin (Ocln), zonula occludens-1 (Tjp1; ZO-1) and transporter proteins: P-glycoprotein-1 (P-gp), breast cancer resistance protein (Bcrp; ABCG2) and glucose transporter-1 (Glut-1; SLC2A1) in endothelial cells at passage 1 (P1) assessed by q-PCR. The results are represented as relative values to P0. (b) The relative mRNA expression levels of junction and transporter proteins in P0 and P1 ECs, inflamed with 100 U × mL<sup>-1</sup> of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  for 24h. The results are relative to the corresponding untreated EC passages. All results were first normalized with Hprt/Gapdh/Tbp mRNA levels. The results are represented as the means  $\pm$  standard deviations of 6 replicates. The dotted red lines represent a fold change of 0.5, underneath which, values were considered biologically significantly changed. Stars show significative differences between tested conditions and their corresponding base values. t-test: \* P-value  $\leq$  0.05, \*\* P-value  $\leq$  0.01, \*\*\* P-value  $\leq$  0.001, ns non significant.

#### 2.4.4 Bi-Cellular *In Vitro* BBB Models Impact TEER and Permeability

In order to recapitulate more closely the *in vivo* organisation of the vasculature and to assess the role of PCs and ACs in regulating the formation of a tight BBB *in vitro* model, mono- and bi-cellular cultures were studied. The transendothelial electrical resistance (TEER) and the apparent paracellular permeability (Papp) of primary EC monolayers were measured in 24-well Transwell<sup>®</sup> chambers, in presence or absence of pericytes or astrocytes. Primary EC monolayers alone displayed TEER values around 70  $\Omega \times \text{cm}^2$  and apparent permeability (Papp) values of fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (Mw = 150,000 g.mol<sup>-1</sup>, logP  $\pm$  -2) and sodium fluorescein (NaF, Mw=376.25 g.mol<sup>-1</sup>, logP  $\pm$  3) around  $1 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$  and  $10 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ , respectively (Fig 2.4-a,b). To assess the impact of secreted versus direct membrane-bound ligand signaling, two setups were studied: with or without contact. In contact mode (R, reverse), PCs or ACs were seeded on the reverse side of the inserts. In non-contact mode (B, bottom), PCs or ACs were seeded



at the bottom of the receiver well. The EC/PC co-culture models showed no significant impact on TEER values (Fig 2.4-a), as well as on permeability values (Fig 2.4-b), as compared to ECs cultured alone. In contrast, both contact and non-contact models of EC/AC co-cultures were found to significantly improve TEER values (up to  $130 \Omega \times \text{cm}^2$ ) (Fig 2.4-a). In parallel, the permeability of a 150k-Dextran fluorescent marker was also decreased by a factor of five with a Papp of  $0.2 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$  (Fig 2.4-b). The same tendency, albeit not significantly different, was observed for the NaF marker with a Papp of  $2 \times 10^{-6} \text{ cm} \times \text{s}^{-1}$  (Fig 2.4-b).



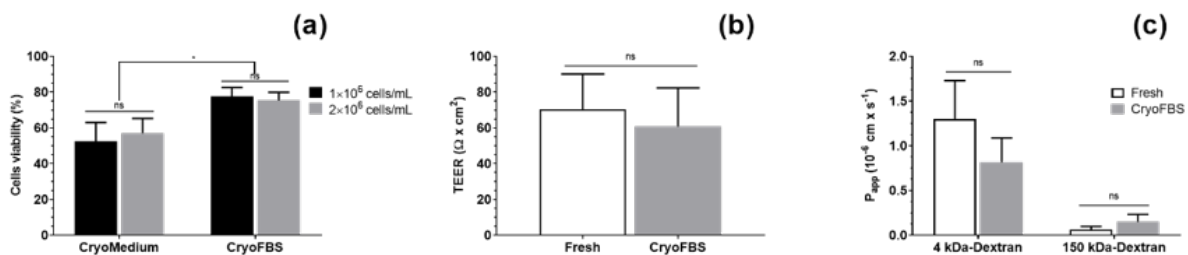
**Figure 2.4 – Measurement of the transcellular permeability of primary endothelial cells alone or in co-culture with pericytes or astrocytes.**

(a) Transendothelial electrical resistance values. (b) Permeability values of FITC-dextran (150 kDa,  $1 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$ ) and sodium-fluorescein (376 Da,  $100 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ). Data were acquired with primary endothelial cells (ECs) cultured on 24-Transwell® in presence or absence of pericytes (PCs) or astrocytes (ACs). PCs and ACs were either cultured at the bottom of the wells (B) or on the reverse side of the inserts (mimicking the abluminal side) (R). Data represent the mean values  $\pm$  SD ( $n \geq 4$ ). ANOVA with Tukey's test: ns: non-significant, \* P-value < 0.05, \*\*  $0.001 \leq \text{P-value} \leq 0.01$ .

### 2.4.5 Cryopreservation of Endothelial Cells

In order to widen the scope of our protocol, we investigated whether primary cells could be cryopreserved for later experiments while maintaining their above-mentioned characteristics. For this purpose, two different cryopreservation media were compared, a cryomedium consisting of EC culture medium containing 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (named CryoMedium) and fetal bovine serum (FBS) containing 10% DMSO (named cryoFBS). Two cell concentrations ( $1$  and  $2 \times 10^6 \text{ cells} \times \text{mL}^{-1}$ ) were also compared. The cell viability upon thawing was evaluated using Trypan blue staining (Fig 2.5-a). The cells preserved in FBS supplemented with DMSO showed a significant increased viability upon thawing. Around 75% of both cell concentrations had intact

membrane as compared to 60% of the cells frozen in CryoMedium. Having established the best cryopreservation medium, the expression of junctional proteins, namely Cldn5, ZO-1 and Ocln, was assessed by microscopy using P1 ECs cultured following cryopreservation at P0 in cryoFBS and compared to freshly isolated ECs at passage 1 (Fig S2.8). No significant morphological differences nor relative alterations in junctional protein expression were observed between these two conditions. In addition, the TEER of cryopreserved ECs was measured at similar levels to non-cryopreserved ECs, around  $60 \Omega \times \text{cm}^2$  (Fig 2.5-b). Likewise, no significant differences were detected between the two groups while assessing the permeability of a 4 kDa and a 150 kDa FITC-conjugated dextran markers (Fig 2.5-c).



**Figure 2.5 – Viability of primary endothelial cells after cryopreservation.**

(a) Primary endothelial cells (ECs) were concentrated at 1 million cells/mL (black bars) or 2 million cells/mL (grey bars) in either ECs culture medium supplemented with 10 % DMSO (CryoMedium) or foetal bovine serum supplemented with 10 % DMSO (CryoFBS). Cells were counted after Trypan blue staining, prior to cryopreservation and after thawing. Results are presented as the percentage of the total number of living cells after thawing on the total number of living cells prior to cryopreservation. Data represent the mean values  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). ANOVA with Tukey's test: ns: non-significant, \* P-value  $< 0.05$ . (b) Transendothelial electrical resistance (TEER) of non-cryopreserved P1 ECs (Fresh, white bar) and P1 ECs post-cryopreservation (CryoFBS, grey bar) 9 days after seeding. Data represent the mean values  $\pm$  SD ( $n = 8$ ). (c) Permeability values of 4 kDa and 150 kDa FITC-conjugated dextrans through non-cryopreserved P1 ECs (Fresh, white bar) and P1 ECs post-cryopreservation (CryoFBS, grey bar) 9 days after seeding. Data represent the mean values  $\pm$  SD ( $n = 4$ ). T-test: ns: non-significant (P-value  $> 0.05$ ).

## 2.5 Discussion

Primary cells present numerous advantages over established cell lines. While the latter are easier to obtain, manipulate, propagate and maintain alive, they display inherent genetic deviations from their originating cells which often dramatically alter their biology [34]. Conversely, while isolating

primary cells is often more expensive and time-consuming, the biology of these cells is highly similar to their *in vivo* counterparts and, as such, remain the best option for most studies.

Before selecting a primary cell isolation protocol, several aspects need to be evaluated. Most notably, yields and purities can vary widely depending on the method performed and the cost associated with some techniques can become prohibitive to specific applications. During the last two decades, a wide variety of EC, PC and AC isolation protocols have been published. While we initially tried to compare some of the most cited or recently published protocols (Table S2.1), many lacked basic information, such as the total number of animals used, the yield or the purity assessed by a quantitative method. While Table S2.1 is not an exhaustive review of the current literature, we believe it encompasses a variety of isolation procedures which represents most of published protocols. Thus, the protocols presented herein were designed by taking into consideration the available literature, while simple steps, relatively low-cost equipment and reagent requirements were preferred in order to establish an efficient and affordable *in vivo* BBB model used for drug-screening assay. The protocols rely on enrichment steps based on known cellular properties, as opposed to a positive/negative selection strategy centered on the expression of lineage markers identified by flow cytometry or antibody coupled-magnetic beads, which incidentally generates quantitatively fewer cells [35].

Ideally, for ethical and economic reasons, it would be desirable to extract all three cell types forming the BBB from the same batch of animals. While initial tests were done in that sense, three major drawbacks were found impossible to reconcile. Astrocytes isolated from adult mouse brains displayed a very slow proliferation rate, as previously reported by others [36, 37, 38, 39, 40]. In contrast, postnatal ECs are known to be immature and thus, ECs isolated from adult brains are preferred to study phenomena described in fully differentiated BBB-ECs [41]. In addition, most published pericyte isolation protocols grow the cells from several subcultures originating from EC isolations [37, 42]. Yet, confluent PCs are normally obtained in 3-4 weeks, whereas ECs obtained from the same tissue are confluent in 5-7 days. As a result, ACs and, reported here for the first time, PCs were isolated from newborn mice, to ensure that enough cells would be obtained in a timely manner, whereas ECs were isolated from adult mouse brains. It should be noted that, while capillaries from spinal cords could also be used as a source of BBB cells, the limited additional number of primary cells obtained, as compared to complete brains, combined with a significant increase in time required to ensure cell purity, deterred us from using them (unpublished observations).

To increase the purity of primary EC cultures, some protocols use the selective agent puromycin, an aminonucleoside antibiotic known to be toxic to cells that do not express high levels of P-glycoprotein [19]. A selective concentration of 4 to 8  $\mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  is often used, leading to reported purities of 95 to 99 % [43, 44, 45]. In the protocol shown here, the initial concentration of puromycin was

raised to  $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  for the first two days, followed by  $4 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  for the remaining time in culture. This was observed to be non-toxic for the ECs and led to a purity of  $92 \pm 3 \%$  at P1 ( $n=5$ ). While this value is lower than some previously reported results, it was obtained by precise and reproducible flow cytometry quantification of thousands of cells, contrary to others who deduced their purity figures from smaller sample size using fluorescence microscopy [43, 44, 45] or did not provide enrichment information altogether [46, 47]. Another important aspect of our protocol is the presence of hydrocortisone in the selective medium. This drug is known to promote tight junction formation, especially when combined with puromycin [18]. Several previously reported protocols use cell culture media that lack this corticosteroid [43, 45, 46], leading to poorer barrier properties, some with TEER values as low as  $30 \Omega \cdot \text{cm}^2$  [44].

The cells obtained using our EC isolation and enrichment protocol possess a high TEER value, express key tight junction and adherens junction proteins as well as important transporter proteins, all of which are hallmarks of ECs forming the BBB. These ECs, in a similar manner to *in vivo* BBB-ECs, respond to inflammatory stimuli by upregulating adhesion molecules, downregulating junctional molecules and transporter proteins, which increases the EC barrier permeability and decreases the TEER. These characteristics, which are essential to a proper *in vitro* BBB, are seldom reported in previously published papers [48, 49]. In addition, it is well-known that primary cells deviate from their *in vivo* counterpart with each passage [50]. Herein, we clearly demonstrated that the TEER values of primary ECs at passages 0 and 1 do not significantly differ from one another, whereas we would advise against using primary ECs of higher passages. In addition, we provided conclusive evidences that cryopreserved ECs at P1 possess statistically undistinguishable barrier properties compared to freshly isolated ECs. To decrease the permeability of the *in vitro* BBB model even further and to more closely recapitulate the contribution of the intricate intercellular signalling of the neurovascular unit, we also tested different co-culture models. The addition of primary ACs to the reverse side of the Transwells or to the bottom of the wells improved significantly the barrier properties of the *in vitro* model.

In this study, ACs were isolated from newborn mice between 2- and 5-day old, with a final isolation yield of around 4 million astrocytes per brain at P1, which is higher than previously published protocols. One-day-old newborns provided lower yields, while the cell proliferation was significantly hampered using 5-day-old or older mice, as previously reported by others [36, 39]. Feldmann *et al.* and Schildge *et al.*, which used slightly different isolation protocols, reported final yields of 1 and 2 million astrocytes per brain, respectively [51, 52]. Contrary to many protocols, our isolation technique did not include a filtration step through a 70/100- $\mu\text{m}$  mesh [51, 39] and relied on a type II collagenase solution, leading to better cell dissociation compared to that of trypsin [51, 52, 39]. According to Josep Saura, AC cultures are repeatedly shown to be composed of approximately 90% astrocytes and 10% microglia, rendering the final cell suspension an astroglial-

enriched culture [53]. While a 10% contamination could be an issue in biochemical or mechanistic studies, the microglia found with the ECs used in the co-culture models did not trigger any pro-inflammatory phenotypes and therefore, were considered non-problematic. If deemed necessary, microglia can easily be removed from AC cultures by shaking the flask for 2 hours at 37 degrees, 24 to 48 h after seeding the cells [53]. Despite the presence of microglia in our cultures, the enrichment of ACs remained close to values found in the literature, *i.e.* between 92 and 98 % [51, 52].

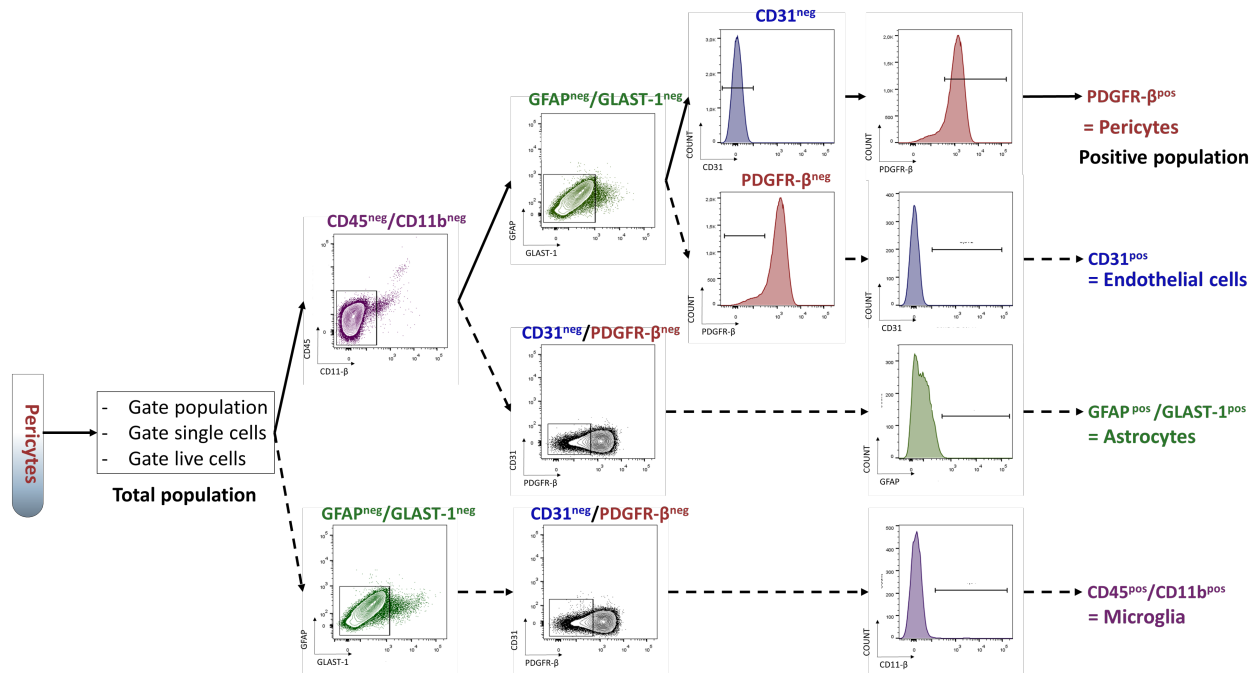
PCs are usually isolated from adult mouse capillaries and often require multiple subsequent passages in different selective media to obtain an adequate number of cells [37, 54, 40]. In this protocol, the cells were directly grown in a selective medium, based on low glucose DMEM supplemented with a commercially available smooth muscle growth supplement. This selective medium was previously reported to inhibit EC proliferation while not being deleterious to PCs isolated from young mouse ears [55]. These culture conditions led to a confluent and highly enriched population of PCs at passage 3, with an isolation yield of around 0.5 million cells per brain. This corresponds to a 3-time improvement compared to recently published scientific articles [37, 42] and obtained from a similar number of mice. The isolated PCs expressed PDGFR- $\beta$ , NG2, MCAM and  $\alpha$ SMA, while being negative for FSP1. In combination to PDGFR- $\beta$ , both FSP1- and CD13-specific antibodies could be added to a flow cytometry PC identification panel, especially if a positive selection approach is elected. Herein, carefully removing meninges from the brain and the sequential plating approach at each passage (*i.e.* allowing glial cells to adhere one hour then plating the remaining floating cells) seemed to be sufficient to limit contaminant cells. Our PC culture purity was around 90 %, whereas cells isolated by FACS sorting, a technique that arguably allows for the highest purity, albeit at a much lower yield, was reported to lead to PC cultures in which 96 % of the cells were positive for CD13 and PDGFR- $\beta$  [56]. Other protocols which rely on similar selection approaches, did not report their final yields [42, 57, 40, 58]. This remained a recurrent challenge to compare our protocols to the available literature as among the numerous already-published protocols dealing with the isolation of ECs, PCs and ACs from murine brains, most of them do not provide sufficient characterization data to establish a relevant comparison with ours [43, 37, 42, 56, 51, 52, 39, 45, 46, 47].

In summary, the EC, the PC and the AC isolation and enrichment protocols, shown here, provide high quantitative isolation yields at a relatively low cost and generate high purity cell cultures ready to be used within 5 to 14 days. Furthermore, the ECs isolated were evaluated in preliminary functional assays, demonstrating their suitability to be used in an *in vitro* BBB model, preferentially in co-culture with primary ACs. Of particular interest, the primary ECs generated can be cryopreserved without hampering their ability to form a tight barrier and therefore, promote their use in longitudinal *in vitro* studies.

## 2.6 Acknowledgements

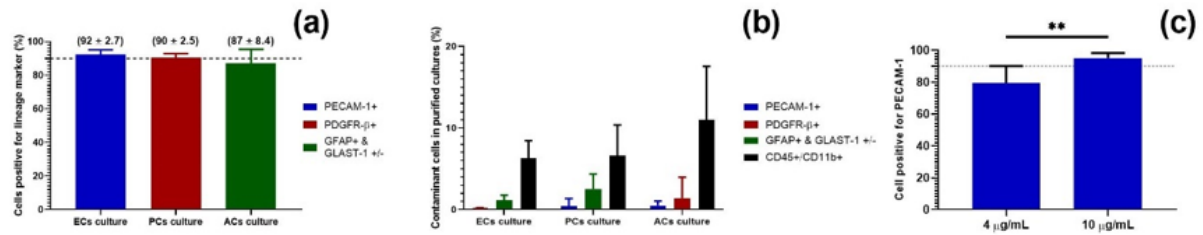
The authors thank Raphaëlle Lambert, MSc (IRIC genomics platform) for her precious advices on q-PCR and Sandra Larouche (Prat's lab) for her technical support with mice.

## 2.7 Supporting information



**Figure S2.1 – Illustration of the flow cytometry analysis strategy related to the complete identification of PCs (at P3).**

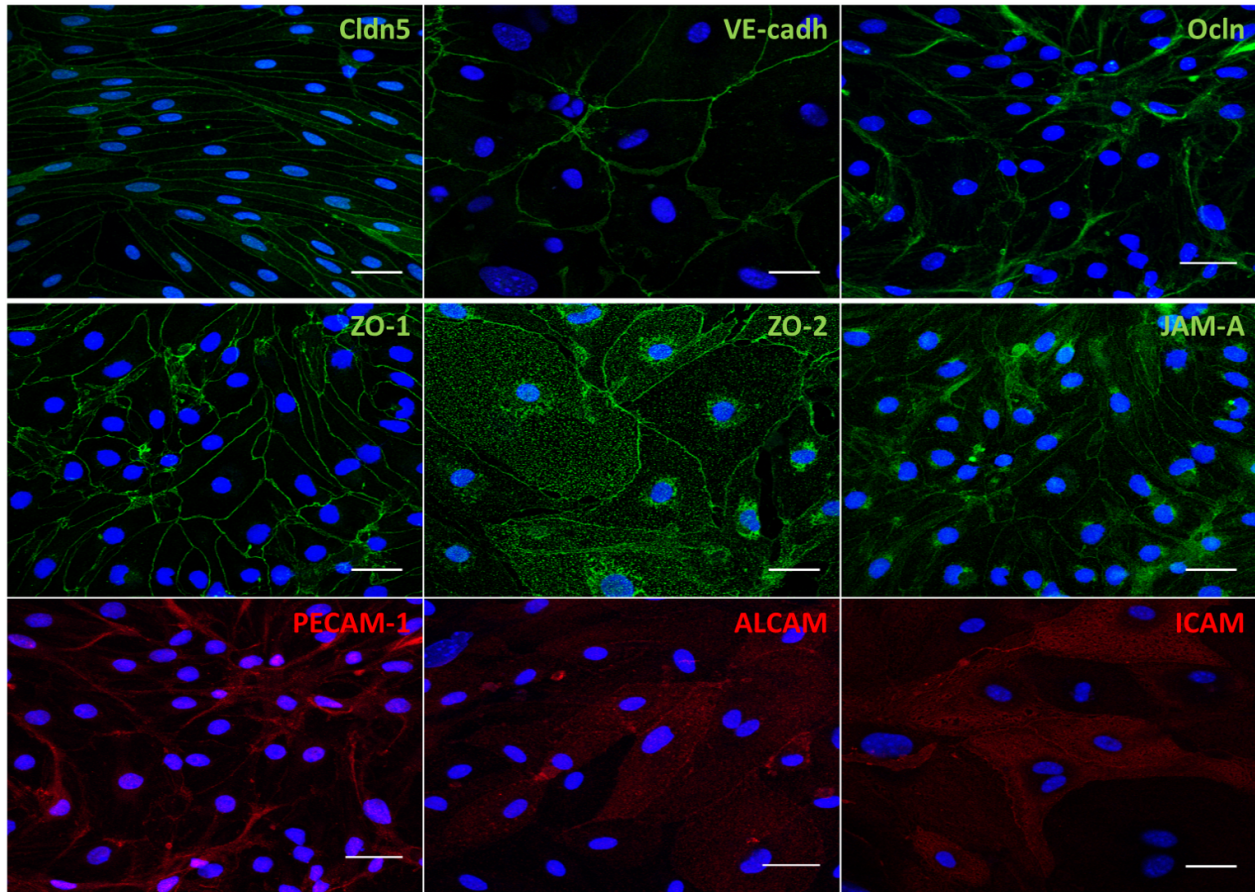
Protein tyrosine phosphatase receptor type c (PTPRC, CD45), integrin alpha M (ITGAM, CD11b), platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1, CD31) and beta-type platelet-derived growth factor receptor (PDGFR-β) were used as cell lineage markers. Similar strategies were applied for the identification of endothelial cells and astrocytes. Cells positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP), or double positive for GFAP and glutamate aspartate transporter 1 (GLAST-1) were identified as astrocytes.



**Figure S2.2 – Analysis of population purity by flow cytometry.**

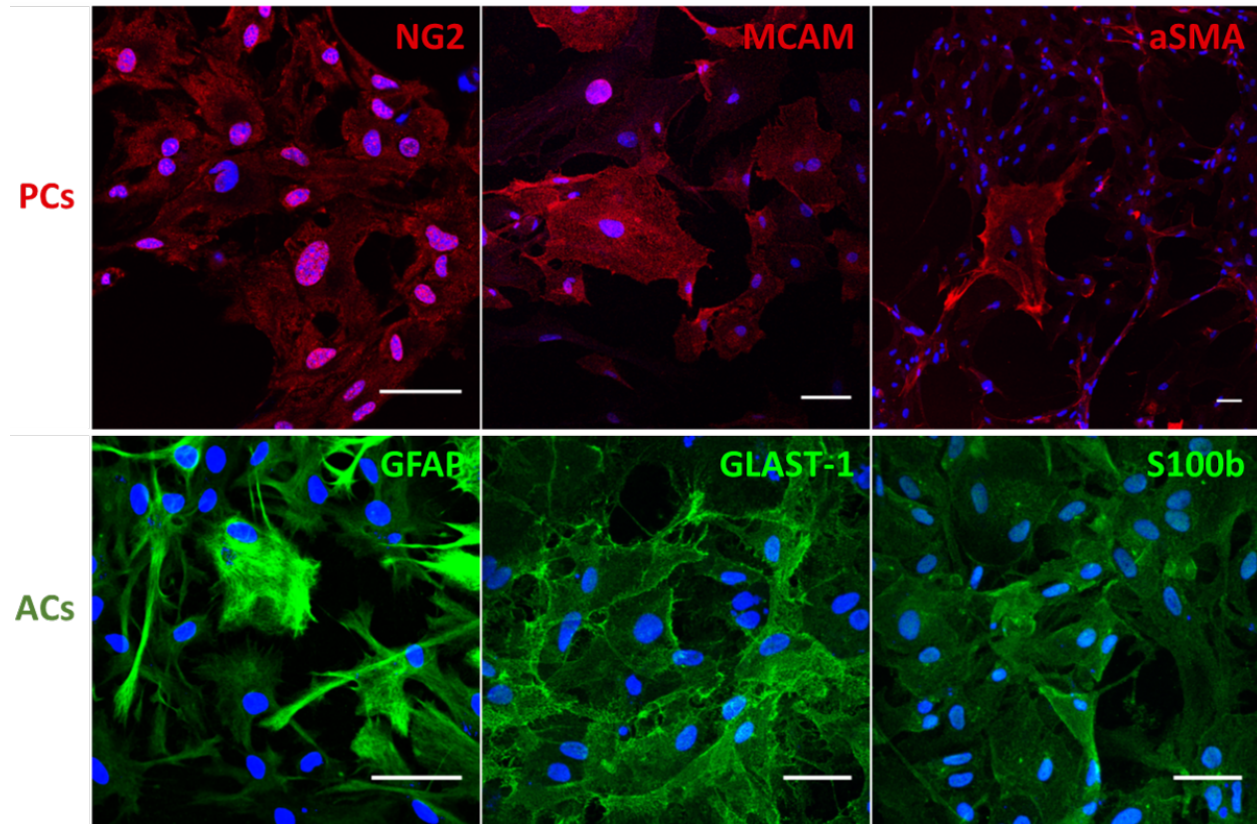
(a) Percentage of the total number of cells in culture positive for (i) blue: platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1 – ECs culture at P1), (ii) red: platelet-derived growth factor receptor (PDGFR- $\beta$  – PCs culture at P3) and (iii) green: glial fibrillary acidic protein (GFAP) or double positive with glutamate aspartate transporter (GLAST-1) (ACs culture at P1), respectively. (b) Percentage of the total number of cells in culture positive for other lineage markers (i.e.: contaminant cells) in each isolation. (c) Percentage of the total number of ECs positive for PECAM-1 cultured with either  $4 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  of puromycin or  $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  in the medium for the first two days. The results are represented as the mean values  $\pm$  standard deviations ( $n \geq 5$ ). T-test : \*\*  $0.001 \leq P\text{-value} \leq 0.01$ .





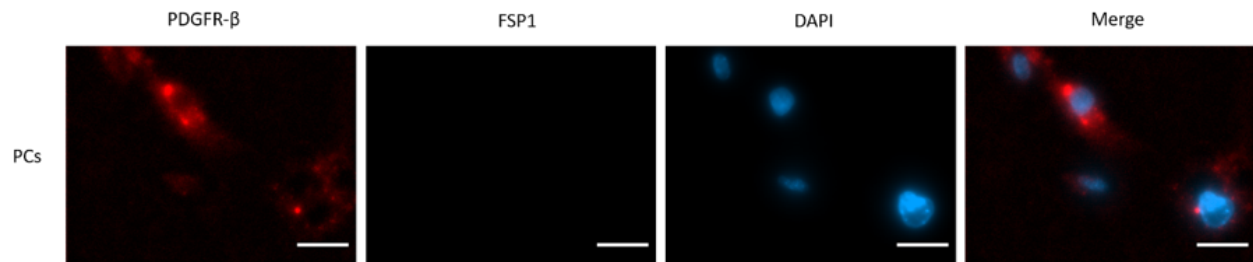
**Figure S2.3 – Confocal microscopy images of primary endothelial cells.**

Primary endothelial cells were immunolabelled with antibodies against the following junction proteins: Claudin-5 (Cldn5), vascular-endothelial cadherin (VE-cadh), occludin (Oc1n), zonula occludens-1 (ZO-1), zonula occludens-2 (ZO-2) and junctional adhesion molecule-A (JAM-A), as represented in green. Immunolabelled cell adhesion proteins, namely platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM1), are shown in red. Scale bar = 25  $\mu\text{m}$ . Representative of N = 4.



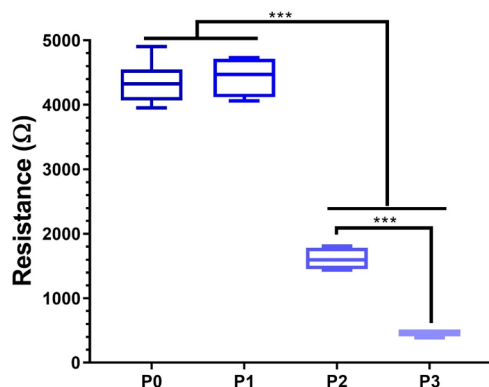
**Figure S2.4 – Confocal microscopy images of primary pericytes (PCs) and astrocytes (ACs).**

PCs (top panel) were immunolabelled with antibodies against neural/glial 2 (NG2), melanoma cell adhesion molecule (MCAM) and alpha smooth muscle actin (aSMA), as shown in red. ACs (bottom panel) were immunolabelled with antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP), glutamate aspartate transporter-1 (GLAST-1) and S100 calcium-binding protein B (S100b), as shown in green. Scale bar = 100  $\mu$ m. Representative of N = 4.

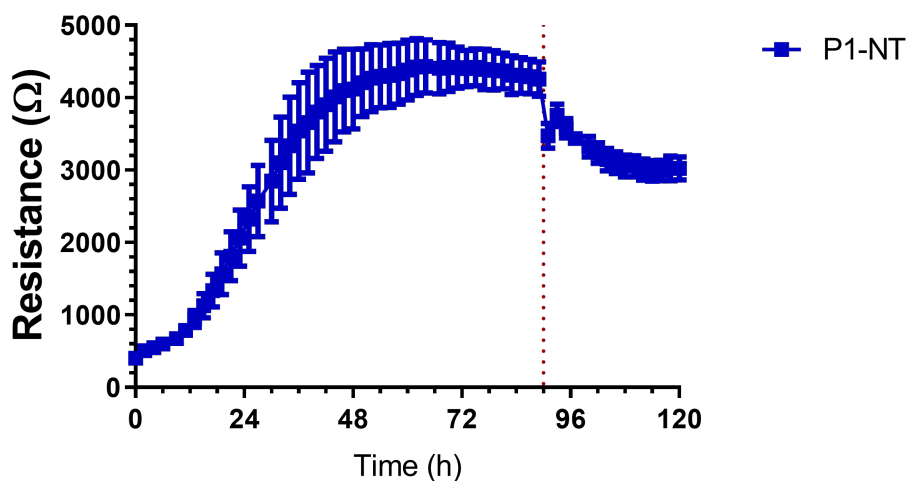


**Figure S2.5 – Primary pericytes (PCs) do not express fibroblast-specific protein 1 (FSP1) on fluorescent microscopic images.**

PCs were immunolabelled with antibodies against platelet-derived growth factor receptor (PDGFR- $\beta$ , red) and fibroblast-specific protein 1 (FSP1, green). Representative of N = 4.



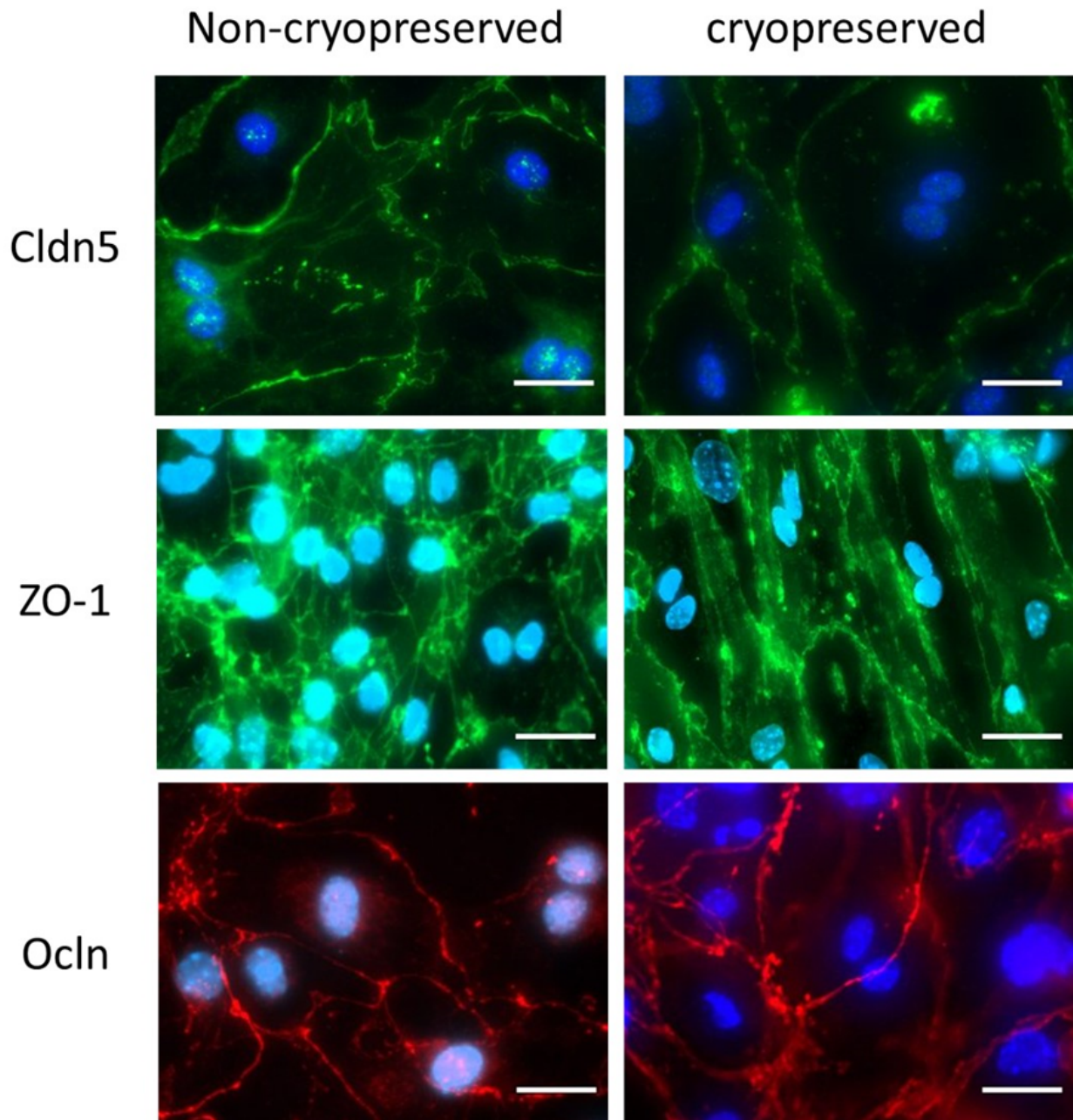
**Figure S2.6 – Maximum impedance of endothelial cell (EC) monolayers at different passages.** The measurements were done 144h after seeding primary ECs at P0 and 72h for ECs at P1-P3. The results are expressed as whiskers plots of 4 separate experiments with max, median and min values ( $n \geq 4$ ). Nonparametric Man-Whitney test: \* P-value  $< 0.05$  \*\*\* P-value  $\leq 0.001$ .



**Figure S2.7 – Electrical resistance of primary cultures of endothelial cells without treatment, as measured by ECIS Z $\theta$ .**

Transcellular electrical resistance of endothelial cells (ECs) at passage 1 ( $n=6$ ). The culture media was changed after 90 hours and it is represented by the dotted line. Each point represents the mean resistance measured every 2 hours  $\pm$  standard deviations.





**Figure S2.8 – Junctional protein expression in cryopreserved and non-cryopreserved primary endothelial cells.**

Previously cryopreserved ECs (in 90% FBS and 10% DMSO at a concentration of 1 million cells/mL) currently at passage 1 (P1) (right panel) and non-cryopreserved P1 ECs (left panel) are shown. The cells in both conditions were allowed to reach confluence before imaging. Claudin-5 (Cldn5) (top), zonula occludens-1 (ZO-1) (center) and occludin (Ocln) (bottom) were immunolabelled and imaged using a fluorescence microscope. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar is 25  $\mu\text{m}$ . Representative of N = 3.



Table S2.2 – Detailed list of used reagents

Item	Acronym	Provider	Catalogue #
Bovine Serum Albumin Fraction V	BSA	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	800-095-Eg
Collagen from human placenta, type IV	Collagen type IV	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	C5533
Collagenase, Type 2	Type 2 collagenase	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, United States	LS004174
Collagenase/dispase	Collagenase/dispase	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	10269638001
Deoxyribonuclease I	DNase I	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, United States	LS002138
Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose	DMEM high	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	319-005-CL
Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose	DMEM low	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	219-020-XX
Dulbecco's Phosphate Buffered Solution, without calcium and magnesium	PBS	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	311-425-CL
Extreme DMEM	X-DMEM	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	319-100-CL
Fibroblast growth factor-Basic	bFGF	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	PHG0024
Fluorescein Sodium	Na-Fluo	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	FX0325
Fluorescein isothiocyanate carboxymethyl dextran	Dextran-Fluo	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	74817
Foetal Bovine Serum	FBS	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	080-150
Hank's Balanced Salt Solution (10X)	HBSS 10X	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	14065-056
Hank's Balanced Salt Solution (1X)	HBSS	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	14025-092
heparin sodium	heparin	Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada	BP2425
HEPES (1M)	HEPES	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	15630-080
Hydrocortisone	Hydrocortisone	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	H0888
Insulin-Transferin-Sodium Selenite media supplement	ITS	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	I1884-1VL
Invitrogen, SlowFade Diamond antifade mountant with DAPI	mounting media	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	S36968
Iodonitrotetrazolium chloride	INT	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	18377
Lithium-Lactate	Lithium-Lactate	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	440469
Penicillin Streptomycin	Pen/Strep	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	450-201-EL
Percoll	Percoll	GE HealthCare Bio-Sciences, Baie-d'Urfé, QC, Canada	17-0891-01
Phenazine methosulfate	PMS	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	P9625
Poly-L-ornithine	PLO	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	P3655
Puromycin dihydrochloride from Streptomyces alboniger	puromycin	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	P8833
Smooth Muscle Growth Supplement	SMGS	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	S00725
Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	MTT	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	M5655
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	252859
Trypsin-EDTA (0.25 %), phenol red	Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	25200072
$\beta$ -Nicotinamide adenine dinucleotide sodium salt	NAD	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	N0632

Table S2.3 – Detailed list of used consumables

Item	Acronym	Provider	Catalogue #
BD PrecisionGlide Needle gauge 18 × 1 ½	18G	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	305196
BD PrecisionGlide Needle gauge 20 × 1 <sup>13</sup>	20G	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	305176
BD PrecisionGlide Needle gauge 22 × 1 <sup>14</sup>	22G	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	305156
Cryopure Tubes, 1 mL	Cryotubes	SARSTEDT, Sarstedtstraße, Nümbrecht, ,Germany	72.377.992
ECIS Cultureware™ Disposable Electrode Arrays	8W10E+	Applied Biophysics Inc, Troy, NY, United States	8W10E+
Falcon flask 25 cm <sup>2</sup>	T25	Corning, Ottawa, ON, Canada	353109
Falcon flask 75 cm <sup>2</sup>	T75	Corning, Ottawa, ON, Canada	353136
FALCON Multiwell 6-Well	6-Well plates	Corning, Ottawa, ON, Canada	353046
Ibidi µ-Slide VI <sup>0.4</sup> Collagen IV	Ibidi Collagen IV	Ibidi, Fitchburg, WI, United Sates	80602
Ibidi µ-Slide VI <sup>0.4</sup> IbiTreat	IbiTeat	Ibidi, Fitchburg, WI, United Sates	80606
Qualitative Grade Plain Filter Paper Sheets	filter paper	Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada	09-802-1B
Sterile syringe 10 mL	syringe	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	309605
STERITOP-GP 45 mm 500 mL	Filter top	Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada	SCGPT05RE
Thermo Scientific™ Nalgene™ Oak Ridge High-Speed Polycarbonate Centrifuge Tubes	Ultracentrifuge tube	Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada	05-529C
Transwell® Permeable supports 6.5 mm Insert, 24 well plate 0.4 µm Polyester membrane Thickness 10 µm Tissue Culture Treated, Polystyrene	24 well plate	Corning incorporated, Kennebunk, ME, USA	Costar 3470

Table S2.4 – Detailed list of used equipment

Item	Acronym	Provider	Catalogue #
Leica-TCS-SP5	Confocal microscope	Leica Microsystems Inc., Concord, ON, Canada	N.A.
Biometra TProfessional Basic 96 gradient	ThermoCycler	Analytik Jena	N.A.
BD FACSDiva	flow cytometry software	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	v8.0.1
BD LSR II Flow Cytometry Cell Analyzer	Flow cytometry	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	N.A.
Bead bath Lab armor	warming bath	Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR, United States	74300-714
Corning LSE benchtop shaking incubator	shaking incubator	Corning, Ottawa, ON, Canada	6790
ECIS Z0 and 16W array station	ECIS	Applied Biophysics Inc, Troy, NY, United States	Software v1.2.215.0 PC
Endohm-6 cup	Cup	World Precision Instruments, Sarasota, FL, United States	
Fluorescence elumination system X-cite	fluorescence source	Excelitas, Vaudreuil-Dorion, QC, Canada	120PC Q
Forma™ Steri-Cycle™ CO2 Incubators	incubator	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	370
IX81 Inverted Microscope	Fluorescence microscope	Olympus, Waltham, MA, United States	IX81
Leica MZ16 stereo microscope	dissecting microscope	Leica Microsystems Inc., Concord, ON, Canada	N.A.
MetaMorph Advanced	acquisition software	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, United States	v7.8.9.0
Motic Image plus 3.0	acquisition software	Moticam, Kowloon Bay, Kowloo, Hong Kong	N.A.
MOTICAM 3+ 3.0 MP	camera	Moticam, Kowloon Bay, Kowloo, Hong Kong	
Mr. Frosty Freezing container	freezing container	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	15-350-50
MILLICELL-ERS	TEER	MILLIPOR, Burlington, MA, United States	N.A.
Retiga 2000R CCD Camera	camera	QIMAGING, Surrey, BC, Canada	RET-2000R-F-M-12-C
Sorvall RC 6 Superspeed centrifuge	ultracentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	501057486-6
Sorvall ST 16R centrifuge	centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	75004240
Worthington Liquid Nitrogen Refrigerator	azote Tank	Worthington industries, Columbus, OH, United States	XT34
ZEISS Axiovert S100	bright field microscope	Carl Zeiss Microscopy LLC, Peabody, MA, United States	Axiovert S100

Table S2.5 – FACS antibodies and isotypes.

Target	Host/Isotype	Fluorochrome	Provider	Catalogue	Quantity (µg/test)
PDGFR-β	Rat/IgG2a, kappa	PE	eBioscience	12-1402-81	0.6
PECAM-1	Rat/IgG2a, kappa	PE-Cy7	Biologend	102418	0.25
GLAST-1	Mice/IgG2a	APC	Milteny Biotec	130-098-803	0.5
GFAP	Mice/IgG1, kappa	A488	ThermoFisher scientific	A-21294	0.5
CD45	Rat/IgG2b, kappa	PerCP-Cy5.5	BDbioscience	550994	0.25
CD11b	Rat/IgG2b, kappa	A700	BDbioscience	557960	0.4



**Table S2.6** – Confocal and ICC antibodies.

Target	Host/Isotype	Antibody	Fluorophore	Provider	Catalogue	Dilution
ALCAM	Rabbit/IgG	Primary	N.A.	Abcam	ab109215	1:1000
Claudin-5	Rabbit/IgG	Primary	N.A.	Invitrogen	34-1600	1:200
Donkey anti Rabbit	Donkey/IgG	Secondary	A488	Invitrogen	A32790	1:400
Donkey anti Rat	Donkey/IgG	Secondary	Cy3	Milipore-Sigma	AP189C	1:200
GFAP	Mousse/IgG1k	Primary	A488	Life Technologie	A21294	1:1000
GLAST-1	Mousse/IgG2ak	Primary	APC	Miltenyi Biotec	130-098-803	1:500
Goat anti Rabbit	Goat/IgG	Secondary	A488	Invitrogen	A-11034	1:500
JAM-A	Rat/IgG	Primary	N.A.	Abcam	ab180821	1:200
MCAM	Rabbit/IgG	Primary	N.A.	Abcam	Ab75769	1:2000
NG2	Mousse/IgG1	Primary	A488	Milipore-Sigma	MAB5384A4	1:1000
Occludin	Mouse / IgG1	Primary	A594	Invitrogen	331594	1:100
PDGFR- $\beta$	Rabbit/IgG	Primary	N.A.	Invitrogen	MA5-15143	1:400
PECAM	Rat/ IgG2a, $\kappa$	Primary	N.A.	BDbioscience	558736	1:150
S100b	Rabbit/	Primary	A488	Abcam	ab196442	1:100
VE-Cadh	Rat/IgG2a, $\kappa$	Primary	N.A.	BDbioscience	555289	1:100
ZO-1	Rabbit/IgG	Primary	N.A.	Invitrogen	40-2200	1:1000
ZO-2	Rabbit/IgG	Primary	N.A.	Invitrogen	71-1400	1:100
A-SMA	Mousse/ IgG2a, $\kappa$	Primary	A488	eBioscience	53-9760-82	1:1000
FSP-1	Rabbit/IgG	Primary	A488	Abcam	ab208566	1:100

**Table S2.7** – q-PCR probes and primers

Target	Genes	Efficiency	UPL <sup>a</sup>	Sequence reference	Primer A	Primer B
Cldn-5	Cldn5	98.6	52	NM_013805.4	TTAAGGCACGGGTAGCACTC	ATGTTGGCGAACCAGCAG
Ocln	Ocln	94.1	10	NM_008756.2	GTCCGTGAGGCCTTTTGA	GGTGCATAATGATTGGGTTTG
ZO-1 <sup>b</sup>	ZO-1	94.0	81	NM_009386.2	CGCGGAGAGAGACAAGATGT	GAAGCGTCACTGTGTGCTGT
P-gp	Abcb1a	97.0	18	NM_011076.2	GGGCATTACTTCAAACCTGTCA	TTTACAAGCTTCATTTCCTAATCAA
BCRP	Abcg2	97.0	25	NM_011920.3	AGGTCTGGAAAAGTAGCAGATTC	CTCCATCCCTATGCTTGCC
GLUT-1	Slc2a1	101	4	NM_011400.3	GTATCTGTGTCCTTCTGC	TCGAAGCTTCTCAGCACAC
Hprt	Hprt	91.2	95	NM_013556.2	TCCTCCTCAGACCGCTTTT	CCTGGTTCATCATCGCTAATC
Gapdh	Gapdh	91.2	80	NM_008084.2	TGTCCTGCTGGATCTGAC	CCTGCTTACCACCTTCTTG
Tbp	Tbp	105	97	NM_013684.3	GGGAGAATCATGGACCAGAA	GATGGGAATTCAGGAGTCA

<sup>a</sup>: Universal Probe Library from Roche Life Science.

<sup>b</sup>: Two primer pairs were used to detect the two isoforms of zonula occludens 1 (ZO-1).

## 2.8 References

- [1] J. Banerjee, Y. Shi, and H. S. Azevedo. In vitro blood–brain barrier models for drug research: state-of-the-art and new perspectives on reconstituting these models on artificial basement membrane platforms. *Drug Discovery Today*, 21(9):1367–1386, 2016. ISSN 1359-6446. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.05.020> .

- [2] S. M. Stamatovic, A. M. Johnson, R. F. Keep, *et al.* Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers*, 4(1):e1154641, 2016. ISSN 2168-8362 2168-8370. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1154641> .
- [3] B. Engelhardt and L. Sorokin. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol*, 31(4):497–511, 2009. ISSN 1863-2300. <https://doi.org/10.1007/s00281-009-0177-0> .
- [4] M.-A. Lécuyer, H. Kebir, and A. Prat. Glial influences on Bbb functions and molecular players in immune cell trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1862(3):472–482, 2016. ISSN 0925-4439. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.10.004> .
- [5] W. M. Pardridge. The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development. *NeuroRX*, 2(1):3–14, 2005. ISSN 1545-5343. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.3> .
- [6] Y. Sharif, F. Jumah, L. Coplan, *et al.* Blood brain barrier: A review of its anatomy and physiology in health and disease. *Clin Anat*, 31(6):812–823, 2018. ISSN 0897-3806. <https://doi.org/10.1002/ca.23083> .
- [7] H. P. Modarres, M. Janmaleki, M. Novin, *et al.* In vitro models and systems for evaluating the dynamics of drug delivery to the healthy and diseased brain. *Journal of Controlled Release*, 273:108–130, 2018. ISSN 0168-3659. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.024> .
- [8] A. T. C. C. S. Development Organization Workgroup Asn. Cell line misidentification: the beginning of the end. *Nature Reviews Cancer*, 10:441, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrc2852> .
- [9] J. R. Lorsch, F. S. Collins, and J. Lippincott-Schwartz. Cell Biology. Fixing problems with cell lines. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6216):1452–1453, 2014. ISSN 1095-9203 0036-8075. <https://doi.org/10.1126/science.1259110> .
- [10] C. J. Czupalla, S. Liebner, and K. Devraj. *In Vitro Models of the Blood–Brain Barrier*, pages 415–437. Springer New York, New York, NY, 2014. ISBN 978-1-4939-0320-7. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7\\_34](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7_34) .
- [11] C. Laroche, R. Cayrol, H. Kebir, *et al.* Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain*, 135(Pt 10):2906–24, 2012. ISSN 1460-2156. <https://doi.org/10.1093/brain/aws212> .
- [12] M.-A. Lécuyer, O. Saint-Laurent, L. Bourbonnière, *et al.* Dual role of AlCAM in neuroinflammation and blood–brain barrier homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(4):E524–E533, 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614336114> .

- [13] M. Deli, C. Ábrahám, Y. Kataoka, *et al.* Permeability Studies on In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1):59–127, 2005. ISSN 0272-4340. <https://doi.org/10.1007/s10571-004-1377-8> .
- [14] A. T. Chinwalla, L. L. Cook, K. D. Delehaunty, *et al.* Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915):520–562, 2002. ISSN 1476-4687. <https://doi.org/10.1038/nature01262> .
- [15] M. J. Justice and P. Dhillon. Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Disease Models & Mechanisms*, 9(2):101–103, 2016. <https://doi.org/10.1242/dmm.024547> .
- [16] F. Goto, K. Goto, K. Weindel, *et al.* Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 69(5):508–517, 1993. ISSN 0023-6837.
- [17] P. G. Woost, M. M. Jumblatt, R. A. Eiferman, *et al.* Growth factors and corneal endothelial cells: I. Stimulation of bovine corneal endothelial cell Dna synthesis by defined growth factors. *Cornea*, 11(1):1–10, 1992. ISSN 0277-3740. <https://doi.org/10.1097/00003226-199201000-00001> .
- [18] A. R. Calabria, C. Weidenfeller, A. R. Jones, *et al.* Puromycin-purified rat brain microvascular endothelial cell cultures exhibit improved barrier properties in response to glucocorticoid induction. *Journal of Neurochemistry*, 97(4):922–933, 2006. ISSN 1471-4159. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03793.x> .
- [19] N. Perrière, P. Demeuse, E. Garcia, *et al.* Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood–brain barrier-specific properties. *Journal of Neurochemistry*, 93(2):279–289, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.03020.x> .
- [20] R. Cayrol, K. Wosik, J. L. Berard, *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol*, 9(2):137–45, 2008. ISSN 1529-2916. <https://doi.org/10.1038/ni1551> .
- [21] M. W. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time Rt-Pcr. *Nucleic acids research*, 29(9):e45–e45, 2001. ISSN 1362-4962 0305-1048. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45> .

- [22] A. Avdeef. How well can in vitro brain microcapillary endothelial cell models predict rodent in vivo blood-brain barrier permeability? *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43(3):109–124, 2011. ISSN 0928-0987. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2011.04.001> .
- [23] A. Kumar, S. S. D'Souza, O. V. Moskvina, *et al.* Specification and Diversification of Pericytes and Smooth Muscle Cells from Mesenchymal Angioblasts. *Cell Reports*, 19(9):1902–1916, 2017. ISSN 2211-1247. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.05.019> .
- [24] S. Saraswati, S. M. W. Marrow, L. A. Watch, *et al.* Identification of a pro-angiogenic functional role for Fsp1-positive fibroblast subtype in wound healing. *Nature Communications*, 10(1):3027, 2019. ISSN 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10965-9> .
- [25] J. Middeldorp and E. M. Hol. GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology*, 93(3):421–443, 2011. ISSN 0301-0082. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.01.005> .
- [26] E. Raponi, F. Agenes, C. Delphin, *et al.* S100B expression defines a state in which GfaP-expressing cells lose their neural stem cell potential and acquire a more mature developmental stage. *Glia*, 55(2):165–177, 2007. ISSN 0894-1491 1098-1136. <https://doi.org/10.1002/glia.20445> .
- [27] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, and E. Hansson. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7:41, 2006. <https://doi.org/10.1038/nrn1824> .
- [28] Y. Xu, X. Xie, Y. Duan, *et al.* A review of impedance measurements of whole cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 77:824–836, 2016. ISSN 0956-5663. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.10.027> .
- [29] B. Bhargavan and G. D. Kanmogne. Differential Mechanisms of Inflammation and Endothelial Dysfunction by Hiv-1 Subtype-B and Recombinant Crf02\_Ag Tat Proteins on Human Brain Microvascular Endothelial Cells: Implications for Viral Neuropathogenesis. *Mol Neurobiol*, 55(2):1352–1363, 2018. ISSN 0893-7648. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0382-0> .
- [30] K. Kangwantis, E. Pinteaux, and J. Penny. The extracellular matrix protein laminin-10 promotes blood-brain barrier repair after hypoxia and inflammation in vitro. *J Neuroinflammation*, 13:25, 2016. ISSN 1742-2094. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0495-9> .
- [31] W. A. Banks, A. M. Gray, M. A. Erickson, *et al.* Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and ele-

- ments of the neurovascular unit. *J Neuroinflammation*, 12:223, 2015. ISSN 1742-2094. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1> .
- [32] K. D. Rochfort, L. E. Collins, A. McLoughlin, *et al.* Tumour necrosis factor- $\alpha$  - mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6. *Journal of Neurochemistry*, 136(3):564–572, 2016. <https://doi.org/10.1111/jnc.13408> .
- [33] E. M. Cornford and S. Hyman. Localization of brain endothelial luminal and abluminal transporters with immunogold electron microscopy. *NeuroRx*, 2(1):27–43, 2005. ISSN 1545-5343 (Print) 1545-5343. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.27> .
- [34] J. Bicker, G. Alves, A. Fortuna, *et al.* Blood–brain barrier models and their relevance for a successful development of Cns drug delivery systems: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 87(3):409–432, 2014. ISSN 0939-6411. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.012> .
- [35] A. R. Choudhury. A comprehensive review of cell isolation methods. *MATER METHODS*, 7(2260), 2017. <https://doi.org//dx.doi.org/10.13070/mm.en.7.2260> .
- [36] P. J. G. A. G. de Boer. *The Blood–Brain Barrier and its Effect on Absorption and Distribution*. <https://doi.org/10.1002/9780470249031.ch11> .
- [37] A. Boroujerdi, U. Tigges, J. Welsler-Alves, *et al.* *Isolation and Culture of Primary Pericytes from Mouse Brain*, volume 1135 of *Methods in Molecular Biology*, book section 31, pages 383–392. Springer New York, 2014. ISBN 978-1-4939-0319-1. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7\\_31](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7_31) .
- [38] D. G. Souza, B. Bellaver, D. O. Souza, *et al.* Characterization of Adult Rat Astrocyte Cultures. *PLoS ONE*, 8(3):e60282, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060282> .
- [39] X. Sun, X. Hu, D. Wang, *et al.* Establishment and characterization of primary astrocyte culture from adult mouse brain. *Brain Research Bulletin*, 132:10–19, 2017. ISSN 0361-9230. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.05.002> .
- [40] U. Tigges, J. V. Welsler-Alves, A. Boroujerdi, *et al.* A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvascular Research*, 84(1):74–80, 2012. ISSN 0026-2862. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.03.008> .
- [41] F. Takata, S. Dohgu, A. Yamauchi, *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*, 8(1):e55166, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055166> .

- [42] J. Chen, Y. Luo, H. Hui, *et al.* CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(36):E7622–E7631, 2017. ISSN 1091-6490 0027-8424. <https://doi.org/10.1073/pnas.1710848114> .
- [43] J. C. Assmann, K. Müller, J. Wenzel, *et al.* Isolation and Cultivation of Primary Brain Endothelial Cells from Adult Mice. *Bio-protocol*, 7(10):e2294, 2017. ISSN 2331-8325. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2294> .
- [44] T. Ruck, S. Bittner, L. Epping, *et al.* Isolation of primary murine brain microvascular endothelial cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (93):e52204–e52204, 2014. ISSN 1940-087X. <https://doi.org/10.3791/52204> .
- [45] J. V. Welser-Alves, A. Boroujerdi, and R. Milner. *Isolation and Culture of Primary Mouse Brain Endothelial Cells*, pages 345–356. Springer New York, New York, NY, 2014. ISBN 978-1-4939-0320-7. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7\\_28](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7_28) .
- [46] B. Wylot, K. Konarzewska, L. Bugajski, *et al.* Isolation of vascular endothelial cells from intact and injured murine brain cortex—technical issues and pitfalls in FacS analysis of the nervous tissue. *Cytometry Part A*, 87(10):908–920, 2015. ISSN 1552-4922. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22677> .
- [47] H. Yousef, C. J. Czupalla, D. Lee, *et al.* Papain-based Single Cell Isolation of Primary Murine Brain Endothelial Cells Using Flow Cytometry. *Bio-protocol*, 8(22):e3091, 2018. ISSN 2331-8325. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3091> .
- [48] W. A. Banks, A. M. Gray, M. A. Erickson, *et al.* Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1):223, 2015. ISSN 1742-2094. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1> .
- [49] J. J. Lochhead, P. T. Ronaldson, and T. P. Davis. Hypoxic Stress and Inflammatory Pain Disrupt Blood-Brain Barrier Tight Junctions: Implications for Drug Delivery to the Central Nervous System. *The AAPS Journal*, 19(4):910–920, 2017. ISSN 1550-7416. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0076-6> .
- [50] A. Wolff, M. Antfolk, B. Brodin, *et al.* In Vitro Blood-Brain Barrier Models-An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches. *J Pharm Sci*, 2015. ISSN 1520-6017. <https://doi.org/10.1002/jps.24329> .



- [51] M. Feldmann, P. Pathipati, R. A. Sheldon, *et al.* Isolating astrocytes and neurons sequentially from postnatal murine brains with a magnetic cell separation technique. *Journal of Biological Methods*, 1(2):e11, 2014. ISSN 2326-9901.
- [52] S. Schildge, C. Bohrer, K. Beck, *et al.* Isolation and Culture of Mouse Cortical Astrocytes. (71):e50079, 2013. ISSN 1940-087X. <https://doi.org/10.3791/50079> .
- [53] J. Saura. Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *Journal of Neuroinflammation*, 4(1):26, 2007. ISSN 1742-2094. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-4-26> .
- [54] S. Nakagawa, M. A. Deli, H. Kawaguchi, *et al.* A new blood–brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry International*, 54(3–4):253–263, 2009. ISSN 0197-0186. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.002> .
- [55] L. Neng, W. Zhang, A. Hassan, *et al.* Isolation and culture of endothelial cells, pericytes and perivascular resident macrophage-like melanocytes from the young mouse ear. *Nat. Protocols*, 8(4):709–720, 2013. ISSN 1754-2189. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.033> .
- [56] E. E. Crouch and F. Doetsch. FACS isolation of endothelial cells and pericytes from mouse brain microregions. *Nature Protocols*, 13:738, 2018. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.158> .
- [57] P. Dore-Duffy and N. Esen. *The Microvascular Pericyte: Approaches to Isolation, Characterization, and Cultivation*, pages 53–65. Springer International Publishing, Cham, 2018. ISBN 978-3-030-02601-1. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-02601-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-030-02601-1_5) .
- [58] Y. Yao, Z.-L. Chen, E. H. Norris, *et al.* Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nature communications*, 5:3413–3413, 2014. ISSN 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/ncomms4413> .

## 2.9 Résultats supplémentaires

### 2.9.1 Les éléments suivants ont été modifiés par rapport à l'article publié :

- Le numéro de protocole approuvé pour l'expérimentation animale est le #16-083, cette version contient tous les détails de protocole. Le numéro de protocole #18-083 réfère seulement au renouvellement du protocole #16-083.
- Dans la section matériels et méthodes, le titre de la méthode portant sur la TEER a été modifié.
- Les barres d'échelles ont été ajoutées pour les figures [Fig S2.3](#) et [Fig S2.4](#).

### **2.9.2 Définition d'une unité utilisée pour les cytokines**

Une unité (1 U) représente la concentration de la dose efficace médiane ( $ED_{50}$ ) déterminée par le fournisseur de cytokine en réalisant un essai de cytotoxicité sur une lignée cellulaire. Le fournisseur rapporte donc une plage de concentration (exemple,  $ED_{50} = 0,008-0,05 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ). On considère que 1 U est une concentration de  $(0,008 + 0,05) / 2 = 0,029 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ .

### **2.9.3 Nombre d'animaux utilisés par modèle**

Il faut 20 souris adultes pour réaliser le protocole d'isolation des cellules endothéliales. Il faut 5 souris pour réaliser les protocoles d'isolation des péricytes et des astrocytes [S2.1](#).



## Chapitre 3

# ***Article 2 - IVIVC Assessment of Two Mouse Brain Endothelial Cell Models for Drug Screening***

Ina Puscas <sup>†,1</sup>, Florian Bernard-Patrzynski <sup>†,1</sup>, Martin Jutras <sup>1</sup>, Marc-André Lécuyer <sup>2,3</sup>, Lyne Bourbonnière <sup>2</sup>, Alexandre Prat <sup>2</sup>, Grégoire Leclair <sup>1,\*</sup> and V. Gaëlle Roullin <sup>1,\*</sup>

† these authors equally contributed to this work.

1. Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada.
2. Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada.
3. Institute for Multiple Sclerosis Research and Neuroimmunology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany

Published: November 8, 2019 in *pharmaceutics*, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110587>

### 3.1 Abstract

Since most preclinical drug permeability assays across the blood-brain barrier (BBB) are still evaluated in rodents, we compared an *in vitro* mouse primary endothelial cell model to the mouse b.End3 and the acellular parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) models for drug screening purposes. The mRNA expression of key feature membrane proteins of primary and b.End.3 mouse brain endothelial cells were compared. Transwell<sup>®</sup> monolayer models were further characterized in terms of tightness and integrity. The *in vitro in vivo* correlation (IVIVC) was obtained by the correlation of the *in vitro* permeability data with log BB values obtained in mice for seven drugs. The mouse primary model showed higher monolayer integrity and levels of mRNA expression of BBB tight junction (TJ) proteins and membrane transporters (MBRT), especially for the efflux transporter P-gp. 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. The primary monolayer mouse model came out as a simple and reliable candidate for the prediction of drug permeability across the BBB. This model encompasses a rapid set-up, a fair reproduction of BBB tissue characteristics, and an accurate drug screening.

### 3.2 Introduction

Research and drug discovery programs for central nervous system (CNS) therapeutics are among the most challenging and expensive in the pharmaceutical research field. This is mainly due to the high complexity of the brain structure, the side effects caused by CNS drugs, and their poor blood-brain barrier (BBB) permeation [1]. The BBB mostly consists 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]. Lipophilic molecules with a molecular weight lower than 400 Da are known to reach the brain parenchyma by passive diffusion, which postulates their passage through the cellular layer. The bypass between two adjacent cells, i.e., the paracellular route, is available to small hydrophilic molecules, such as sucrose or mannitol [4]. The active passage through the BBB uses a carrier transporter to move molecules from the blood to the brain, once the recognition of the substrate by its transporter occurs [5]. As such, in the early stages of drug discovery, *in silico*, *in vitro*, and *in vivo* tests are used to predict the BBB permeability and select the best drug candidates, with the aim to enhance their odds of success [6].

*In silico* models are computational mathematical simulations based on physicochemical properties such as molecular weight, lipophilicity, solubility, and number of hydrogen bonds [7]. These models constitute an excellent initial screening, enabling a rapid selection of drug candidates suit-

able for *in vitro* testing. The advent of machine learning and efforts to take into account efflux and uptake transports will definitely enhance the reliability of these models.

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 setups made from ECs along with astrocytes, pericytes, neurons, or microglia [8]. 3D microfluidic dynamic models, 3D collagen matrix models, 3D flow systems [9] or BBB spheroids [10] are designed to reproduce the BBB microenvironment and cell-cell communication. However, the complexity and difficult reproducibility of 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, adoption of *in vitro* models offering meaningful and relevant insights during early stages of pharmaceutical drug development could contribute to improve selection success rates, as well as reducing excessive animal testing during later stage of preclinical phase [11].

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 [12]. Consequently, a reliable *in vitro* model for the screening of large libraries of chemical compounds is needed. The biorelevance of an *in vitro* BBB model is frequently evaluated by measuring two parameters. First, the tightness of the model is assessed by the transendothelial electrical resistance (TEER). A low TEER value is linked to an increase in passive permeability [13]. The second parameter is the expression of the efflux transporter MDR1 (multidrug resistance 1 protein), also named the p-glycoprotein (P-gp). This protein is the principal reason of many drug development failures, as it is known to actively pump out small lipophilic drugs from the cytoplasm of endothelial cells to the blood circulation, thus preventing compounds to reach the brain parenchyma. Both parameters play key roles in the permeability of drug molecules across the BBB; however they are not the only ones [14]. In addition to TEER measurements, we chose to assess major BBB TJ proteins, namely claudin-5 (Cldn-5), zonula occludens 1 (ZO-1) and occludin (Ocln). BBB is also known to express high levels of efflux transporters, such as P-gp and the breast cancer resistance protein (BCRP). Finally, solute-like carriers, a family of influx transporters including GLUT-1 and LAT-1, are also overexpressed in BBB endothelial cells. Currently, in order to screen BBB drug candidates, pharmaceutical industries mostly use *in vitro* models which were first described to test intestine permeability. They are mainly the totally acellular parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) or non-BBB cellular models, such as the Caco-2 cells, issued from a heterogeneous human epithelial colorectal adenocarcinoma, or the MDCK-MDR1 cell line, a canine renal epithelial model. [15]. PAMPA, a non-cellular high-throughput, low-cost technique, only predicts drug permeation mediated by passive diffusion. Caco-2 and

MDCK-MDR1 cell models, known for their high TEER and expression of P-gp protein, are, however, not brain-derived, thus morphologically different from cerebral endothelial cells. Indeed, drug transport across the BBB is inversely correlated to the enhanced presence of specific TJ and specialized MBRT proteins; however those proteins are less expressed in the previously mentioned cell models than in BBB endothelial cells [16]. Those mentioned characteristics should be present in *in vitro* models meant for BBB drug screening.

As far as brain cells are concerned, the most well-established 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 [17]. These immortalized cell lines are commercially available tools, they proliferate well, and are easy to handle. On the other hand, primary BBB ECs, originating from brain microvessels, are thought to preserve most of *in vivo* characteristics prone to be lost during the immortalization process. For instance, the hCMEC/D3 cell line is known to present lower levels of claudin-5 expression as well as other tight junctions, overall leading to leaky models [13]. Primary cells are often isolated from bovine, porcine, rat, mouse, or human brains [13]. Human primary cells are not readily available, especially from healthy brain tissues. Induced pluripotent stem cells (iPSC) are proposed as a theoretically unlimited renewable source of human brain cells. However, the generation of purified brain-derived ECs from iPSC is a few weeks long process using complex, expensive differentiation medium. Overcoming these issues will guarantee the widespread use of iPSCs in basic research [18]. Bovine and porcine EC isolations yield a large amount of cell material. Yet, the housing and maintenance of those animals in lab research are complicated and so, the brains are usually acquired from slaughterhouses [19]. However, in order to be used in research work, animals should entirely comply with disease and safety controls. On the contrary, rats and mice are ubiquitous, well-established small laboratory animals, readily available to most labs worldwide. Mice also display another advantage over human models as several genetically-modified mice have already been produced, including humanized mice expressing human transporters [20]. Due to their rapid reproduction and maturation to adulthood, they are both good choice models to retrieve primary cells.

In this study, we hypothesized that using primary mouse cells may offer a closer representation to the major BBB characteristics, due to better preserved expression of transporters and TJ proteins implicated in drug trafficking across the BBB. We supposed that this primary model could still allow for a rapid screening of drug candidates without increasing the overall complexity of evaluating drug permeability. To this end, two mouse brain ECs *in vitro* models were compared and evaluated for their relevance as BBB drug screening models. One of them used freshly-isolated primary cells and the second one used the immortalized bEnd.3 cells. Ultimately, the cellular models were measured up with the early-stage pharmaceutical drug screening tool PAMPA-BBB, a non-cellular model consisting of a polymeric membrane soaked with porcine brain phospholipids (PBL). Cel-

lular models were designed in a static, two-compartment monolayer model. MBRT and TJ protein expressions 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).

### 3.3 Materials and Methods

#### 3.3.1 Chemical 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 (Cldn-5) polyclonal antibodies, goat anti-rabbit immunoglobulins conjugated with Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 and Slow Fade Diamond Antifade Mountant with DAPI were purchased from Invitrogen<sup>™</sup> (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 (New York, NY, USA). Transwell<sup>®</sup> Costar 24-well plates (Costar<sup>®</sup>: 3470; 6.5 mm inserts; polyester membrane; pore size: 0.4 µm; pore density,  $4 \times 10^6$  pores/cm<sup>2</sup>) were purchased from Corning Inc. (Kennebunk, ME, USA). (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (MTS) cells proliferation kit were purchased from Abcam<sup>®</sup> (Toronto, ON, Canada). Brain mouse endothelial cell line bEnd.3 (ATCC<sup>®</sup> CRL-2299) was purchased from Cedarlane (Burlington, ON, Canada) and was used from passages 8 to 20.

#### 3.3.2 Animals and Cell Culture

All animals (C57BL/6 mice) were obtained from Charles River (Senneville, QC, Canada) and thereafter bred at the Marcelle-Coutu animal facility, Université de Montréal; they were treated in com-

pliance 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 (approved protocols #17-078 and -079, granted on 22 September 2017, renewed on 28 September 2018). The animal protocols further complied with the health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

### 3.3.2.1 Primary Cell Isolation and Culture

Primary brain mouse endothelial cells (ECs) were isolated from 5 to 8-week-old C57BL/6 mice, according to the protocol reported by Lécuyer *et al.* [21]. Typically, 20 female and male mice were euthanized under CO<sub>2</sub>. Brains were surgically removed and then meninges were rolled out prior to mechanical digestion. Mechanical digestion was performed by finely slicing brain tissues, followed by forcing the sliced tissues five times first through a 18-G needle then a 20-G one. 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 centrifuged twice (1000× *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 1000× *g* for 10 min, 4 °C. Percoll residues were removed by centrifuging the capillaries 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/cm<sup>2</sup> reconstituted in DPBS. On the day one of the isolation, the capillaries were cultured in ECs 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 ECs 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.

### 3.3.2.2 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% CO<sub>2</sub> incubator (Forma™ Steri-Cycle™ CO<sub>2</sub>, Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). The culture medium was changed every two days. When confluent, cells were harvested using trypsin-EDTA 0.25%. All experiments were performed on cells at passages 8 to 20.

### 3.3.2.3 Morphological Cell Characterization

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

### 3.3.2.4 Puromycin Cell Viability

Cell proliferation ability in presence of increasing puromycin concentrations was investigated on ECs and bEnd.3 cells by a MTS assay. Briefly,  $5 \times 10^3$  cells were seeded in each well of a 96-well plate, in a final volume of 200  $\mu\text{L}$ /well. Cells were allowed to adhere 24 h prior to replacing all culture media with 100  $\mu\text{L}$  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%  $\text{CO}_2$  incubator for 24 h. Thereafter, 11  $\mu\text{L}$  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 medium, which was quantified by measuring the absorbance at 490 nm (Safire spectrophotometer, Tecan, Männedorf, Switzerland). Negative controls were untreated cells, whereas positive controls were cells treated with 0.1% of triton 100  $\times$  1 h prior adding MTS. Cell viability was calculated as follows (Equation 3.1):

$$\% \text{ viable cells} = (\text{OD}_{\text{assay}} - \text{OD}_{\text{medium}}) / (\text{OD}_{\text{untreated cells}} - \text{OD}_{\text{medium}}) \times 100 \quad (3.1)$$

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

## 3.3.3 Model Assembly

To build ECs models, cells were seeded inside the upper inserts of Transwell<sup>®</sup> 24-well plates. Prior to seeding, the 6.5 mm polyester membranes [22] were coated with a type IV collagen solution (5  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). After 4 h, excess collagen was removed. Cells were then seeded at  $2 \times 10^5$  cells/ $\text{cm}^2$  [23]. 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 °C/5% $\text{CO}_2$ . Media were changed every two days. Under these conditions, the *in vitro* models were ready within 7 days.

### 3.3.3.1 Evaluation of the Model Integrity

- 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. Prior to measurements, Transwell® plates were equilibrated for 20 min at room temperature (RT). Then inserts were transferred in the Endohm-6 cup (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) and the ohmic resistance was measured using the Millicell® ERS voltmeter (Millipore, MA, USA). Model resistances were measured in their respective growing medium. TEER<sub>total</sub> values were calculated by multiplying the obtained resistance (ohm) by the insert area (S, cm<sup>2</sup>), as in Equation 3.2. To calculate the TEER of the monolayer, the mean TEER value of cell-free inserts was subtracted to the TEER<sub>total</sub>, as in Equation 3.3:

$$\text{TEER}_{\text{total}} = \text{Resistance } (\Omega) \times S_{\text{insert}} \text{ (cm}^2\text{)} \quad (3.2)$$

$$\text{TEER}_{\text{monolayer}} \text{ (}\Omega \times \text{cm}^2\text{)} = \text{TEER}_{\text{total}} - \text{TEER}_{\text{cell-free insert}} \quad (3.3)$$

- 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 µL of X-DMEM in the lower compartments. Media from the upper compartments were replaced by either 100 µL of 10 µg/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 µL/well). Samples concentrations were determined by fluorescence (Saffire, Tecan, Männedorf, Switzerland). Excitation/emission wavelengths were 485/520 nm and 492/518 nm for NaFl and FITC-Dextran, respectively. The fluorescent marker endothelial permeability coefficient (Pe) was calculated as fully detailed in .

### 3.3.3.2 *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). Chlorpromazine (D1, an antipsychotic agent) and midazolam (D2, a sedative drug), readily permeate through the BBB. Caffeine (D3) and theophylline (D4) are mild brain psychostimulants and so reach the brain tissue at a lesser extent. Verapamil (D5, a calcium-channel blocker), atenolol (D6, a cardioselective β-blocker) and tenoxicam (D7, an anti-inflammatory agent) are not normally distributed to the brain. Thus, this panel of drugs covers high, moderate and low BBB passage, as well as a P-gp substrate (verapamil, D5).



**Table 3.1** – List of the drugs selected for the validation of ECs and bEnd3 monolayer models.

Abbreviation	Name	MW (g/mol)	log P <sup>1</sup>
D1	Chlorpromazine hydrochloride (Enzo life Sciences, Lausanne, Switzerland USA)	355.3	5.41
D2	Midazolam (TRC, Lowell, MA, USA)	325.8	4.33
D3	Caffeine, anhydrous (Medisca, Montréal, QC, Canada)	194.2	-0.07
D4	Theophylline, anhydrous (Medisca, QC, Canada)	180.2	-0.02
D5	Verapamil hydrochloride (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)	491.1	3.79
D6	Atenolol (Acros Organics, New Jersey, USA)	266.3	0.16
D7	Tenoxicam (Alfa Aesar, Haverhill, MA, USA)	337.4	1.90

<sup>1</sup> Information source: PubChem

Inserts containing monolayer models were transferred to a 24-well plate containing 600  $\mu\text{L}$  of X-DMEM in the lower compartments. Media from the upper compartments were replaced by 100  $\mu\text{L}$  of the tested drug solubilized in X-DMEM (10  $\mu\text{M}$ ,  $n = 4/\text{drug}$ ). 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 [3.3.6](#).  $p$  values were calculated as indicated in [3.3.3.3](#).

### 3.3.3.3 Permeability Coefficient (Pe) Calculation

The Pe was calculated as previously stated in the work of *Deliet al.* (2005) [24] and *Nakagawa et al.* (2009) [23]. First the cleared volume ( $\mu\text{L}$ ), corresponding to the tested molecule transport from the upper compartment to the lower compartment, was calculated from Equation (3.4):

$$\text{Cleared volume } (\mu\text{L}) = (C_{\text{lower compartment}} \times V_{\text{lower compartment}}) / C_{\text{upper compartment}} \quad (3.4)$$

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

Then, the cumulative cleared volume at each time point (15, 30, 45, 60 and 75 min) was calculated. The product (PS) of the drug permeability by the insert area (0.33  $\text{cm}^2$ ) was calculated as the slope of the plotting of cumulative volumes against time. The PS of the ECs monolayer were calculated using Equation (3.5).

$$1/\text{PS}_{\text{endo}} = 1/\text{PS}_{\text{total}} - 1/\text{PS}_{\text{insert}} \quad (3.5)$$

where  $\text{PS}_{\text{endo}}$  is the product between the Pe of the ECs monolayer and the insert area ( $\text{cm}^3/\text{s}$ );  $\text{PS}_{\text{total}}$  is the product between the Pe of the tested model and the insert area ( $\text{cm}^3/\text{s}$ );  $\text{PS}_{\text{insert}}$  is the product between the Pe of the cell-free insert and the insert area ( $\text{cm}^3/\text{s}$ ).

Finally, the  $P_e$  of the ECs monolayer was calculated as shown in Equation (3.6):

$$P_e \text{ (cm}^2\text{/s)} = PS_{\text{endo}}/S_{\text{insert}} \quad (3.6)$$

**Table 3.2** – Summary of mass spectrometry conditions.

HPLC	Agilent 1100 Series			
MS/MS	MDS Sciex 4000 Qtrap			
Software	Analyst® (v1.6.2)			
Ionisation source, mode	Turbo electrospray, positive ionisation			
Scan mode	Multiple reaction monitoring (MRM)			
	Compounds	DP (V)	MRM	CE (eV)
Analyte parameters	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
	Theophilline	70	194.1 > 138.2	27
	Tenoxicam	71	337.3 > 121.0	33
	Metochlopramide (ISTD)	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 <sub>2</sub> O B: 0.1% FA + ACN	
	Gradient		2 to 98% B in 3.5 min	
Flow rate		0.75 mL·min <sup>-1</sup>		
Column temperature		45 °C		
Injection volume		4 µL		
Injection temperature		5 °C		
Column	YMC-Pack ODS-AQ, (50 × 3.0 mm, 5 µm)			

### 3.3.3.4 Model Characterization

#### • Immunostaining

To characterize the monolayer model integrity, 7-day old ECs monolayers were stained for junctional proteins with ZO-1 and Cldn-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 for 15 min at room temperature (RT, 21 ± 1 °C) with cold methanol (−20 °C). 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-Cldn-5 primary antibodies were performed in the same conditions as the BSA blocking step. Finally, cells were incubated with the secondary anti-

body 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, Waltham, MA, USA), equipped with a Retiga 2000R CCD camera (QImaging, Surrey, BC, Canada). Images were acquired with a MetaMorph Advanced software (v. 7.8.9.0, Molecular Devices, LLC, San José, CA, USA) and processed with ImageJ software (v1.51, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

- Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

Total RNA was extracted from lysed ECs 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, Hilden, Germany). Then mRNA was extracted on RNase mini spin columns (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer guidelines. The obtained RNA was reverse-transcribed into cDNA using a high-capacity cDNA Reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada) and amplified in a thermocycler (Analytic Jena, 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 s and 60 °C for 30 sec, using the ViiA7 or QuantStudio 7 Flex QPCR system (Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). The comparative CT method ( $2^{-\Delta\Delta CT}$  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<sup>®</sup> software (v. 7.01, GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

**Table 3.3** – Primers sequences and 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/P-gp/Abcb1a	Efflux transporter	NM_011076.2	gggcatttacttcaactgtca/ttacaagcttattccataattcaa
Breast cancer resistance protein/BCRP/Abcg2	Efflux transporter	NM_011920.3	aggtctggaaaaagtagcagattc/cccatcctattgctgtcc
Glucose transporter-1/GLUT-1/Slc2a1	Uptake transporter	NM_011400.3	gtatcctgttgcccttctgc/tcgaagcttctcagcacac
L-type amino acid transporter/LAT-1/Slc7a5	Uptake transporter	NM_011404.3	tcagcttctcaactggctgt/ggaggccagattcaact
Zonula occludens-1/ZO-1/Tjp1	Tight junction	NM_009386.2, NM_001163574	cgcggagagagacaagatgt/gaagcgtcactgtgtgtctgt
Occludin/Ocln/Ocln	Tight junction	NM_008756.2	gtccgtgagcccttga/gtgcataatgattgggtttg
Claudin-5/Cldn5/Cldn5	Tight junction	NM_013805.4	ttaggcacggtagcactc/atgttggcgaaccagcag
Hypoxanthine-guanine Phosphoribosyltransferase/HPRT/Hprt	Endogenous protein	NM_013556.2	tcctctcagaccgcttt/ctggttcatcctcgtcaate

- Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)

ddPCR was performed on cDNA. The ddPCR system QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) was used to fractionate samples into ~20,000 droplets. Amplification was performed in a 20- $\mu$ 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  $\mu$ L.

### 3.3.4 Parallel Artificial Membrane Permeability Assay (PAMPA) 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. The resulting lipid film was then solubilized with 1 mL of dodecane, to reach a PBL concentration of 20 mg  $\times$  mL<sup>-1</sup>. The PAMPA setting consisted of two parts, the acceptor plate equipped with 0.45  $\mu$ m PVDF filters and the donor bottom 96-well plate. Prior to starting the assay, the PVDF filters were coated with 10  $\mu$ L of the 20 mg  $\times$  mL<sup>-1</sup> PBL solution and then dried for 10 min at RT. As the PAMPA model used in this work was designed using PBL, it will be referred as PAMPA-BBB throughout this research article.

Standard stock solutions of verapamil (15 mM), midazolam (53 mM) and tenoxicam (50 mM) were prepared in DMSO, whereas those of chlorpromazine (28 mM), caffeine (26 mM), atenolol (3.7 mM) and theophylline (46 mM) were prepared in PBS at pH = 7. Thereafter, the seven drug solutions were combined and further diluted with PBS in order to obtain a working solution of 50  $\mu$ M (0.23% DMSO), named the cassette. Its stability was established at 5  $\pm$  2°C and -80  $\pm$  2°C for 16 and 31 days, respectively.

The acceptor plate containing 300  $\mu$ L/well of PBS was placed on top of the donor plate containing 300  $\mu$ L/well of the cassette, thus creating a 'sandwich' layout with PBL-coated filters in between. The setting was incubated at 37 °C for 18 h under shaking at 50 rpm (MaxQ 4000, Barnstead/Lab-line® Melrose Park, IL, USA). Donor and acceptor samples were analyzed by LC-MS/MS (3.3.6), using metoclopramide (250 mM) as the internal standard (ISTD).

Drug permeability, namely Papp, was calculated with Equation (3.7), according to Balimaneet *al.* [25]:

$$P_{app} = V \times dC/A \times C_0 \times dt = Q/t \times A \times C_0 = rC_r \times V_r/t \times A \times rC_0 \quad (3.7)$$

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

### 3.3.5 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- $\mu\text{m}$  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 h 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 3000 rpm/4 °C/20 min. Plasma samples were either immediately analyzed or stored at  $-80$  °C until further analysis. Prior to 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, Westbury, NY, USA). Collected samples were analyzed by LC-MS/MS, with metoclopramide as ITSD (Table 3.2 and section 3.3.6). The log of the brain-to-blood ratio was calculated according to Bickel's report [26], as in Equation (3.8):

$$\log \text{BB} = \log (C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}}) \quad (3.8)$$

where  $C_{\text{brain}}$  is the concentration quantified in the brain and  $C_{\text{blood}}$  the concentration quantified in the plasma.

### *In Vitro/In Vivo* Correlation (IVIVC)

The correlation between log BB and log Papp or log Pe was established using the GraphPad Prism® software (v. 7.01) by plotting the average log Papp or log Pe value of each drug against its mean *in vivo* counterpart (log BB). Coefficient of determination ( $r^2$ ) was then calculated using linear regres-

sion. 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 Equation (3.9):

$$\text{normalized log value}_{\text{drug}} = (\log \text{value}_{\text{drug}} - \log \text{value}_{\text{min}}) / (\log \text{value}_{\text{max}} - \log \text{value}_{\text{min}}) \quad (3.9)$$

**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) <sup>1</sup>
Chlorpromazine HCl	PEG 400/Water (30:70)	2.0
Midazolam	PEG 400/Water (30:70)	3.0
Caffeine	NaCl 0.9% (100)	12.4
Theophylline	DMSO/PEG 400/Water (10:30:60)	27.2
Verapamil HCl	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 PBS (10:90)	5.0

<sup>1</sup> The administered dose was calculated as 20% of the LD<sub>50</sub> injected IV in mice and then adjusted if necessary.

### 3.3.6 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, Framingham, 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 μL/min while the dwell times were set at 70 ms. Chromatography was performed using a YMC-Pack ODS-AQ column (5 μm, 3.0 × 50 mm; YMC America Inc., Allentown, PA, USA). Sample injection volume was 4 μL and the LC flow rate was 0.75 mL·min<sup>-1</sup>. 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 stabilization 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 (v1.6.2; AB Sciex, Concord, ON, Canada).

### 3.3.7 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  $p < 0.0332$ .

## 3.4 Results

### 3.4.1 Endothelial Cells—Basal Characterization

#### 3.4.1.1 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.

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. It was impossible to differentiate cells according to their origin by a simple microscopic observation of their morphology (Fig S3.1).

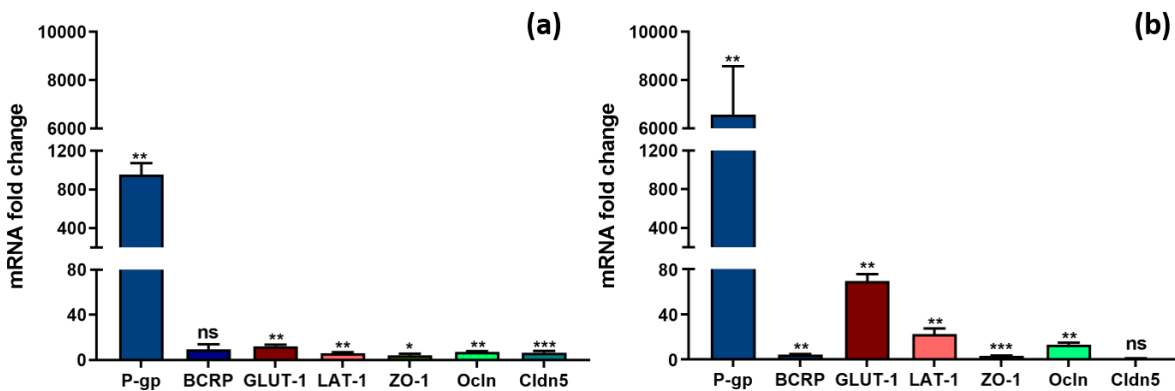
#### 3.4.1.2 Specific mRNA Gene Expression in Brain Mouse Endothelial Cells

Gene expression of main MBRT and TJ proteins was quantified using the qPCR technique (Table 3.3). Thus, the mRNA expression of two efflux transporters (P-gp and BCRP), two nutrient transporters (GLUT-1 and LAT-1) and three TJ proteins (ZO-1, OcIn, Cldn5) was analyzed. Prior to 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 of comparing gene expressions of primary ECs grown in their own specialized culture medium to that of bEnd.3 cells grown in DMEM/10% FBS/1 $\times$ Pen/Strep medium (Fig 3.1-a). In these conditions, and after normalizing results, ECs were found to express significantly higher gene expression levels for most of the tested proteins compared to bEnd.3 cells (955-fold increase for P-gp, 12-fold for



GLUT-1, 6-fold for LAT-1, 4-fold for ZO-1, 7-fold for Ocln, and 6-fold for Cldn5, respectively). No significant difference was noticed for BCRP mRNA coding gene (Fig 3.1-a).



**Figure 3.1 – mRNA expression fold-change between ECs and bEnd.3 cells, the latter used as the calibrator.**

Both cell monolayers were either grown in simple DMEM medium (a) or in specialized ECs medium (b). 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. 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):  $p \geq 0.0332$ , \*  $p < 0.0332$ , \*\*  $p < 0.0021$ , \*\*\*  $p < 0.0002$ ).

Next, to evaluate the influence of the growth medium on the gene expression, the relative mRNA gene expression of ECs was compared to that of bEnd.3 cells, both grown in the specialized ECs culture medium. ECs medium, in addition to basic elements, is composed of bFGF, heparin, hydrocortisone and ITS, all absent of the bEnd.3 medium, and all favoring endothelial cell growth and monolayer tightness. Normalized mRNA gene expression levels were statistically greater in ECs than in bEnd.3 (6576-fold increase for P-gp, 4-fold for BCRP, 69-fold for GLUT-1, 22-fold for LAT-1, 3-fold for ZO-1, and 13-fold increase for Ocln respectively). No significant difference was noticed for Cldn5 (Fig 3.1-b)

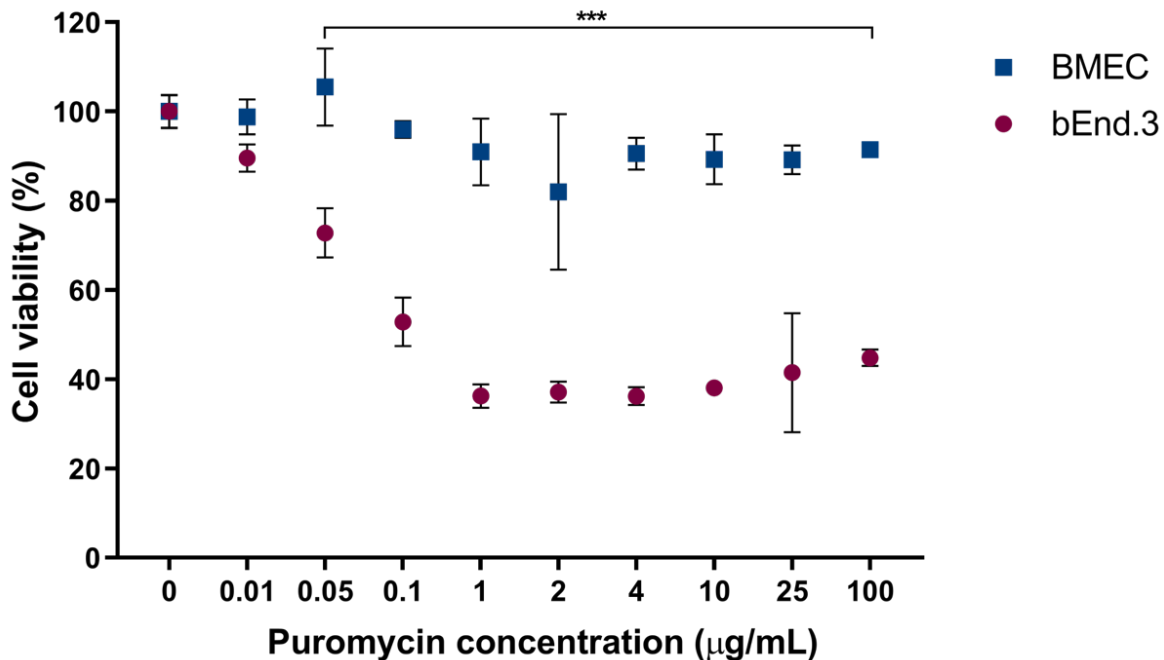
The same tendency, i.e. ECs expressing far more mRNA than b.End3 cells, was observed when the samples were analyzed by ddPCR: (2319-fold for P-gp, 3-fold for BCRP, 11-fold for GLUT-1, 12-fold for LAT-1, 2-fold for ZO-1, and 9-fold for Ocln and 0.3-fold increase for Cldn5), as shown in Fig S3.2.

### 3.4.1.3 Puromycin Viability Assay

Puromycin is a P-gp substrate used for ECs selection from freshly-isolated brain capillaries [27]. Used at 4–10  $\mu\text{g/mL}$ , cell cultures are progressively enriched in ECs, as only these cells display



enough P-gp to protect themselves from puromycin toxicity. In order to assess if the difference in P-gp mRNA expression between the tested cells could be directly interpreted as a lower amount of protein present in the bEnd.3 cell line compared to ECs, a cell viability assay was performed in the presence of increasing puromycin concentrations (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 ECs viability remained between 80–110%, whatever the tested concentration (Fig 3.2).



**Figure 3.2 – Effect of puromycin on ECs and bEnd.3 cell viability.**

Data were analyzed using a 2-way ANOVA test (\*\*\*)  $p < 0.0001$ ). Points represent the average cell viability  $\pm$  SD ( $n = 6$ ).

### 3.4.2 Monolayer Models and Subsequent Characterization

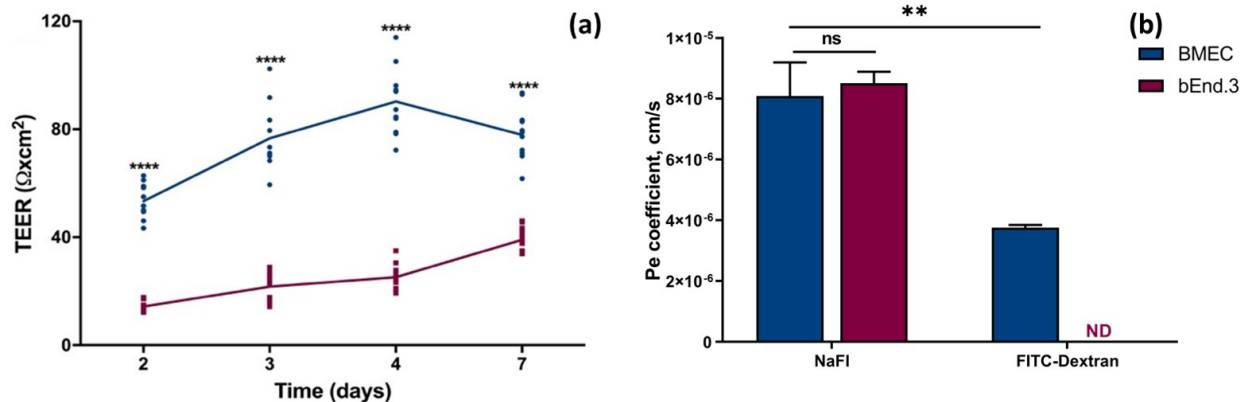
#### 3.4.2.1 TEER and Pe coefficient of Fluorescent Markers

Primary ECs and bEnd.3 cells were turned into *in vitro* models when cultured on porous polymeric membranes separating two compartments (Transwell<sup>®</sup> plates). Cells confluence was observed on day 7. Two techniques were used to compare the effectiveness of the ECs and the bEnd.3 models to form a tight monolayer. First, TEER calculations were performed on days 2, 3, 4. On day 7,

monolayer tightness was evaluated using TEER calculation and, additionally, by measuring the permeability of two fluorescent markers. Both these markers are hydrophilic molecules with different sizes (NaFl: 360 Da, FITC-D: 150 kDa) used to evaluate the paracellular permeability.

TEER for the ECs 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 (Fig 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  $40 \pm 4.5 \Omega \times \text{cm}^2$ . Moreover, a significant increase was observed for the ECs model when comparing the TEER values at days 3, 4 and 7 with the TEER value at day 2.

NaFl permeability assay resulted in a similar Pe for the ECs model ( $8.1 \pm 1.1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) and the bEnd.3 one ( $8.5 \pm 0.4 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) (Fig 3.3-b). FITC-dextran was not detected in the lower compartment of the bEnd.3 monolayer after 75 min, while the ECs model yielded a Pe of  $3.8 \pm 0.1 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ .



**Figure 3.3 – Comparison of TEER and markers permeability between ECs and bEnd.3.**

(a) Transendothelial electrical resistance (TEER, expressed as  $\Omega \times \text{cm}^2$ ) and (b) endothelial Pe for sodium fluorescein (NaFl) and FITC-dextran (Pe, expressed in cm/s) of the blood–brain barrier models built from mouse primary brain endothelial cells (ECs, blue) and from mouse brain endothelial cell line (bEnd.3, red) at day 7. All data are presented as means  $\pm$  SD ( $n = 12$  for TEER,  $n = 4$  for Pe). Statistical analysis: unpaired t test with Welch’s correction (ns:  $p \geq 0.0332$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , ND-not detected).

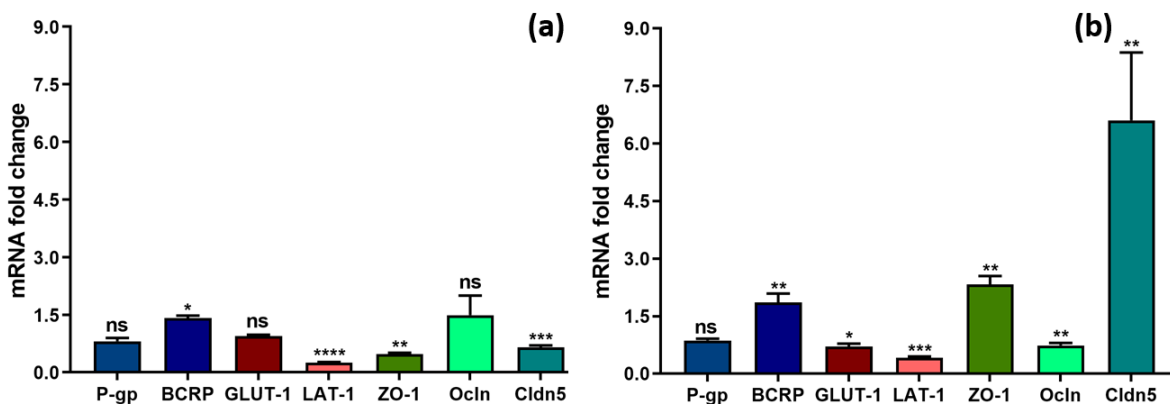
### 3.4.2.2 Influence of the Support Material on the Gene Expression of Brain Endothelial Monolayers

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 the relative mRNA gene expression levels of specific proteins.

First, brain ECs grown in a culture flask were compared to those grown on the permeable

polyester membrane of the Transwell<sup>®</sup> inserts (as used in the BBB model setup).

Primary ECs 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 Cldn5 (4-, 2- and 1.5-fold decreases, respectively) compared to ECs grown in a culture flask. There were no significant differences for P-gp, GLUT-1 and Ocln mRNA expression (Fig 3.4-a). The complementary ddPCR analysis highlighted that mRNA expression for ZO-1 and Cldn5 was decreased by 1.5- and 1.2-fold, respectively, when cells were cultured on the polyester membrane, while no difference was noticed for P-gp, GLUT-1 and Ocln mRNA expression (Fig S3.3-a).



**Figure 3.4 – Differences in the fold-change of gene expression between ECs and bEnd.3 cells grown on a polyester membrane insert filter compared to cells grown on plastic cell culture flask.**

(a) ECs and (b) bEnd.3. 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 ( $n = 3$ ).

For bEnd.3 cells grown on the polyester membrane insert filter, the mRNA fold change expression for BCRP, ZO-1, and Cldn5 showed a 1.8-, 2.3- and 6.6-fold increase, respectively. For GLUT-1, Ocln, 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 P-gp mRNA expression (Fig 3.4-b). The complementary ddPCR analysis highlighted that the mRNA expression of TJ proteins was greater (for ZO-1 and Cldn5 by 1.2-fold, and for Ocln 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 P-gp mRNA expression (Figure S3b).

### 3.4.2.3 Immunostaining of TJ Proteins

A qualitative identification of the TJ proteins Cldn5 and ZO-1 was obtained by immunostaining. ECs monolayer models were stained just after the permeability assay by directly incubating them with anti-Cldn5 and anti-ZO-1 antibodies. Negative controls were used, and no false positive response was observed (data not shown). 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). A semi-quantitative analysis of TJs was also performed by measuring fluorescence intensities and then normalizing them according to the cell number. The results showed a similar tendency as for the q-PCR ones, both Cldn5 and ZO-1 appeared to be more expressed in ECs than in bEnd.3 cell monolayers (Fig S3.5).

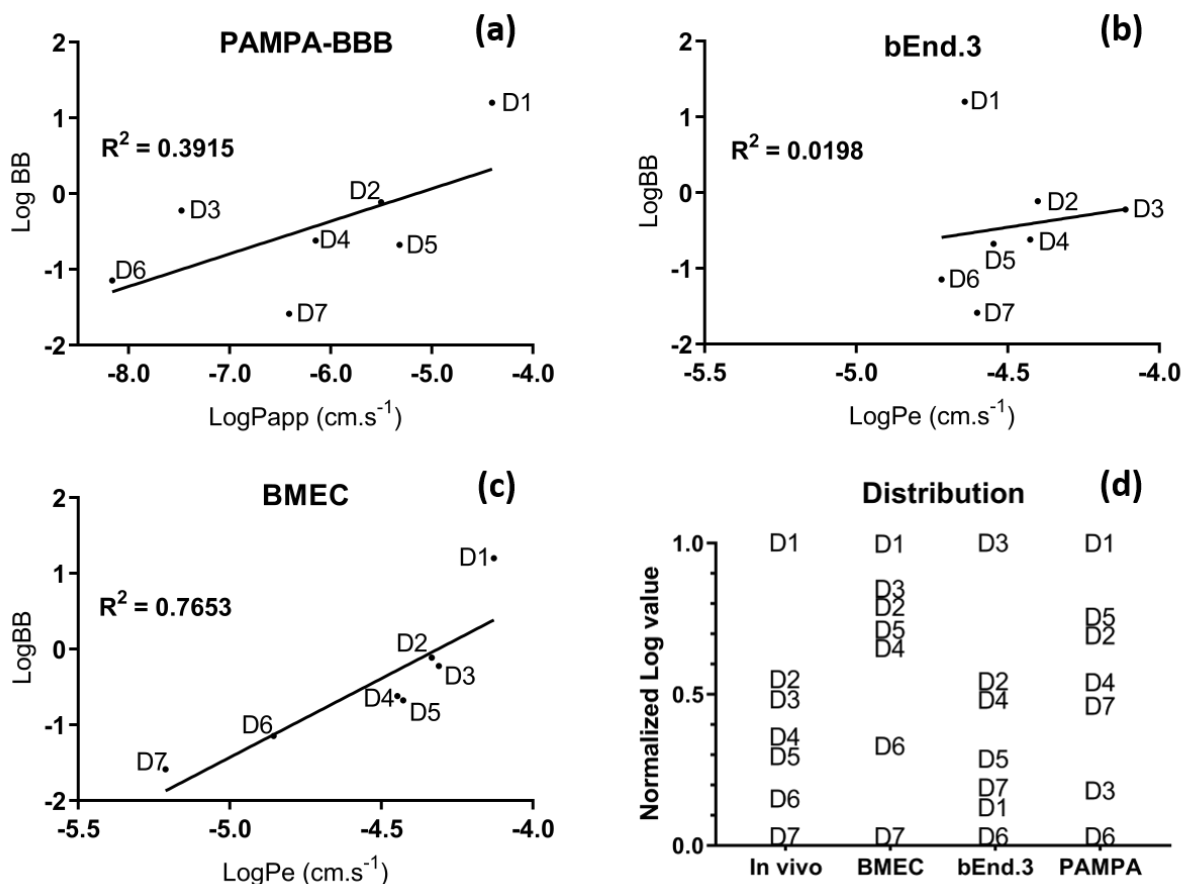
### 3.4.3 *In Vivo/In Vitro* Correlation and Validation

Performance of the *in vitro* established models was compared to a PAMPA-BBB assay which mainly discriminates drug permeabilities according to their partition coefficient and is used as an early screening tool of large libraries of newly-synthesized compounds. To that extent, 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, Papp or Pe 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) (Fig 3.5-a,b,c).

For each model, a determination 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 determination coefficient for the PAMPA-BBB model was found to be  $r^2 = 0.391$  (Fig 3.5-a) whereas for the bEnd.3 model,  $r^2 = 0.019$  (Fig 3.5-b) and for ECs model,  $r^2 = 0.765$  (Fig 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 ECs and PAMPA-BBB models properly classified it as ‘best ability to cross the BBB’. As for the most hydrophilic drug, namely tenoxicam, only the ECs model ranked it correctly as ‘worst ability to cross the BBB’. Globally, of the three *in vitro* models, only the ECs model has ranked the 7 drugs close to that observed *in vivo*. Both the PAMPA-BBB and bEnd.3 models proved their inability to correctly discriminate these seven drugs (Fig 3.5-d).



**Figure 3.5 – Linear regression plots for *in vitro* Pe–*in vivo* log BB correlation (IVIVC) using different models.**

Models are : (a) PAMPA-BBB, (b) bEnd.3 model and (c) ECs. Pe measurements on 7 drugs were realized on day 7. LogBB were quantify 2 h post drugs injection. (d) Distribution of drug ranking according to the selected model. D1: chlorpromazine; D2: midazolam, D3 caffeine, D4: theophylline, D5: verapamil, D6: atenolol, D7: tenoxicam. Each point indicates the average Log BB or Log Pe for a given drug ( $n \geq 4$ ).

## 3.5 Discussion

### 3.5.1 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 [28]. Those contaminated cells may be linked to an increase in experimentation variability. However,

this issue is currently partially addressed since recent cell isolation protocols are easier to perform [29]. Moreover, the use of puromycin leads to an enriched culture in 5–7 days [27], as in the case of the primary ECs we isolated from the adult brains of C57BL/6 mice. The isolation process took six hours to perform on 10 to 30 mice, yielding around two million cells per 10 mice. 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 [30]. Despite their longer time to confluency, these latter cells are currently widely used in pharmaceutical R&D for 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-TKmT retrovirus [31]. The bEnd.3 cell line was proposed as a model for the evaluation of BBB function [28], especially the paracellular barrier [32], and as a BBB model for drug uptake and transport studies [33].

In order to establish the validity of the studied models, we first examined cell features for known EC morphology and characteristics. The microscopic observation showed similar spindle-shape morphology, typical of ECs [34] for both primary and bEnd.3 cells (Figure S1). Cells morphology was important to monitor since ECs could change their shape following modifications of their phenotype due to culture conditions. As the ECs 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 P-gp, BCRP, GLUT-1, LAT-1, ZO-1, Ocln, and Cldn5 was confirmed in ECs and bEnd.3 cells, both grown in their own culture medium. Relative expression of all tested genes, except BCRP, was statistically increased in ECs (Fig 3.1-a). As only the ECs medium contained growth factors and puromycin, substances known to increase the expression of certain proteins [35], we compared the expression of the same genes from ECs and bEnd.3 cells both grown in the richer ECs medium. In that case, P-gp, BCRP, GLUT-1, LAT-1 and Ocln relative expressions became even higher, in favor of the primary cells (Fig 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 [36]. The Western blot analysis of TJ proteins performed by Watanabe *et al.*, showed comparable tendencies, i.e., similar protein expression levels for Ocln, an increased level for ZO-1, and a decrease for Cldn5 when comparing primary mouse ECs with the bEnd.3 cell line [32]. However, primary cells used in their study were isolated from ICR mice, as opposed to C57BL/6 mice used in ours.

P-gp, an efflux protein transporter, is another BBB highly-expressed protein to be found in a valid BBB model. P-gp mRNA gene 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 P-gp substrate. Results showed that, only in ECs, the P-gp transporter was effective enough to maintain a high cell viability, as opposed to bEnd.3 in which only 50% of cells survived after a 24-h exposure (Fig 3.2). Consequently, EC not only expressed more P-gp mRNA, but this mRNA was translated into a higher number of functional, active P-gp proteins present at the cell membrane.

### 3.5.2 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<sup>®</sup> plates). When evaluating a BBB model, two basic characteristics must be retrieved: its electrical resistance, by calculating the TEER, and its Pe for paracellular markers [24]. Both parameters were therefore used to compare the effectiveness of the ECs and the bEnd.3 models to form a tight monolayer.

First of all, TEER values globally reflect the monolayer integrity and the ability of cells to form TJ between them. From our protocol, the primary ECs 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 (Fig 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  $20\text{--}30 \Omega \times \text{cm}^2$  [29, 37] to  $140 \Omega \times \text{cm}^2$  [22], with most common values around  $120\text{--}125 \Omega \times \text{cm}^2$  [38]. 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 ECs model (Fig 3.3-a). Once again, values retrieved from various research articles showed divergences, ranging from  $17 \Omega \times \text{cm}^2$  [8] to  $140 \Omega \times \text{cm}^2$  [39], with most of the reported values in the  $20\text{--}40 \Omega \times \text{cm}^2$  range [22, 34].

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 [24]. Besides, such factors as seeding density [37], time-to-confluency, as well as medium composition [40], insert membrane surface and their commercial source [22] have been reported to impact TEER values. Accordingly, TEER values cannot be used alone as markers for model tightness and must



be backed by permeability studies.

The ECs model showed no statistical difference in  $P_e$  for the paracellular hydrophilic marker NaFl when compared with the bEnd.3 model (Fig 3.3-b), as previously reported [32]. Additionally, the ECs model showed statistically different permeability values when using either 376-Da NaFl or 150-kDa FITC-D, a higher molecular weight marker with lower permeability. On the contrary, no permeability was detected for bEnd.3 model for FITC-Dextran. This result was surprising as all other parameters tended to demonstrate that the ECs model was tighter than the bEnd.3 one. Kutuzov *et al.*, demonstrated that the permeability of hydrophilic molecules depended on their molecular weight [41] and that the endothelium negatively-charged glycocalyx was implicated in the process when the molecular weight of tested molecules was over 600 kDa [42]. The presence of the glycocalyx at the bEnd.3 cell surface [43], but less in ECs [44], 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, however, still unknown. This result shows a possible limitation of the ECs model when used for the screening of large hydrophilic molecules. This point warrants 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 [22]. 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 ECs model, even if the transfer to the polyester membrane showed a statistically significant increase in the mRNA expression of Cldn5 and ZO-1, the biological relevance was disputable (<2-fold increase, Fig 3.4-a). For the bEnd.3 model, the mRNA expressions of Cldn5 and ZO-1 were increased by 6.6 and 2.3-fold (Fig 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 [28]. 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 Cldn5 level is not proportional with TEER values, as cells like Caco-2, VB-Caco-2 and MDCK-MDR1 do not express Cldn5 but show high values of TEER [45]. However, Cldn5 and ZO-1, along with Occludin, are the hallmark of brain ECs, even if their implication in the BBB permeability is not fully understood. Furthermore, Cldn5 and ZO-1 immunostaining (Fig S3.4) 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 Cldn5 for the bEnd.3 model, all other mRNA expression levels were not significantly altered from a biological standpoint ( $0.5 < \text{change factor} < 2$ -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 ECs model was found superior to the bEnd.3 one.

### 3.5.3 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 a 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 logPapp or logPe 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 PAMPA-BBB model was expected to be the worst one to correlate with *in vivo* data as this simple, acellular model can only assess passive diffusion. The best determination coefficient ( $r^2 = 0.765$ , Fig 3.5-c) was achieved by ECs model. However, the second best was the PAMPA-BBB model ( $r^2 = 0.39$ , Fig 3.5-a), known as a suitable acellular model to evaluate the passive permeability of small lipophilic drugs [12]. The least reliable model, in our conditions, was the bEnd.3 model ( $r^2 = 0.019$ , Fig 3.5-b). Due to its nature, the PAMPA-BBB assay results (logPapp) best correlated with drug logP 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 ( $r^2 = 0.9692$ ). Thus, the model seemed to display an overall better prediction for lipophilic drugs. However, logBB did not correlate well with logP ( $r^2 < 0.36$ ), 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 (Fig 3.5-d). The distribution pattern of the drug rankings appeared very comparable between normalized log BB and logPe. Nonetheless, the drug ranking was utterly wrong with the bEnd.3 model, as it was for the PAMPA-BBB model. On the contrary, the ECs model alone was capable to discrim-

inate between high-, moderate- and low-permeability drug groups. Based on the work of Vilar *et al.* [46], drugs can be divided into three distinct groups according to their log BB: CNS<sup>++</sup> or CNS<sup>+</sup> (both displaying CNS activity) when  $\log BB \geq 0.3$  or  $-1 < \log BB < 0.3$ , respectively, and CNS<sup>-</sup> (no known CNS activity) when  $-1 \leq \log BB$ . Thus, D6 and D7 could be qualified as CNS<sup>-</sup>, D2 to D5 as CNS<sup>+</sup> and D1 as CNS<sup>++</sup>. The ECs 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<sup>+</sup> 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  $r^2 = 0.89$  [23]. 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 ( $r^2 = 0.77$ ) [45]. This work correlated their results with the *in vivo* data reported by Nakagawa *et al.* [23].

At this point, a parallel comparison between this primary mouse model with promising models designed with iPCS should be made. Indeed, iPCS theoretically offer limitless cell access, where primary cells, regardless of their origin, should be used within a few passages. Yet, an optimized primary cell isolation yields to an >90% enriched culture in 7 days, compared with iPCS models, which require a few weeks and highly complex media to reach fully differentiated cell types. Nonetheless, the iPCS BBB models display higher TEER values and lower  $P_e$ , when compared to other *in vitro* models. The observed increase of monolayer tightness could be the result of the medium composition, which counts growth factors, drugs, neural inducers used for the reprogramming of cells back to the embryonic pluripotent state and for further differentiation into the target cell type [18]. Unfortunately, as for the characterization other than tightness and protein expression of the iPCS BBB *in vitro* models, no IVIVC was yet established. However, this correlation is needed to assess the ability of the designed models to accurately screen and rank drugs. As iPCS models still need to be studied and optimized, primary ones should be currently preferred for drug screening studies.

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 [47]. A way to eliminate such variability, especially for drugs under development, would be

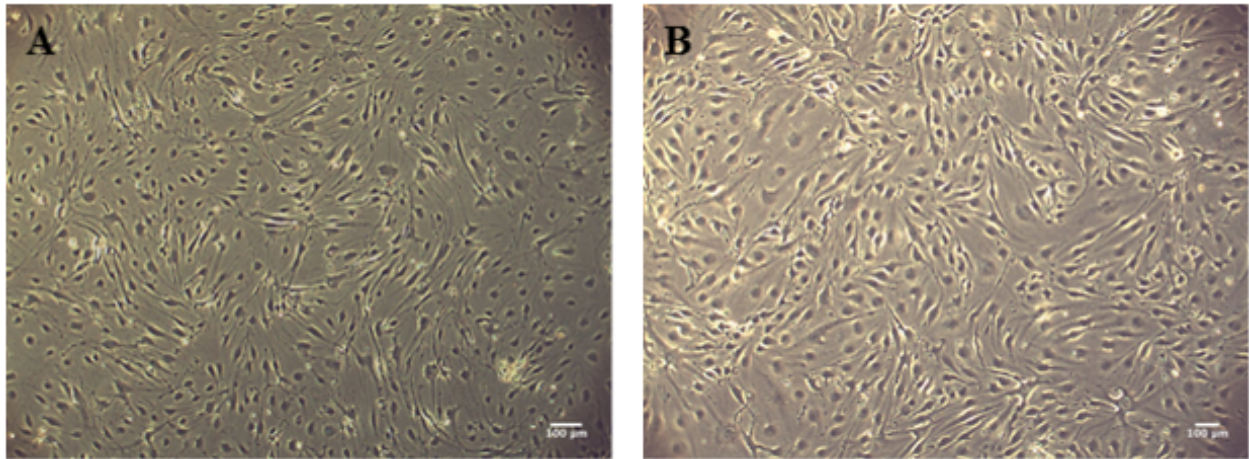
to quantify the brain-blood ratio at 3 different time points, in order to encompass quantification at brain equilibrium half-life [48]. Another limitation to the model presented herein is its simplistic composition of only ECs. Adding astrocytes and pericytes could increase the overall predictability of the model, as both cell types are known to increase the barrier tightness. However, from our point of view, this is detrimental to the model ease of use. This simple ECs model also offers the unique possibility to easily study the underlying mechanisms involved in the passage of drug molecules into the brain compartment. However, data may be tempered as they are produced on a rodent cell-based model and may not be transposable as is to human studies. In addition, whenever in need for a predictive tool for BBB passage of small molecules, the ECs model appears far more effective than the bEnd.3 model and the conventional PAMPA-BBB model.

### 3.6 Conclusions

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 ECs model displayed higher 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 ECs 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.

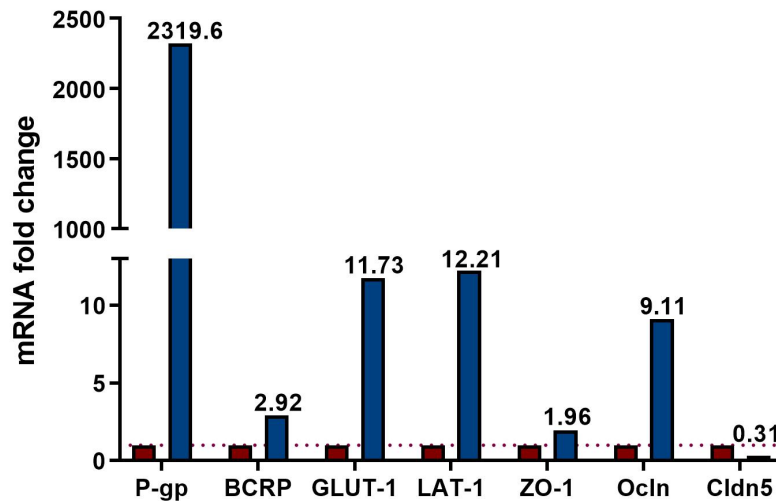
An ideal BBB model intended for drug screening should enable low-cost, rapid, and reproducible assessment of a drug capability to overcome or not the BBB's natural barrier characteristics. Among all proposed static cell models, the mouse ECs model, based on 0.33-cm<sup>2</sup> Transwell<sup>®</sup> inserts, 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 ECs 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.

### 3.7 Supporting information



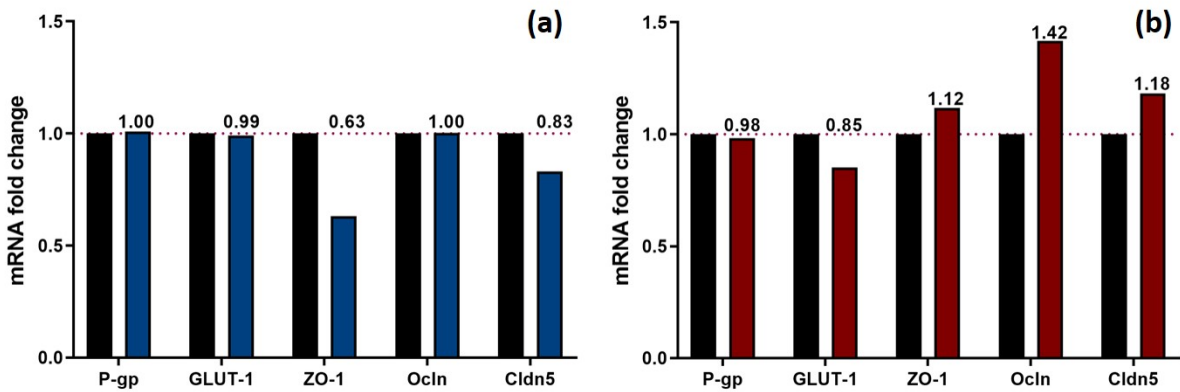
**Figure S3.1 – Bright field imaging of ECs and bEnd.3**

(A) Primary brain endothelial cells (ECs, 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  $\mu\text{m}$ .



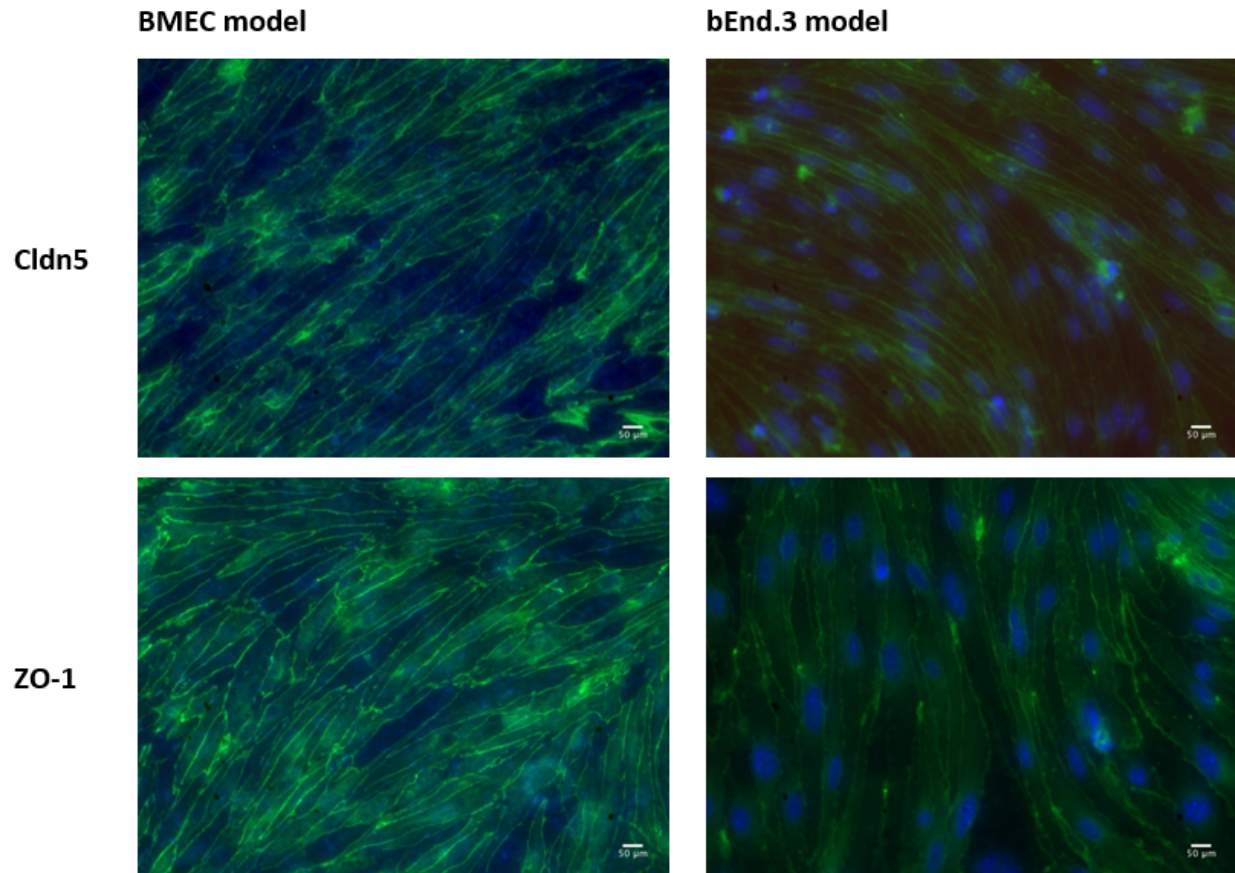
**Figure S3.2 – Differences in mRNA expression fold-change between ECs and bEnd.3 cell line for selected markers.**

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



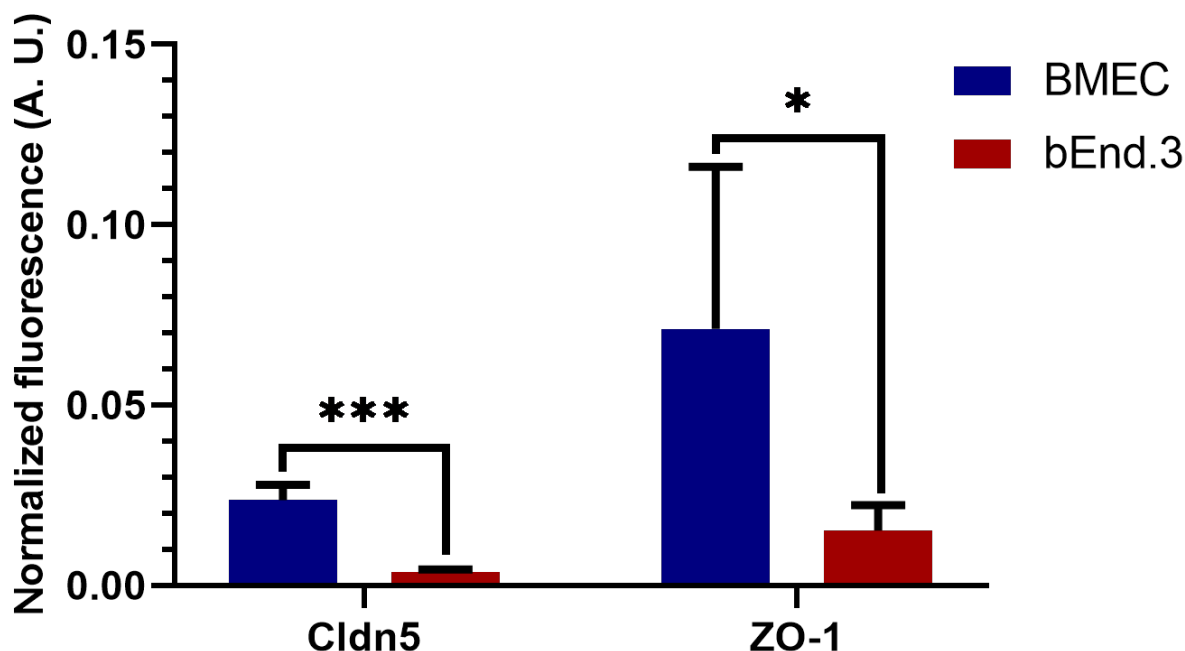
**Figure S3.3 – Differences in gene expression fold-change between ECs and bEnd.3 using various growth conditions.**

Differences in gene expression fold-change between (A) ECs and (B) bEnd.3 cells grown on a polyester membrane insert filter pre-coated with collagen type IV (black) compared to cells grown on plastic cell culture flask pre-coated with collagen type IV (blue-ECs/red-b.End3). 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 ( $n = 3$ ).



**Figure S3.4 – Immunocytochemistry of tight junctions on ECs and bEnd.3.**

Immunocytochemistry of tight junctions (TJs) on ECs and bEnd.3 *in vitro* cell monolayer models. The 7day old cell monolayers were directly fixed on the insert membrane and then incubated with Alexa 488-labelled (green) anti-ZO-1 and anti-Cldn5 antibodies. DAPI staining (blue) was used to show nuclei. Magnification in all images:  $\times 20$ . Scale bar 50  $\mu\text{m}$ . Representative data of  $n=4$ .



**Figure S3.5 – Relative quantification of the tight junction in ECs and bEnd.3.**

Relative quantification of the tight junction proteins (TJs), claudin-5 (Cldn5) and zonula occludens 1 (ZO-1) from immunocytochemistry on *in vitro* ECs and bEnd.3 cell monolayer models. The 7-day old cell monolayers were directly fixed on the insert membranes and then incubated with Alexa 488-labelled (green) anti-ZO-1 and anti-Cldn5 antibodies. Fluorescence intensities were normalized according to cell numbers. n = 4. T-test, \* : p value < 0.05, \*\*\* : p value < 0.001.

## 3.8 References

- [1] M. S. Alavijeh, M. Chishty, M. Z. Qaiser, *et al.* Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx*, 2005:554–571. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.4.554>.
- [2] N. J. Abbott. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for cns drug delivery. *J. Inherit. Metab. Dis*, 36:437–449, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0>.
- [3] W. M. Pardridge. Blood-brain barrier delivery. *Drug Discov. Today*, 12:54–61, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2006.10.013>.



- [4] J. M. Scherrmann. Drug delivery to brain via the blood-brain barrier. *Vasc. Pharmacol*, 38:349–354, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(02\)00202-1](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(02)00202-1) .
- [5] K. H. Wong, M. K. Riaz, Y. Xie, *et al.* Review of current strategies for delivering alzheimer’s disease drugs across the blood-brain barrier. *Int. J. Mol. Sci*, 20, 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20020381> .
- [6] D. B. Stanimirovic, M. Bani-Yaghoub, M. Perkins, *et al.* *in vitro* to *in vivo* translation in preclinical development of cns-targeting biotherapeutics. *Expert Opin. Drug Discov*, 10:141–155, 2015. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.974545> .
- [7] Z. C. d. d. Rankovic. Balancing physicochemical properties for optimal brain exposure. *J. Med. Chem*, 58:2584–2608, 2015. <https://doi.org/10.1021/jm501535r> .
- [8] A. Wolff, M. Antfolk, B. Brodin, *et al.* *In vitro* blood-brain barrier models-an overview of established models and new microfluidic approaches. *J. Pharm. Pharm. Sci*, 104:2727–2746, 2015. <https://doi.org/10.1002/jps.24329> .
- [9] C. A. Palmiotti, S. Prasad, P. Naik, *et al.* *in vitro* cerebrovascular modeling in the 21st century: Current and prospective technologies. *Pharm Res-Dordr*, 31:3229–3250, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1464-6> .
- [10] C. F. Cho, J. M. Wolfe, C. M. Fadzen, *et al.* Blood-brain-barrier spheroids as an *in vitro* screening platform for brain-penetrating agents. *Nat. Commun*, 8, 2017. <https://doi.org/10.1038/ncomms15623> .
- [11] J.-Y. Goh, R. J. Weaver, L. Dixon, *et al.* Development and use of *in vitro* alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980–2013. *Toxicol. Res*, 4:1297–1307, 2015. <https://doi.org/10.1039/C5TX00123D> .
- [12] J. Bicker, G. Alves, A. Fortuna, *et al.* new pampa model using an in-house brain lipid extract for screening the blood-brain barrier permeability of drug candidates. *Int. J. Pharm*, 501:102–111, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.01.074> .
- [13] H. C. Helms. *in vitro* models of the blood–brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 36, 2016. <https://doi.org/10.1177/0271678X16630991> .
- [14] A. Mahringer and G. A. Fricker. transporters at the blood–brain barrier. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol*, 12:499–508, 2016. <https://doi.org/10.1517/17425255.2016.1168804> .



- [15] D. A. Volpe. Drug-permeability and transporter assays in caco-2 and mdck cell lines. *Future Med. Chem.*, 3:2063–2077, 2011. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.149> .
- [16] M. De Bock, V. Van Haver, R. E. Vandenbroucke, *et al.* Into rather unexplored terrain-transcellular transport across the blood-brain barrier. *Glia*, 64:1097–1123, 2016. <https://doi.org/10.1002/glia.22960> .
- [17] N. A. Rahman, A. Rasil, U. Meyding-Lamade, *et al.* Immortalized endothelial cell lines for *in vitro* blood-brain barrier models: A systematic review. *Brain Res*, 1642:532–545, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.024> .
- [18] E. K. Hollmann, A. K. Bailey, A. V. Potharazu, *et al.* Accelerated differentiation of human induced pluripotent stem cells to blood-brain barrier endothelial cells. *Fluids Barriers CNS*, 14, 2017. <https://doi.org/10.1186/s12987-017-0059-0> .
- [19] S. R. Yusof, A. Avdeef, and N. J. Abbott. *in vitro* porcine blood-brain barrier model for permeability studies: pcel-x software pka(flux) method for aqueous boundary layer correction and detailed data analysis. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*, 65:98–111, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2014.09.009> .
- [20] P. Krajcsi, M. Jani, B. Toth, *et al.* Efflux transporters in the blood–brain interfaces – *in vitro* and *in vivo* methods and correlations. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 8:419–431, 2012. <https://doi.org/10.1517/17425255.2012.668184> .
- [21] M. A. Lecuyer, O. Saint-Laurent, L. Bourbonniere, *et al.* Dual role of alcam in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 114:E524–E533, 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614336114> .
- [22] D. M. Wuest, A. M. Wing, and K. H. Lee. Membrane configuration optimization for a murine *in vitro* blood-brain barrier model. *J. Neurosci. Methods*, 212:211–221, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.10.016> .
- [23] S. Nakagawa, M. A. Deli, H. Kawaguchi, *et al.* new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem. Int.*, 54:253–263, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.002> .
- [24] C. S. K. Y. N. M. Deli, M. A.Ábrahám. Permeability studies on *in vitro* blood–brain barrier models: Physiology, pathology, and pharmacology. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 25:59–127, 2005. <https://doi.org/10.1007/s10571-004-1377-8> .

- [25] P. V. Balimane, E. Pace, S. Chong, *et al.* A novel high-throughput automated chip-based nanoelectrospray tandem mass spectrometric method for pampa sample analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39:8–16, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.03.043> .
- [26] U. Bickel. How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *NeuroRx*, 2:15–26, 2005. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.15> .
- [27] N. Perriere, P. Demeuse, E. Garcia, *et al.* Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J. Neurochem.*, 93:279–289, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.03020.x> .
- [28] R. C. Brown, A. P. Morris, and R. G. O’Neil. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res*, 1130:17–30, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.10.083> .
- [29] T. Ruck, S. Bittner, L. Epping, *et al.* Isolation of primary murine brain microvascular endothelial cells. *JOVE-J Vis Exp*, e52204, 2014. <https://doi.org/10.3791/52204> .
- [30] S. Lundquist, M. Renftel, J. Brillault, *et al.* Prediction of drug transport through the blood-brain barrier *in vivo*: A comparison between two *in vitro* cell models. *Pharm. Res.*, 19:976–981, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1016462205267> .
- [31] R. Montesano, M. S. Pepper, U. Mohle-Steinlein, *et al.* Increased proteolytic activity is responsible for the aberrant morphogenetic behavior of endothelial cells expressing the middle t oncogene. *Cell*, 62:435–445, 1990. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90009-4) .
- [32] T. Watanabe, S. Dohgu, F. Takata, *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.*, 36:492–495, 2013. <https://doi.org/10.1248/bpb.b12-00915> .
- [33] S. F. Tehrani, F. Bernard-Patrzynski, I. Puscas, *et al.* Length of surface peg modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells. *Nanomedicine*, 16:185–194, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.11.016> .
- [34] Y. Omid, L. Campbell, J. Barar, *et al.* Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, as an *in vitro* blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res.*, 990:95–112, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(03\)03443-7](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(03)03443-7) .
- [35] P. Demeuse, P. Fragner, C. Leroy-Noury, *et al.* Puromycin selectively increases mdr1a expression in immortalized rat brain endothelial cell lines. *J. Neurochem*, 88:23–31, 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02071.x> .

- [36] L. Hamadneh, M. Al-Majawleh, Y. Jarrar, *et al.* Culturing conditions highly affect dna methylation and gene expression levels in mcf7 breast cancer cell line. *Vitr. Cell. Dev. Biol.-Anim*, 54:331–334, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11626-018-0245-7> .
- [37] D. M. Wuest and K. H. Lee. Optimization of endothelial cell growth in a murine *in vitro* blood-brain barrier model. *Biotechnol. J*, 7:409–417, 2012. <https://doi.org/10.1002/biot.201100189> .
- [38] M. S. Thomsen, S. Birkelund, A. Burkhart, *et al.* Synthesis and and deposition of basement membrane proteins by primary brain capillary endothelial cells in a murine model of the blood-brain barrier. *J. Neurochem*, 140:741–754, 2017. <https://doi.org/10.1111/jnc.13747> .
- [39] X. Tian, O. Brookes, and G. Battaglia. Pericytes from mesenchymal stem cells as a model for the blood-brain barrier. *Sci. Rep*, 7(39676), 2017. <https://doi.org/10.1038/srep39676> .
- [40] C. Weidenfeller, S. Schrot, A. Zozulya, *et al.* Murine brain capillary endothelial cells exhibit improved barrier properties under the influence of hydrocortisone. *Brain Res*, 1053:162–174, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.06.049> .
- [41] N. Kutuzov, H. Flyvbjerg, and M. Lauritzen. Contributions of the glycocalyx endothelium, and extravascular compartment to the blood-brain barrier. *2018*, 115:E9429–E9438, Proc. Natl. Acad. Sci. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802155115> .
- [42] G. Sahagun, S. A. Moore, and M. N. Hart. Permeability of neutral vs. anionic dextrans in cultured brain microvascular endothelium. *Am. J. Physiol*, 259:H162–H166, 1990. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.259.1.H162> .
- [43] W. Yuan, G. Li, E. S. Gil, *et al.* Effect of surface charge of immortalized mouse cerebral endothelial cell monolayer on transport of charged solutes. *Ann. Biomed. Eng*, 38:1463–1472, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10439-010-9920-x> .
- [44] J. Aman, E. M. Weijers, van Nieuw Amerongen, *et al.* Using cultured endothelial cells to study endothelial barrier dysfunction: Challenges and opportunities. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol*, 311:L453–L466, 2016. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00393.2015> .
- [45] E. Hellinger, S. Veszelka, A. E. Toth, *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*, 82:340–351, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.07.020> .

- [46] S. Vilar, M. Chakrabarti, and S. Costanzi. Prediction of passive blood-brain partitioning: Straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *J. Mol. Graph. Model*, 28:899–903, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jmglm.2010.03.010> .
- [47] A. S. Hanak, L. Chevillard, E. Balkhi, *et al.* Study of blood and brain lithium pharmacokinetics in the rat according to three different modalities of poisoning. *Toxicol. Sci*, 143:185–195, 2015. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu224> .
- [48] A. D. Kulkarni, H. M. Patel, S. J. Surana, *et al.* Brain-blood ratio implications in brain drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv*, 13:85–92, 2016. <https://doi.org/10.1517/17425247.2016.1092519> .
- [49] M. S. Alavijeh, M. Chishty, M. Z. Qaiser, *et al.* Drug metabolism and pharmacokinetics, the blood-brain barrier, and central nervous system drug discovery. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(4):554–571, 2005. ISSN 1545-5343 1545-5351. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.4.554> .

## 3.9 Résultats supplémentaires

### 3.9.1 Les éléments suivants ont été modifiés par rapport à l'article publié :

- Dans la section matériels et méthodes, le titre de la méthode portant sur le PAMPA (3.3.4) a été modifié.
- Le terme *correlation coefficient* a été remplacé par le bon terme *determination coefficient*.

### 3.9.2 Choix du délai de 2h post-iv

Pour mesurer le log BB des molécules testées, les concentrations doivent être mesurées à l'état d'équilibre. Idéalement, il aurait fallu déterminer *in vivo* l'état d'équilibre pour chaque molécule. En l'absence de données sur l'état d'équilibre dans la littérature, nous avons décidé d'utiliser le temps de demi-vie comme paramètre [49]. Cette information étant disponible pour toutes les molécules testées, nous avons ensuite fait un compromis quant à la durée post-iv choisie. Par exemple, le midazolam a un temps de demi-vie de 2 h alors que le tenoxicam a un temps de demi-vie de 72 h. En prenant en compte la contrainte temps et de ressources pour la réalisation du test *in vivo*, nous avons déterminé que 2 h serait le temps optimal. En dessous de 2 h, les molécules avec une faible perméabilité risquent de ne pas être détectables dans le cerveau. Au-delà de 2 h,

les molécules très perméables risquent également de ne plus être détectables car majoritairement éliminées.

### 3.9.3 Coefficient de corrélation (r) et coefficient de détermination ( $r^2$ )

Le Coefficient de corrélation (coc) est une valeur comprise entre -1 et 1. Le coefficient de détermination (cod) est quant à lui le carré du coc. Les valeurs sont donc comprises entre 0 et 1. Le coc permet d'apprécier la relation linéaire entre deux variables(x et y). Dans notre cas cela serait, LogPapp ou LogPe pour x et LogBB pour y. Si le coc tend vers 1 alors lorsque x augmente, y augmente. Si le coc tend vers -1 alors lorsque x augmente, y diminue. Les changements observés seront alors proportionnels. Si le coc tend vers 0 alors x et y n'ont pas de relation linéaire. Le cod représente le pourcentage de variation de y expliqué par x. Plus le coefficient est élevé mieux c'est. Dans cette étude nous ne cherchons pas à savoir si les modèles *in vitro* corrélerent avec le modèle *in vivo* mais plutôt si les modèles *in vitro* peuvent expliquer/prédire les observations faites avec le modèle *in vivo*.

### 3.9.4 Comment la membrane PAMPA se compare-t-elle au modèle avec les bEnd3?

Dans notre étude, le PAMPA-BBB est plus performant pour prédire la perméabilité *in vivo* des 7 molécules testées que le modèle cellulaire bEnd.3. Le modèle composé de bEnd.3 présentant moins de jonctions, de transporteurs et sans doute plus de glycocalix que le modèle composé d'ECs, il s'éloigne de la représentation des cellules endothéliales de la BHE *in vivo*. Le modèle bEnd.3 induirait donc des variations dans les mesures de perméabilité qui, au final, expliqueraient moins bien les observations *in vivo*. Le PAMPA-BBB quant à lui est un modèle basé uniquement sur la perméabilité passive. Cette simple membrane est plus pertinente pour prédire la perméabilité *in vivo* des 7 molécules que le modèle bEnd.3.



## Chapitre 4

### ***Article 3 - Acute inflammation of the blood-brain barrier has an unexpected impact on the permeability of small drugs in a validated in vitro model.***

Florian Bernard-Patrzynski<sup>1</sup>, Marc-André Lécuyer<sup>2,3</sup>, Charles Ramassamy<sup>4</sup>, Alexandre Prat<sup>2</sup>, Grégoire Leclair<sup>1</sup> and V Gaëlle Roullin<sup>2</sup>

1. Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada.
2. Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Québec, Canada.
3. Institute for Multiple Sclerosis Research and Neuroimmunology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany
4. Institut national de la recherche scientifique - Armand-Frappier Institute, Laval, Québec, Canada.

Prepared for submission in [International Journal of Pharmaceutical](#)

## 4.1 Abstract

The inflammatory component part of various medical conditions affects the blood-brain barrier (BBB) in many ways. Systemic inflammation can elicit changes in transporters and receptors expression, affect vesicular activities, trigger the downregulation of tight junction and adherens junction proteins, etc. Although inflammation leads to BBB dysfunction, it does not always correlate with an increase in drug permeability. In order to study this phenomenon, we used cultures of primary BBB-endothelial cells as a model to assess the permeability of central nervous system blood vessels to small drugs in the context of acute inflammation. Inflammation was triggered using interleukin- $1\beta$ , tumour necrosis factor- $\alpha$  and lipopolysaccharide. Results show that only drugs with a low permeability coefficient under homeostatic conditions presented a significantly increased permeability under acute inflammatory conditions. This effect may be explained by a diminished expression of zonula occludens and specific transporters, such as organic anion transporter 1A (Oatp1). These results highlight the heterogeneity of small drug permeability across the BBB and emphasize the necessity to assess each pharmacological molecule under conditions mimicking their prescribed use.

## 4.2 Introduction

Endothelial cells (ECs) forming small capillaries in the central nervous system (CNS) are a key component of the blood-brain barrier (BBB). Highly organized tight junction and adherens junction proteins found in the intercellular space link ECs together. This allow them to form a tight monolayer capable of virtually preventing all paracellular diffusion of hydrophilic molecules [1]. In addition, BBB-ECs actively control exchanges between the CNS and the periphery. They express a wide variety of receptors and transporters, polarized toward either the apical or the basolateral membranes, which maintains the right balance of nutrients, hormones and other blood solutes, as well as remove metabolic waste from the CNS [2].

Of particular interest for drug development, the transferrin receptor (TfR), the insulin receptor (IR), the low-density lipoprotein receptor (LDL-R) and the  $\alpha$ -(2,3)-sialoglycoprotein, responsible for receptor-mediated transcytosis, have been successfully commandeered to deliver pharmacological compounds across the BBB [3]. On the hand, transporters of the ATP-binding cassette (ABC) and solute carrier (SLC) superfamilies have been shown to extrude a broad variety of xenobiotics [4, 5]. For this reason, the Food and Drug Administration (FDA), as well as the European Medicines Agency (EMA), recommend to study the effects of the following list of human transporters during the preclinical stages of drug development: P-GP (ABCB1), OATP1B1 (SLCO1B1), OATP1B3 (SLCO1B3), OCT2 (SLC22A2), OAT1 (SLC22A6), OAT3 (SLC22A8)



and BCRP (ABCG2) [6, 7].

The activation state of the BBB is another important factor which can influence the distribution of drugs throughout the CNS. Since most neuronal pathologies are associated with inflammation, it is essential to study its impact on the BBB. Previous studies have shown that the expression of junctional molecules is significantly diminished, and proteins are disorganized when the ECs are exposed to inflammatory stimuli (IL1- $\beta$ , [8], TNF- $\alpha$  [9], LPS [10], etc.) [11]. In addition, changes in the expression of receptors and transporters have been characterized on the surface of inflamed ECs [12]. While the preminent dogma stipulates that inflammation is associated with an increased BBB permeability, this does not always translate into an enhanced drug diffusion into the CNS. Further exploratory studies are therefore warranted to unravel drug permeability mechanisms in the context of inflammation.

Using a validated *in vitro* BBB model [13], we generated a platform to study the permeability of an inflamed BBB and assess potential mechanisms of drug permeability. The pro-inflammatory cytokines IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$ , along with LPS as a control, were used to induce an acute inflammatory state in the model. The permeability of 6 drugs, which are known substrates of EC transporters, was investigated. In parallel, the expression of major junctions and transporters was quantified by RNA sequencing, and the expression of claudin-5, occludin and zonula occludens 1 was assessed by immunofluorescence microscopy.

## 4.3 Materials and methods

In the interest of conciseness, all reagents, consumables, and equipment used in this study are listed in tables [S4.1](#), [S4.2](#) and [S4.3](#), respectively.

### 4.3.1 Animals

All animals (C57BL/6 mice) were obtained from Charles River (Senneville, QC., Canada) and thereafter bred at the Marcelle-Coutu animal facility, Université de Montréal. All animal experiments were conducted in accordance with the institutional requirements set out by the local animal care committee (CDEA, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada, protocol # 16-083) and followed the guidelines of the Canadian Council on Animal Care. The animal protocols further complied with the health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978).

### 4.3.2 Endothelial Cell Cultures

Primary brain mouse endothelial cells (ECs) were isolated from 6-to 11-week old C57BL/6 mice, according to our previously published protocol [14]. Briefly, 20 mouse brains were cut in three parts each, rolled on P8 grade filter paper, minced using surgical blades and then forced through a series of sterile 18G, 20G and 22G needles. The homogenate was digested in type II collagenase and type I DNase for 75 min. Then, the myelin was removed by centrifuging the homogenate in DMEM containing 20 % BSA. The pellet was digested in collagenase/dispase and type I DNase for 60 min and then, overlaid on top of a 33 % continuous isotonic Percoll gradient. Following centrifugation, the microvessel layer was collected and seeded at 10 brains per T75 flask (pre-coated with collagen IV at  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). The microvessels were initially cultured with  $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  of puromycin in the medium. The culture medium was replaced every other day using fresh EC culture medium containing only  $4 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  puromycin. Once the cells reached 90–95 % confluence, the cultures were passaged using 0.25 % Trypsin/EDTA.

### 4.3.3 Blood-Brain Barrier Model

Endothelial cells were seeded inside the inserts of Transwell<sup>®</sup> 24-well plates using an established method [15]. Briefly, the polyester membranes were coated with type IV collagen solution ( $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). After 4h, the excess collagen was removed, and cells were seeded on the membranes at  $4 \times 10^5 \text{ cells}/\text{cm}^2$ . The medium was changed every two days. Under these conditions, the *in vitro* BBB model was ready within 7 days.

### 4.3.4 Acute Inflammation Blood-Brain Barrier Model

The ECs were activated 24h prior to the permeability assays with  $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  of lipopolysaccharide (LPS),  $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$  of interleukin-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ) or  $3 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$  of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in EC medium. Permeability assays were performed after removing the media containing inflammatory molecules.

### 4.3.5 Cell Viability Assay

The ability of ECs to proliferate in presence of increasing IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and LPS concentrations was investigated using the MTS assay. Briefly, each well of a 96-well plate was coated with  $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  of collagen type IV for at least 4h. Then,  $5 \times 10^3$  cells per well were seeded in a final volume of 200  $\mu\text{L}$ . The cells were allowed to adhere for 24h, then the culture media were replaced with 100  $\mu\text{L}$  of media containing either LPS ( $0.5$  to  $1000 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ), IL1- $\beta$  ( $0.4$  to  $500 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ) or TNF- $\alpha$  ( $0.4$  to  $100 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ). Cells were incubated at  $37^\circ\text{C}$  in a humidified 5%

CO<sub>2</sub> incubator for 24h. Thereafter, 11  $\mu\text{L}$  of the MTS reagent were added in each well and left to incubate for 3h at 37°C in standard culture conditions. The reduction of the MTS tetrazolium compound by viable cells generated a colored formazan product, soluble in the cell culture medium, which was quantified by measuring the absorbance at 490 nm. Untreated cells were used as negative controls, whereas cells treated with 0.1% of Triton 100 1h before adding MTS were used as positive controls. Cell viability was calculated as follows (Equation 4.1):

$$\% \text{ viable cells} = (\text{OD}_{\text{assay}} - \text{OD}_{\text{medium}}) / (\text{OD}_{\text{untreated cells}} - \text{OD}_{\text{medium}}) \times 100 \quad (4.1)$$

where OD<sub>assay</sub>: absorbance in sample well; OD<sub>medium</sub>: absorbance of medium alone; OD<sub>untreated cells</sub>: absorbance of untreated cells.

### 4.3.6 Model Characterization

#### 4.3.6.1 Trans Endothelial Electrical Resistance (TEER) Measurements

TEER measurements were used as a non-invasive and quantitative technique to evaluate the permeability of EC monolayers grown on Transwell<sup>®</sup> inserts. Before the measurements, Transwell<sup>®</sup> plates were equilibrated for 15 min at room temperature. Then, the inserts were transferred to the Endohm-6 cup and the ohmic resistance was measured using the Millicell<sup>®</sup> ERS voltmeter. The resistance of the BBB model was measured in the respective growing media. TEER<sub>total</sub> values were calculated by multiplying the obtained resistances (ohm) by the insert area (S, cm<sup>2</sup>), as in Equation 4.2. To calculate the TEER of the monolayers, the mean TEER values of cell-free inserts were subtracted to the TEER<sub>total</sub>, as in Equation 4.3:

$$\text{TEER}_{\text{total}} = \text{Resistance } (\Omega) \times S_{\text{insert}} \text{ (cm}^2\text{)} \quad (4.2)$$

$$\text{TEER}_{\text{monolayer}} (\Omega \times \text{cm}^2) = \text{TEER}_{\text{total}} - \text{TEER}_{\text{cell-free insert}} \quad (4.3)$$

#### 4.3.6.2 Fluorescent Marker Permeability Assay

Fluorescein isothiocyanate dextran (FITC-Dextran, MW = 4 kDa) was used to evaluate the passive permeability of the BBB model. The same inserts used for TEER measurements were transferred to a 24-well plate containing 600  $\mu\text{L}$  of EC medium in the lower compartment. Media from the upper compartments were replaced by 100  $\mu\text{L}$  of EC medium containing 1 mg  $\times$  mL<sup>-1</sup> of FITC-Dextran. Samples were taken at 15, 30, 45 and 60 min. 10 and 100  $\mu\text{L}$  were collected from upper and lower compartments, respectively. Following each sampling, the inserts were transferred to a new 24-well plate containing fresh EC medium (600  $\mu\text{L}$ /well). The sample concentrations were

determined by fluorescence spectroscopy. Excitation/emission wavelengths were 492/518 nm. The permeability coefficient (Pe) of the fluorescent marker was calculated as fully detailed in Section 4.3.6.4.

#### 4.3.6.3 *In vitro* Drug Permeability Assay

In order to evaluate the impact of inflamed primary ECs on the permeability of small drugs, six molecules covering a large range of physicochemical and pharmacokinetics properties (Mw from 180 to 491 g × mol<sup>-1</sup>; logP from -0.07 to + 4.33; logBB from -1.58 to -0.113 [15]) were chosen. As a reminder, logP is the partition coefficient determined by the ratio of drug concentrations between octanol and water at equilibrium; logBB is the ratio of drug concentrations between brain and blood close to the steady state, as calculated *in vivo* [15].

Inserts containing a monolayer of ECs were transferred to a 24-well plate containing 600 μL of EC medium in the lower compartments. Medium from the upper compartments was replaced by 100 μL of the tested drug solubilized in EC medium (10 μM, n ≥ 4 per drug). Samples were collected at 15, 30, 45 and 60 min, and analyzed by liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS/MS), with metoclopramide hydrochloride as the internal standard. Details of the LC-MS/MS analysis are summarized in Table 3.2 and are based on our previously published protocol [15]. Permeability coefficients were calculated as indicated in Section 4.3.6.4.

#### 4.3.6.4 Permeability Coefficient (Pe) Calculation

Pe was calculated as previously presented in the work of Deliet *al.* (2005) [16] and Nakagawa *et al.* (2009) [17]. First the cleared volume (μL), corresponding to the lower volume used to transport the tested molecule from the upper compartment to the lower compartment, was calculated from Equation (4.4):

$$\text{Cleared volume (mL)} = (C_{\text{lower compart.}} \times V_{\text{lower compart.}}) / C_{\text{upper compart.}} \quad (4.4)$$

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

Then, the cumulative cleared volume at each time point (15, 30, 45 and 60 min) was calculated. The product (PS) of the drug permeability by the insert area (0.33 cm<sup>2</sup>) was calculated as the slope of the plotting of cumulative volumes against time. The PS of the ECs monolayer were calculated using Equation (4.5).

$$1/PS_{\text{endo}} = 1/PS_{\text{total}} - 1/PS_{\text{insert}} \quad (4.5)$$

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

Finally, the  $Pe$  of the ECs monolayer was calculated as shown in Equation (4.6):

$$Pe \text{ (cm}^2/\text{s)} = PS_{\text{endo}}/S_{\text{insert}} \quad (4.6)$$

#### 4.3.6.5 Ribonucleic Acid Sequencing

Three pools of 20 mice were used to isolate brain capillaries following the method described in section 4.3.2. After 7 days, cells were seeded at  $1.32 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$  in T25 flasks previously coated with  $5 \mu\text{g/cm}^2$  collagen type IV. When reaching confluence, cells were treated 24 h with either  $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$  of LPS or  $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$  of IL1- $\beta$ . Three T25 flasks were kept untreated as control. Cells were then trypsinized and centrifuged at 1,000 g for 10 min. The supernatant was discarded and 1 mL of Trisol was added to the cell pellet. Total RNA was isolated from 2 million endothelial cells (P1) using RNeasy mini kit according to the manufacturer's instructions. Total RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer and the RNA quality was assessed with a 2100 Bioanalyzer. Transcriptome libraries were generated using the Kapa RNA HyperPrep, using a poly-A selection. Sequencing was performed on the Illumina NextSeq500, obtaining around 20M single-end reads per sample. Sequences were trimmed for sequencing adapters and low quality 3' bases using Trimmomatic [18]. Then they were aligned with the reference mouse genome [19] (gene annotation from Gencode [20], based on Ensembl) [21]. RNA abundances were derived directly from STAR as raw read [22] was then used to normalize gene read counts and to compute differential expression between the various experimental conditions. Sample clustering based on normalized log read counts produced a hierarchy of samples. A principal component analysis was also used to validate that samples correlated as expected.

#### 4.3.6.6 Tight Junction Quantification

Claudin-5, occludin and zonula occludens 1 were directly immunolabeled on ECs seeded on Transwell<sup>®</sup> inserts. First, the medium was removed, and cells were washed 3 times with PBS. They were then fixed and permeabilized by adding  $50 \mu\text{L}$  of cold methanol ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) and by placing plates at  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  for 10 min. After fixation, the cells were washed and blocked with 3 % BSA in PBS for 1 h at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ . They were then incubated for 1 h at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  with primary antibodies diluted in 3% BSA. Following 3 washes with 3% BSA in PBS, the cells were incubated for 1 h at  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  with secondary antibodies. Primary and secondary antibody information are listed in Table S4.4. Finally, the bottom meshes of the Transwell<sup>®</sup> inserts were carefully removed (using a surgical blade) and laid down on a microscope slide, then covered by DAPI mounting medium and lamellae. Each filter

was imaged by randomly choosing three areas, all pictures were taken using the same fluorescence and exposure parameters. Each experiment included negative controls, *i.e.* cells incubated with secondary antibodies only. Data were computed using the python Mahotas module (version 1.4.7) [13]. The mean intensity for each given tight junction picture was calculated and the average of mean fluorescence for all pictures was then reported.

### 4.3.7 Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the PRISM Graphpad<sup>TM</sup> software (version 8.0.1). Underlying assumptions of the ANOVA and student's test were verified: (i) the normality of data distribution; (ii) the homoscedasticity of all data subgroups. The normality of data distribution was confirmed by Q-Q plots, where homoscedasticity was evaluated using Bartlett's test and Brown-Forsythe's test ( $\alpha = 0.05$ ). When tests rejected homoscedasticity, multiple comparison procedures of Man-Whitney's test ( $\alpha = 0.05$ ) were applied to identify the sample means that were significantly different from each other. Otherwise, an unpaired t-test with Welch's correction or Tukey's test was applied. Significant results are marked with asterisks following those rules: ns: non significant, \* P-value  $< 0.05$ , \*\* P-value  $\leq 0.01$ , \*\*\* P-value  $\leq 0.001$ . Data are expressed as means  $\pm$  standard deviations (SD).

## 4.4 Results and Discussions

### 4.4.1 *In vitro* Model Conditions

Primary BBB-ECs were seeded at  $44 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> on the inserts of 24-well Transwell<sup>®</sup> plates. Since fluid pressure is known to increase the tightness of ECs cultured *in vitro* [23], the impact of variable static pressures caused by different volumes of culture medium was first assessed. In this context, the transendothelial electrical resistance (TEER) and the permeability of a 4 kDa fluorescein dextran marker were measured. A difference of  $24 \Omega \times \text{cm}^2$  in TEER was observed between 100 and 400  $\mu\text{L}$  (Fig S4.1-a). However, this observation did not lead to any significant difference in the permeability of the fluorescent marker (Fig S4.1-b). Thus, a volume of 200  $\mu\text{L}$  was selected as it appeared to be associated with a lower permeability, a TEER above  $70 \Omega \times \text{cm}^2$  and facilitated the manipulation compared to a volume of 400  $\mu\text{L}$ .

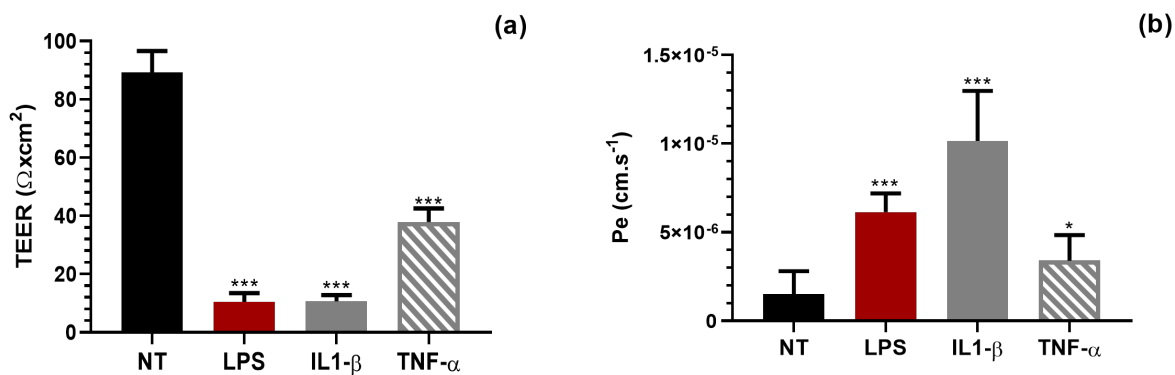
To ensure that the concentrations of cytokines used in this study were not toxic to the ECs, viability assays were performed. Only the highest concentrations tested of IL1- $\beta$  (250-500 ng  $\times$  mL<sup>-1</sup>) and TNF- $\alpha$  (100 ng  $\times$  mL<sup>-1</sup>) were found to cause a significant decrease in cell viability over a period of 24 hours (Fig S4.2). Furthermore, the impact of changing the culture medium prior to the

addition of cytokines on the transcellular permeability was compared to the addition of those pro-inflammatory molecules directly to the medium. As previously observed, completely changing the medium led to decreased TEER values (Fig S4.3-a) [14]. However, it should be noted that refraining from doing so can also negatively impact the TEER over a longer period of time, due to an impoverishment in nutrients. Interestingly, this diminution was not observed in the LPS and IL1- $\beta$  treated groups. It is hypothesized that the expected decrease could be eclipsed by the drastically reduced TEER values. Moreover, the differences observed in TEER values did not correlate with the 4-kDa dextran permeability as shown in Fig S4.3-b. Taking these observations in consideration, the culture medium was changed before treating the ECs in all subsequent experiments.

#### 4.4.2 Validation of the Acute Inflammation BBB Model

Interleukin-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ , 50 ng  $\times$  mL<sup>-1</sup>) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , 3 ng  $\times$  mL<sup>-1</sup>) were used to induce an acute inflammatory state in the BBB-EC model. Lipopolysaccharide (LPS, 10  $\mu$ g  $\times$  mL<sup>-1</sup>) was selected as a positive control, whereas untreated cells served as a negative control. Around 57% reduction in TEER values were measured in TNF- $\alpha$  activated cells, whereas LPS and IL1- $\beta$ -treated cells showed both a 88% reduction (Fig 4.1-a). To confirm that these observations were linked to a reduction in the EC tightness, the permeability of a 4 kDa FITC-dextran was calculated. The results showed an increase in the permeability coefficient, which was twice higher with TNF- $\alpha$  treated cells as compared to untreated controls. On the other hand, the permeability coefficient of the marker in the LPS and IL1- $\beta$  conditions increased by 5- and 10-fold, respectively (Fig 4.1-b). These trends were previously reported in various *in vitro* and *in vivo* models. Indeed, Ashok K. Singh, *et al.* [10] observed *in vitro* a similar increase of dextran permeability through rat ECs after treatment with LPS, which they explained by an increase in the production of nitric oxide, leading to decreased zonula occludens 1, occludin and junctional adhesion molecules (JAMs) mRNA levels. A. M. Blamire, *et al.* [24] noted *in vivo* (in a rat model) an increase in the cerebral blood volume, as well as an enhanced brain distribution of the administered contrast agent (a gadolinium chelate) post IL1- $\beta$  injection. IL1- $\beta$  is known to play a major mediator role in diverse disease states [25]. In ECs, this cytokine leads to changes in endothelial activation [26]. Contrary to LPS, IL1- $\beta$  activates a multitude of different pathways in ECs [25]. This IL1- $\beta$  characteristics could explain why cell activation was much higher than the one observed for LPS, but also why, at a concentration 1000 times higher, LPS did not induce a reduction in cell viability. Indeed, IL1- $\beta$  cytotoxic effect is caused by activation of the caspase 1 dependent process, leading to necrosis and pyroptosis processes [27] (Fig S4.2-a,b). Finally, Keith D Rochfort, *et al.* [9] reported, *in vitro*, a downregulation of adherens and tight junction proteins, which resulted in a significant reduction in TEER paired with an enhanced dextran permeability, after TNF- $\alpha$  activation. Overall, these results validate the use of this system as an acute inflammation model [28, 29].





**Figure 4.1 – Trans endothelial electrical resistance and permeability of 4 kDa Dextran-fluorescein on endothelial cells treated with LPS ( $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ), IL1- $\beta$  ( $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ) or TNF- $\alpha$  ( $3 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ).**

Endothelial cells at passage 1 were seeded at  $4 \times 10^5 \text{ cells} \times \text{cm}^{-2}$  on 24 Transwell<sup>®</sup> insert coated with collagen-IV ( $5 \mu\text{g} \times \text{cm}^{-2}$ ). Four days after seeding, cells were treated 24 h with lipopolyscharride (LPS,  $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ , red), interleukin 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ,  $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ , plain grey) or tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ,  $3 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ , dashed grey). (a) Trans endothelial electrical resistance (TEER) and (b) permeability of 4 kDa Dextran-fluorescein were thereafter measured.  $n \geq 6$ , ANOVA compare to NT cells \* : P-value < 0.05, \*\*\* : P-value < 0.001.

Based on similar experiences, many publications have reported that ECs activation is linked to the downregulation of TJs following exposure to IL1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  [9] or LPS [10]. For instance, IL1- $\beta$  and TNF- $\alpha$  are both known to reduce expressions of junction proteins such as occludin, claudin-5, ZO-1, JAM-A or change their localization [30]. These inflammatory molecules are also known to cause regulation changes in transporters. This aspect is especially important when investigating drug permeability. Indeed, one of the main transporter families is the adenosine triphosphate (ATP) binding cassette (ABC), which encompasses proteins known to efflux exogenous molecules such as many pharmaceutical compounds. In this family, p-glycoprotein (P-gp), breast cancer resistance protein (BCRP) and multidrug resistance-associated protein (MRP) are the most studied and evaluated efflux transporters [4]. P-gp is upregulated *in vitro* by a high dose of TNF- $\alpha$  or downregulated if the dose is lower, whereas BCRP is only downregulated by this cytokine. However, this paradoxical effect of TNF- $\alpha$  is not observed for IL1- $\beta$ , which downregulates both P-gp and BCRP.

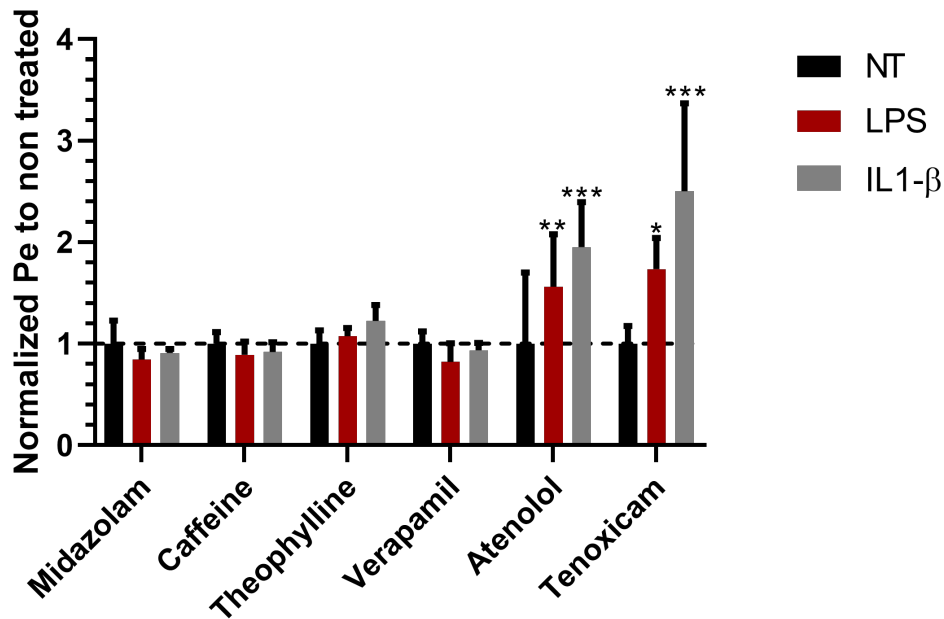


### 4.4.3 Small Drug Permeability In The Acutely Inflamed BBB Model

#### 4.4.3.1 Small Drug Permeability

To evaluate the impact of inflammation on the permeability of small drugs, six molecules with various physicochemical properties were chosen. Midazolam ( $355 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ,  $\log P$ : 5.41) readily permeates through the BBB. Caffeine ( $194 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ,  $\log P$ : - 0.07) and theophylline ( $180 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ,  $\log P$ : - 0.02) are mild brain psychostimulants and thus, can reach the brain parenchyma, albeit in lower concentrations. Verapamil ( $491 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ,  $\log P$ : 3.79), a calcium-channel blocker, atenolol ( $266 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ,  $\log P$ : 0.16), a cardio selective  $\beta$ -blocker and tenoxicam ( $337 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ ,  $\log P$ : 1.90), an anti-inflammatory agent, are all normally incapable of diffusing to the brain. This drug panel was chosen to cover high, moderate, and low BBB permeability. Furthermore, verapamil is a P-gp substrate [15]. Compared with our previous publication [15], no statistical difference in the Log Pe (non-treated) of these drugs were found, despite the two studies being conducted by distinct investigators using different animals (Table S4.5). This further validates the robustness of the used methodology .

The results showed no significant changes in the permeability of drugs with known CNS activity, namely midazolam, caffeine, and theophylline, as well as the P-gp effluxed verapamil, when comparing the inflamed conditions to the untreated model [31]. Conversely, drugs classified as CNS-negative (no known CNS activity, [31]) displayed an increased permeability. Atenolol permeability increased by 1.5- and 2-fold in LPS and IL1- $\beta$  conditions, respectively. Similar results were found for the permeability of tenoxicam which increased by 1.7- and 2.5- fold in LPS and IL1- $\beta$  conditions, respectively. (Fig 4.2). Due to its reduced effect on the BBB model compared to the two other pro-inflammatory molecules, the impact of TNF- $\alpha$  on drug permeability was not investigated. To the best of our knowledge, the fact that only drugs characterized by low BBB permeability coefficients were impacted by inflammation has never been reported before. This constitutes a step further to Peimin Lu, *et al.* [32] *in vivo* study, which stated that BBB inflammation affected the permeability of small molecules but this effect was modest, complex and dependent on the molecule tested.



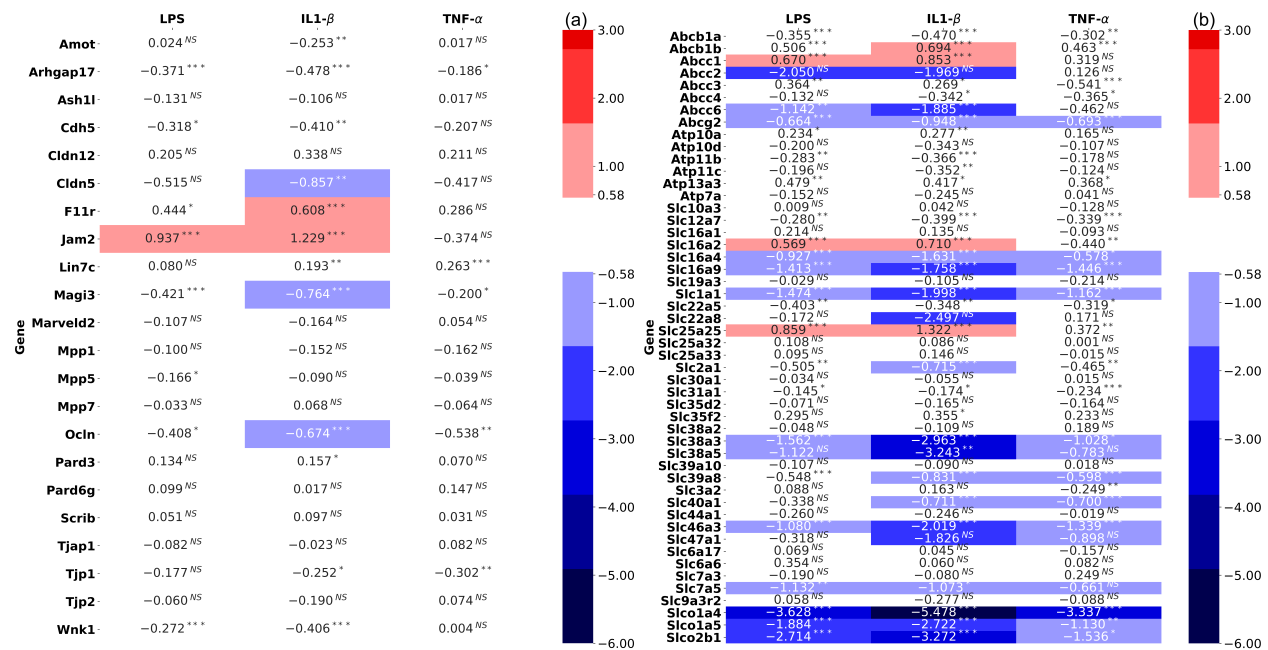
**Figure 4.2 – Permeability of 6 drugs on the blood-brain barrier model either inflamed with LPS ( $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ , red bars) or IL1- $\beta$  ( $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ , grey bars), compared to untreated cells (NT, black bars).**

Cells have been inflamed 24 hours prior permeability assay. Results are normalized to NT permeability.  $n \geq 4$ . ANOVA compare to NT results. \* : P-value < 0.05, \*\* : P-value < 0.01, \*\*\* : P-value < 0.001.

Surprisingly, the results obtained in this study cannot be explained only by the opening of the BBB paracellular space. Indeed, a dysregulation of the BBB junctions upon inflammation would facilitate the diffusion of small hydrophilic drugs, via the paracellular pathway [33]. However, caffeine and theophylline, both more hydrophilic and smaller than atenolol and tenoxicam, do not display enhanced permeability coefficients following inflammation (Fig 4.2). A reduction in transporter expression could explain our observations. Actually, atenolol has been demonstrated to be a substrate of Organic Cation Transporter 2 (Oct2, *Slc22a2*), multidrug and toxin extrusion proteins (Mate, *Slc47a1*) [34] and organic anion transporter 1A (Oatp1, *SLCO1A2* (human), *Slco1a4*, *Slco1a5* (mouse ortholog)) using small intestinal tissues [35]. Similarly, tenoxicam has been identified to be a substrate of organic anion transporter 3 (Oat3, *Slc22a8*) [36] in *Xenopus laevis oocyte* expressing mouse Oat3. These transporters being present on the surface of brain ECs, it is therefore reasonable to consider that they also play a major role in drug translocation to the brain along with paracellular diffusion. It is also possible that the inflammation process, while downregulating the expression of tight junction proteins, does not affect to the same extent the expression level of transporters.

## 4.4.3.2 RNA Expressions of Transporter of Adherens Junction, Tight Junction and Transporter

In order to get preliminary insights in challenging this hypothesis, an RNA sequencing was performed in primary ECs, comparing the activated state to the basal one. The RNA expression of major transporters, adherens and tight junctions of BBB endothelial cells (according to the classification of Richard Daneman, *et al.* [37]) was obtained by RNA sequencing. The analysis compared ECs treated with either LPS or IL1- $\beta$  to untreated cells (Fig 4.3). Both statistical and biological significances were considered to analyze our results. In particular, a fold-change of at least 1.5 ( $\log_2(1.5) = 0.58$ ) was required to underscore a noticeable change in RNA levels.



**Figure 4.3 – Ribonucleic acid fold change expression of endothelial cells either treated with LPS ( $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ), or IL1- $\beta$  ( $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ), or TNF- $\alpha$  ( $3 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ) for 24 h, relative to untreated cells.**

(a) Gene expression fold-change of major junctions found in the blood-brain barrier. (b) Gene expression fold-change of major transporters found in the blood-brain barrier.  $n = 3$  per condition, data are means of  $\log_2$  fold-change RNA expression compared to untreated cells. NS: not significant, \*: P-value < 0.05, \*\*: P-value < 0.01, \*\*\*: P-value < 0.001.

Regarding the fold changes of tight junction expressions, only the RNAs for claudin-5 (Cld5, *Cldn5*), membrane associated guanylate kinase (Maguk, *Magi3*) and occludin (Occ, *Ocln*) were found to be significantly downregulated when ECs cells were inflamed with IL1- $\beta$  (Fig 4.3-a). Activation by LPS only induced a significant upregulation of Jam2, whereas IL1- $\beta$  inflammation increased the RNA expression of junctional adhesion molecules 1 (Jam1, *F11r*) and 2 (Jam2, *jam2*).

Cld5 and Occ are well-known for their role in sealing the BBB; when their expression is downregulated, it leads to a paracellular gap [38], which is thought to increase the permeability of small hydrophilic drugs.

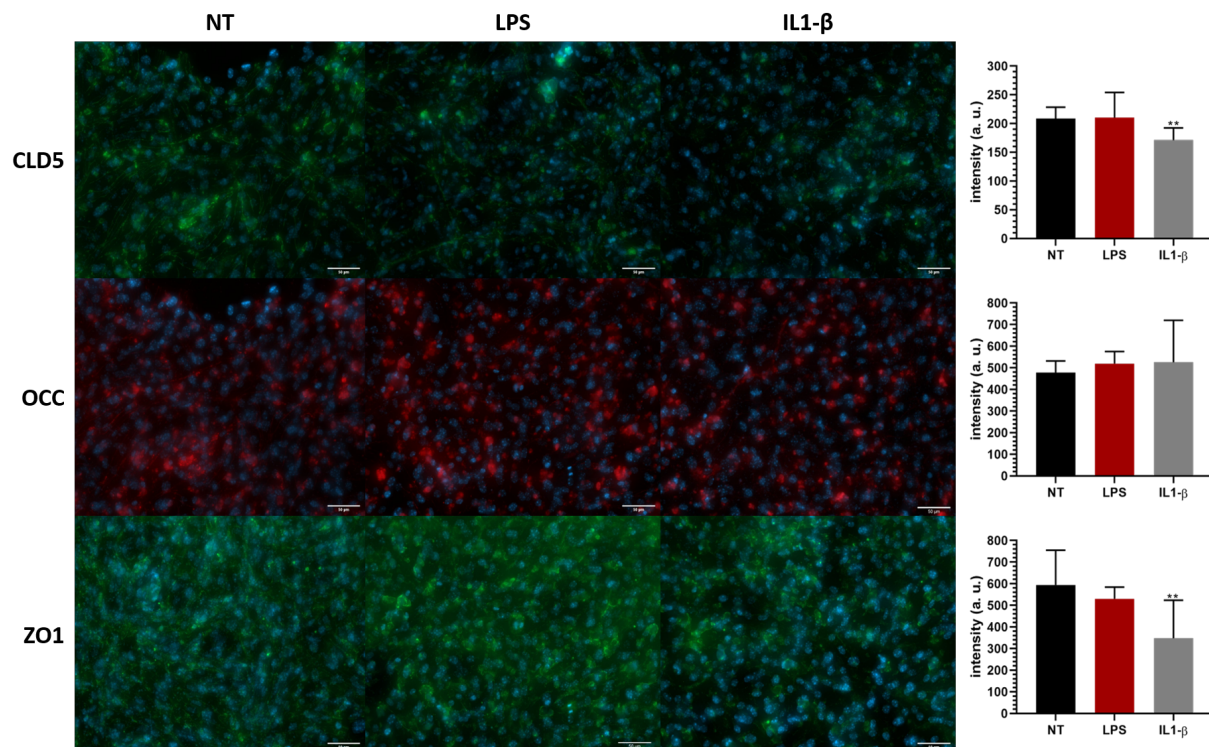
When analyzing transporter expressions (Fig 4.3-b), RNA coding for Oct2 (*Slc22a2*) could not be detected, whereas Mate (*Slc47a1*) was downregulated following IL1- $\beta$  activation. However, the read was low, and results found to be biologically non-significant. On the other hand, Oatp1 (*Slco1a4*, ortholog of *SLCO1A2*) RNA was found to be strongly downregulated when cells were treated with either IL1- $\beta$  or LPS. Moreover, the Oatp1 family was demonstrated to transport drugs in a bidirectional manner, either from blood to brain or brain to blood, depending on the drug gradient [39].

Based on these observations, an attempt was made to explain why atenolol and tenoxicam permeability coefficients were increased in inflamed conditions. *In vivo*, both drugs present a low logBB and are classified as CNS- in naïve mice, which correlates well with their low *in vitro* permeability coefficients [13]. Their passage through the BBB may be the combined result of paracellular diffusion and transporter-mediated transcellular pathways. In normal (homeostatic) conditions, the paracellular pathway must be disregarded, as TJs proteins are strongly present and anastomose ECs into a tight, contiguous cellular barrier [33]. Their (low) passage through the BBB is therefore the result of transporter-mediated translocation. As mentioned previously, the Oatp1 family, for which atenolol is a substrate [35], can function either as influx or efflux transporters [39]. On the other hand, Oat3, for which tenoxicam is a substrate [36], is a known efflux transporter found at the abluminal membrane [40]. This implies that both drugs are more effluxed than influxed when BBB is in its basal state. Regarding atenolol, this assumption is reinforced by the conclusions of the pharmacokinetics study of Xiaomei Chen, *et al.* [41], who concluded that S-atenolol is actively effluxed at the BBB.

Upon inflammation, two concurrent phenomena may occur. First, some TJs and adherens proteins are downregulated, such as occludin, claudin 5 and Jam2 (Fig 4.3). The resulting decrease in BBB tightness may allow small hydrophilic molecules to cross the BBB in a greater extent by the paracellular pathway. On the other hand, both transporters, Oatp1 and Oat3, were found downregulated in inflamed conditions. This point is to be nuanced for Oat3 (line *Slc47a1* in Fig 4.3-b) as the read count was low and overall the result was found not to be significant. Nevertheless, with both transporter expression reduced, the drug efflux could be attenuated. Therefore, both drug permeabilities would increase upon inflammation as the result of concomitant diminished transporter-mediated efflux and increased paracellular influx.

#### 4.4.3.3 Quantification Of Major Tight Junctions

In order to confirm this hypothesis, the expression of three major tight junctions, namely claudin-5, occludin and zonula occludens 1 were semi-quantitatively assessed using fluorescence microscopy (Fig 4.4). All three proteins were present and normally distributed among the primary cells.



**Figure 4.4 – Quantification of claudin-5 (Cldn5, green), occludin (Ocn, red) and zonula-occludens 1 (ZO-1, green) on primary ECs treated for 24h with LPS ( $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ) or IL1- $\beta$  ( $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ).**

Immunofluorescence microscopy projection of max intensity stack ( $\times 20$ ). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bars represent  $50 \mu\text{m}$ . Junctions were quantified in each condition by measuring each picture intensity.  $n \geq 7$ . ANOVA with Dunnett post-hoc test. \*: P-value  $< 0.05$ , \*\*: P-value  $< 0.001$ .

Globally, the TJs quantification was similar to the trends observed in RNA expression. Indeed, both the claudin-5 protein quantification and RNA expression were found to be downregulated in the IL1- $\beta$  condition (Fig 4.4, top panel). Regarding ZO1, although its RNA expression did not meet the 1.5-fold change criterion, the protein level was found statistically diminished in the IL1- $\beta$  condition (Fig 4.4, bottom panel). However, occludin quantification did not show a reduced level in the IL1- $\beta$  condition compared to the untreated one (Fig 4.4, middle panel), as it was the case for RNA sequencing. Noticeably, LPS did not appear to significantly impact the protein expression, whatever the protein. This disagrees with the findings of Lan-hui Qin, *et al.* [42] who

observed, by Western Blot, that LPS was efficiently affecting ZO-1 and occludin protein levels at a concentration as low as  $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ . A reduction in the expression of one of these three TJs is known to decrease TEER and increase endothelial leakage [38, 43, 44]. In our case, the concomitant CLD5 and ZO-1 downregulations appear as key actors [45]. Taken altogether, those results may explain why, in an acute inflamed condition, the permeability of atenolol and tenoxicam across brain ECs may be increased via the enhanced use of the paracellular pathway, along with an attenuated transporter-mediated efflux.

Subsequent investigations would help to better understand the exact roles of claudin-5 and ZO-1 as well as those of Oatp1 and Oat3 transporters. In particular, pro-inflammatory cytokine concentrations and exposure time could impact the overall picture of involved mechanisms, as variations may result in completely reversed effects, regardless of the model and species [46]. Similarly, it would be interesting to assess the impact of chronic inflammation compared to an acute one; it is quite possible that constant activation, even at a lower level, produces different patterns of TJs and transporter protein expression.

## 4.5 Conclusions

In this study, primary brain endothelial cells were found relevant to study the permeability of small drugs in an acute inflammation context. The pro-inflammatory  $\text{IL1-}\beta$  and  $\text{TNF-}\alpha$  cytokines were observed to decrease EC monolayer tightness and increase the permeability coefficient of a standard permeability marker, as did the positive control LPS. However, we found that acute inflammation did not systematically increase the permeability of all small drugs across the blood-brain barrier. Indeed, only hydrophilic drugs characterized by a low passage to the brain in healthy conditions (namely CNS- drugs) displayed an increased permeability when ECs were inflamed. Those finding may be explained by an opening of the paracellular pathway, with a concurrent downregulation of mRNA linked to two transporters for which those drugs were substrates. These results should be further investigated with a wider range of drugs, as well as various concentrations of pro-inflammatory cytokines and exposure times. In this respect, mimicking a chronic exposure to inflammation would also greatly improve our understanding of drug passage to the brain. This preliminary work highlights the importance of assessing drug permeability to the brain and to identify potential transporters and their regulation under inflamed conditions. This would allow identifying, as early in drug development as possible, potential sub-categories of patients suffering from brain pathologies, causing or resulting from, an inflamed BBB. Those patients could be at risk, following systemic intake of CNS- drugs treating other pathologies, to display central adverse effects.

## 4.6 Acknowledgements

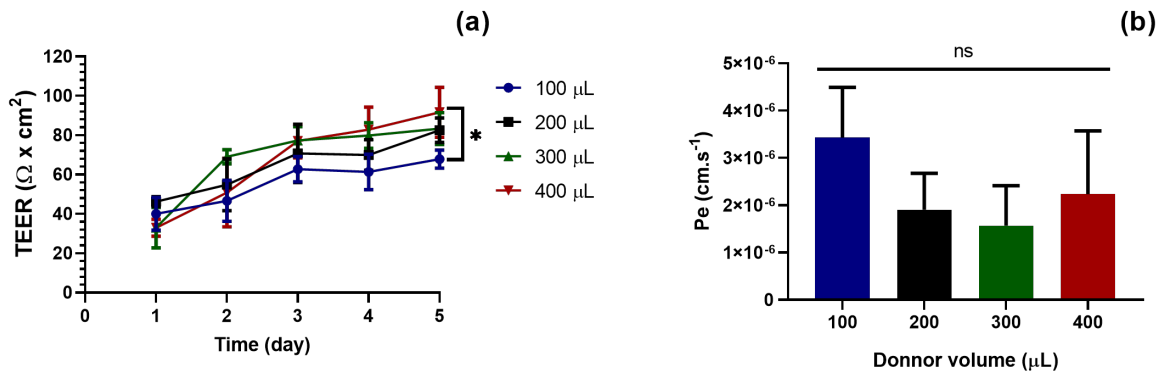
Florian Bernard-Patrzynski was supported by scholarships from Université de Montréal (Faculté des études supérieures et postdoctorales). Mauricio Lanzagorta is acknowledged for his technical assistance (Fig S4.1). Raphaelle Lambert (Genomics Core Facility, IRIC) and Patrick Gendron (Information technology and bioinformatics, IRIC) are warmly thanked for their assistance in RNA sequencing and subsequent bioinformatics analysis. The authors wish to thank Julie Gervais and Sébastien Harton for their assistance in the maintenance of mouse colonies at the Marcelle-Coutu animal facility. Part of this work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council (grant #RGPIN/6636-2018).

## 4.7 Author statement

Bernard-Patrzynski F: Conceptualization, methodology, formal analysis, investigation, data curation, writing - Original Draft, visualization. Lécuyer M-A: Methodology, writing - Review & Editing. Ramassamy C: Writing - Review & Editing, funding acquisition. Prat A: Writing - Review & Editing, funding acquisition. Leclair G: Conceptualization, methodology, validation, resources, funding acquisition, writing - Review & Editing. Roullin VG: Conceptualization, methodology, resources, validation, project administration, funding acquisition, writing - Original Draft, writing - Review & Editing.

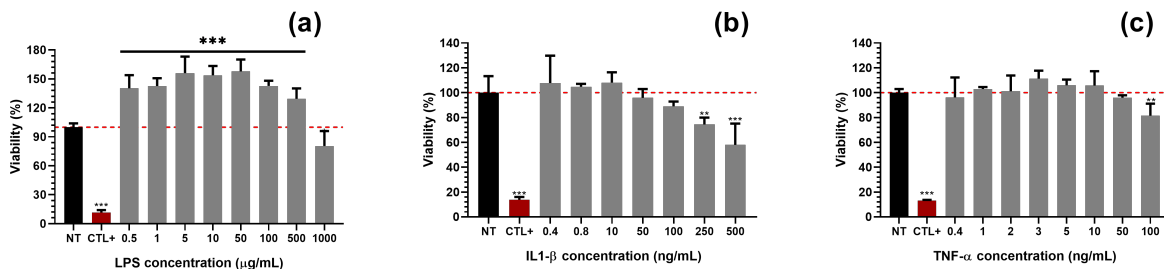


## 4.8 Supporting information



**Figure S4.1 – (a) Trans endothelial resistance and (b) permeability of 4 kDa FITC-dextran on endothelial cells at passage 1 grown with different donor volumes.**

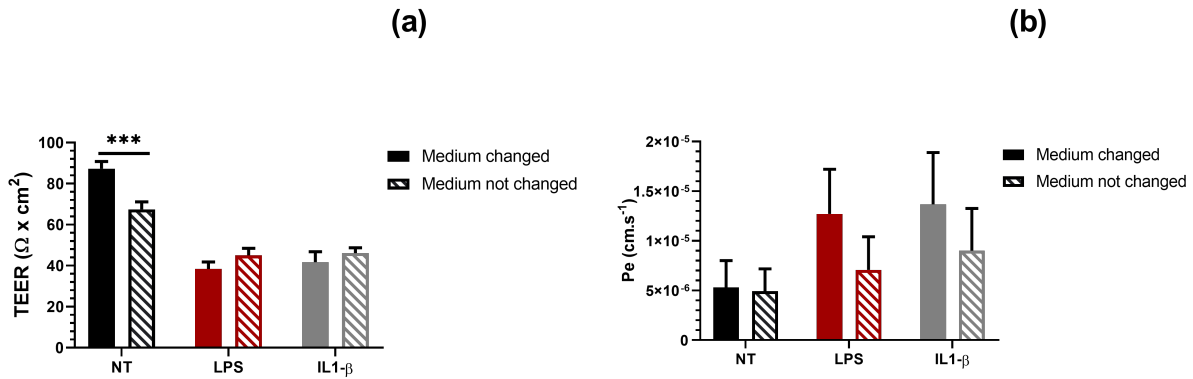
Endothelial cells at passage 1 were seeded at  $4 \times 10^5$  cells  $\times$   $\text{cm}^2$  on 24 Transwell<sup>®</sup>. Trans endothelial resistance (TEER, a) was measured every day. At day 5, the permeability of 4 kDa FITC-dextran was quantified and the permeability coefficient (b) calculated  $n = 4$ . ANOVA with Tukey's multiple-comparison. ns : non-significatif, \* : P-value < 0.05.



**Figure S4.2 – Viability of ECs exposed to increasing concentration of (a) LPS, (b) IL1- $\beta$  and (c) TNF- $\alpha$ .**

ECs are seeded at  $1,6 \times 10^4$  cells  $\times$   $\text{cm}^2$  ( $5 \times 10^3$  cells/well) on a 96 well plate and allowed to adhere for 24 h. Medium was removed and replace with medium alone (NT), medium supplemented with 0.1 % of Triton (CTL+) or increasing concentration of (a) LPS ( $0.5\text{-}1000 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ), (b) IL1- $\beta$  ( $0.4\text{-}500 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ) and (c) TNF- $\alpha$  ( $0.4\text{-}100 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ) for 24 h. Viability was quantified by the MTS kit assay. The red dash line is 100 % viability.  $n = 6$ . ANOVA compare to NT cells \* : P-value < 0.05, \*\* : P-value < 0.01, \*\*\* : P-value < 0.001.





**Figure S4.3 – Trans endothelial resistance and permeability of 4 kDa FITC-dextran in endothelial cells treated 24 h with LPS ( $50 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ ) or IL1- $\beta$  ( $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ ), while the culture media were replaced (plain bars) or not (dashed bars) prior the experiment.**

Endothelial cells at passage 1 were seeded at  $4 \times 10^5$  cells/ $\text{cm}^2$  on 24 Transwell<sup>®</sup> insert coated with collagen-IV. Five days after seeding, cells were treated 24 h with lipopolysaccharide (LPS,  $10 \mu\text{g} \times \text{mL}^{-1}$ , red), interleukin 1- $\beta$  (IL1- $\beta$ ,  $50 \text{ ng} \times \text{mL}^{-1}$ , grey). Before treatment medium was replaced or not. (a) Transendothelial electrical resistance (TEER) and (b) permeability of 4 kDa Dextran-fluorescein were thereafter measured.  $n = 3$ , ANOVA with post hoc Sidak compare medium changed to medium not changed, \*\*\* : P-value  $< 0.001$ .

Table S4.1 – Detailed list of used reagents

Item	Acronym	Provider	Catalogue #
Atenolol	Atenolol	Acros Organics, Geel, Belgium	449550050
Bovine Serum Albumin Fraction V	BSA	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	800-095-Eg
Caffeine	Caffeine	Medisca, St-Laurent, Quebec, Canada	0419-05
Collagen from human placenta, type IV	Collagen type IV	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	C5533
Collagenase, Type 2	Type 2 collagenase	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, United States	LS004174
Collagenase/dispase	Collagenase/dispase	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	10269638001
Deoxyribonuclease I	DNase I	Worthington Biochemical Corp., Lakewood, NJ, United States	LS002138
Dulbecco's Modified Eagle Medium high glucose	DMEM high	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	319-005-CL
Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose	DMEM low	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	219-020-XX
Dulbecco's Phosphate Buffered Solution, without calcium and magnesium	PBS	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	311-425-CL
Extreme DMEM	X-DMEM	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	319-100-CL
Fibroblast growth factor-Basic	bFGF	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	PHG0024
Fluorescein isothiocyanate carboxymethyl dextran	Dextran-Fluo	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	74817
Foetal Bovine Serum	FBS	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	080-150
Hank's Balanced Salt Solution (10X)	HBSS 10X	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	14065-056
Hank's Balanced Salt Solution (1X)	HBSS	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	14025-092
heparin sodium	heparin	Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada	BP2425
HEPES (1M)	HEPES	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	15630-080
Hydrocortisone	Hydrocortisone	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	H0888
Insulin-Transferin-Sodium Selenite media supplement	ITS	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	I1884-1VL
Interleukin-1 $\beta$	IL1- $\beta$	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	RMIL1BI
SlowFade Diamond with DAPI	mounting media	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	S36968
KAPA RNA HyperPrep	RNA HyperPrep	Roche, Laval, QC, Canada	08098107702
Lipopolysaccharide	LPS	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	L2630-100MG
Metoclopramide	Metoclopramide	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	M0763-10G
Midazolam	Midazolam	Cerilliant, Round Rock, Texas, United States	M-908
MTS assay kit	MTS	abcam, Toronto, ON, Canada	ab197010
Penicillin Streptomycin	Pen/Strep	Wisent, Saint-Jean-Baptiste, QC, Canada	450-201-EL
Percoll	Percoll	GE HealthCare Bio-Sciences, Baie-d'Urfé, QC, Canada	17-0891-01
Phenazine methosulfate	PMS	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	P9625
Poly-L-ornithine	PLO	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	P3655
Puromycin dihydrochloride from Streptomyces alboniger	puromycin	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	P8833
RNeasy mini kit	RNeasy	Qiagen, Montreal, QC, Canada	74106
Tenoxicam	Tenoxicam	Alfa Aesar, Tewksbury, MA, United States	H60837
Theophylline	Theophylline	Lab. Denix Giroux, Saint-Hyacinthe, QC, Canada	TH500-500
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	Tris	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	252859
Trypsin-EDTA (0.25 %), phenol red	Trypsin	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	25200072
Tumor necrosis factor $\alpha$	TNF- $\alpha$	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	RMTNFAI
Verapamil-hydrochloride	Verapamil	Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada	V4629-1G

Table S4.2 – Detailed list of used consumables

Item	Acronym	Provider	Catalogue #
BD PrecisionGlide Needle gauge 18 × 1 ½	18G	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	305196
BD PrecisionGlide Needle gauge 20 × 1 <sup>13</sup>	20G	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	305176
BD PrecisionGlide Needle gauge 22 × 1 <sup>14</sup>	22G	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	305156
Falcon flask 75 cm <sup>2</sup>	T75	Corning, Ottawa, ON, Canada	353136
FALCON Multiwell 6-Well	6-Well plates	Corning, Ottawa, ON, Canada	353046
Qualitative Grade Plain Filter Paper Sheets	filter paper	Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada	09-802-1B
Sterile syringe 10 mL	syringe	BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada	309605
STERITOP-GP 45 mm 500 mL	Filter top	Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada	SCGPT05RE
Thermo Scientific™ Nalgene™ Oak Ridge High-Speed Polycarbonate Centrifuge Tubes	Ultracentrifuge tube	Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada	05-529C
Transwell® Permeable supports 6.5 mm Insert, 24 well plate 0.4 µm Polyester membrane Thickness 10 µm Tissue Culture Treated, Polystyrene	24 well plate	Corning incorporated, Kennebunk, ME, USA	Costar 3470

Table S4.3 – Detailed list of used equipment

Item	Acronym	Provider	Catalogue #
API4000 Q TRAP <sup>TM</sup> hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer	MSMS	AB Sciex, Framingham, MA, USA	N.A.
Bead bath Lab armor	warming bath	Sheldon Manufacturing, Cornelius, OR, United States	74300-714
Corning LSE benchtop shaking incubator	shaking incubator	Corning, Ottawa, ON, Canada	6790
Endohm-6 cup	Cup	World Precision Instruments, Sarasota, FL, United States	
Fluorescence elumination system X-cite	fluorescence source	Excelitas, Vaudreuil-Dorion, QC, Canada	120PC Q
Forma <sup>TM</sup> Steri-Cycle <sup>TM</sup> CO2 Incubators	incubator	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	370
HPLC 1100 series	LC	Mississauga, ON, Canada	N.A.
IX81 Inverted Microscope	Fluorescence microscope	Olympus, Waltham, MA, United States	IX81
MetaMorph Advanced	acquisition software	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, United States	v7.8.9.0
Motic Image plus 3.0	acquisition software	Moticam, Kowloon Bay, Kowloo, Hong Kong	N.A.
MOTICAM 3+ 3.0 MP	camera	Moticam, Kowloon Bay, Kowloo, Hong Kong	
Mr. Frosty Freezing container	freezing container	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	15-350-50
MILLICELL-ERS	TEER	MILLIPOR, Burlington, MA, United States	N.A.
NanoDrop	NanoDrop	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	N.A.
NextSeq500	Sequencer	Illumina, San Diego, CA, United States	N.A.
Retiga 2000R CCD Camera	camera	QIMAGING, Surrey, BC, Canada	RET-2000R-F-M-12-C
Sorvall RC 6 Superspeed centrifuge	ultracentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	501057486-6
Sorvall ST 16R centrifuge	centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada	75004240
ZEISS Axiovert S100	bright field microscope	Carl Zeiss Microscopy LLC, Peabody, MA, United States	Axiovert S100
2100 Bioanalyzer	bioanalyzer	Agilent Technologies, Saint Laurent, QC, Canada	N.A.

Table S4.4 – Antibodies used for fluorescence microscopy imaging.

Target	Host/Isotype	Antibody	Fluorophore	Provider	Catalogue	Dilution
Claudin-5	Rabbit/IgG	Primary	N.A.	Invitrogen	34-1600	1:100
Goat anti Rabbit	Goat/IgG	Secondary	A488	Invitrogen	A-11034	1:200
Occludin	Mouse / IgG1	Primary	A594	Invitrogen	331594	1:100
ZO-1	Rabbit/IgG	Primary	N.A.	Invitrogen	40-2200	1:100

**Table S4.5** – Comparison of permeability coefficients obtained in a previous study [15] with the ones determined during the current one

	Previous study			This study			Difference	
	Log Pe	SD	n	Log Pe	SD	n	95% CI	Null value
Caffeine	-4.31	0.01	4	-4.18	0.05	5	(-0.18, -0.08)	-0.13
Midazolam	-4.33	0.01	4	-4.63	0.09	5	(0.21, 0.39)	0.30
Verapamil	-4.43	0.02	4	-4.55	0.05	5	(0.07, 0.17)	0.12
Theophylline	-4.45	0.04	4	-4.62	0.06	5	(0.1, 0.24)	0.17
Atenolol	-4.86	0.05	3	-5.16	0.30	10	(-0.05, 0.65)	0.30
Tenoxicam	-5.21	0.05	4	-5.32	0.08	5	(0.02, 0.2)	0.11

Confidence interval of difference was computed using this formula:

$$\overline{LogPe_1} - \overline{LogPe_2} \pm tS_p \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \quad (4.7)$$

Where:

t value obtains from t-table based on degree of freedom  $DF = n_1 + n_2 - 2$

$S_p$  is the standard deviation compute using this formula:

$$S_p = \sqrt{\frac{n_1 - 1SD_1^2 + n_2 - 1SD_2^2}{DF}} \quad (4.8)$$

In general, previous Log Pe values were slightly higher than the Log Pe found in this study, except for caffeine. As the difference between Log Pe means for each sample (Null value) was included in the confidence interval (CI), there was no statistical difference in Log Pe between the two studies.

## 4.9 References

- [1] Y. A. Komarova, K. Kruse, D. Mehta, *et al.* Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circulation Research*, 120(1):179–206, 2017. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306534> .
- [2] T. Worzfeld and M. Schwaninger. Apicobasal polarity of brain endothelial cells. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 36(2):340–362, 2016. <https://doi.org/10.1177/0271678x15608644> .
- [3] V. M. Pulgar. Transcytosis to Cross the Blood Brain Barrier, New Advancements and Challenges. *Frontiers in neuroscience*, 12:1019–1019, 2019. ISSN 1662-4548 1662-453X. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01019> .

- [4] A. Mahringer and G. Fricker. ABC transporters at the blood-brain barrier. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 12(5):499–508, 2016. ISSN 1744-7607 (Electronic) 1742-5255 (Linking). <https://doi.org/10.1517/17425255.2016.1168804> .
- [5] K. A. Nałęcz. Solute Carriers in the Blood–Brain Barrier: Safety in Abundance. *Neurochemical Research*, pages 1–15, 2016. ISSN 1573-6903. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2030-x> .
- [6] European medicines agency. guideline on the investigation of drug interactions, 2012. Last access : 04/01/2020. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions_en.pdf).
- [7] Office of medical products and tobacco, center for drug evaluation and research. in vitro drug interaction studies — cytochrome p450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions guidance for industry, 2020. Last access : 04/01/2020. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/vitro-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions>.
- [8] R. S. Beard, R. J. Haines, K. Y. Wu, *et al.* Non-muscle Mlck is required for  $\beta$  -catenin- and FoxO1-dependent downregulation of Cldn5 in Il-1 $\beta$  -mediated barrier dysfunction in brain endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 127(8):1840, 2014. <https://doi.org/10.1242/jcs.144550> .
- [9] K. D. Rochfort, L. E. Collins, A. McLoughlin, *et al.* Tumour necrosis factor- $\alpha$  -mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6. *Journal of neurochemistry*, 136(3):564–572, 2016. ISSN 1471-4159. <https://doi.org/10.1111/jnc.13408> .
- [10] A. K. Singh, Y. Jiang, and S. Gupta. Effects of Bacterial Toxins on Endothelial Tight Junction In Vitro: A mechanism-Based Investigation. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 17(6):331–347, 2007. ISSN 1537-6516. <https://doi.org/10.1080/15376510601077029> .
- [11] A. Varatharaj and I. Galea. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 60:1–12, 2017. ISSN 0889-1591. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010> .
- [12] S. A. Sonar and G. Lal. Blood–brain barrier and its function during inflammation and autoimmunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 103(5):839–853, 2018. ISSN 0741-5400. <https://doi.org/10.1002/jlb.1ru1117-428r> .
- [13] L. P. Coelho. Mahotas: Open source software for scriptable computer vision. *Journal of Open Research Software*, 2012.

- [14] F. Bernard-Patrzynski, M.-A. Lécuyer, I. Puscas, *et al.* Isolation of endothelial cells, pericytes and astrocytes from mouse brain. *PloS one*, 14(12):e0226302–e0226302, 2019. ISSN 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226302> .
- [15] I. Puscas, F. Bernard-Patrzynski, M. Jutras, *et al.* IVivC assessment of Two Mouse Brain Endothelial Cell Models for Drug Screening. *Pharmaceutics*, 11(11):587, 2019. ISSN 1999-4923. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110587> .
- [16] M. A. Deli, C. S. Ábrahám, Y. Kataoka, *et al.* Permeability Studies on In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1):59–127, 2005. ISSN 0272-4340 1573-6830. <https://doi.org/10.1007/s10571-004-1377-8> .
- [17] S. Nakagawa, M. A. Deli, H. Kawaguchi, *et al.* A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochemistry International*, 54(3-4):253–63, 2009. ISSN 0197-0186. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.002> .
- [18] A. M. Bolger, M. Lohse, and B. Usadel. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15):2114–20, 2014. ISSN 1367-4803. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170> .
- [19] The european bioinformatics institute. genecode mouse, release m23, grcm38.primary\_assembly\_genome, 2019. Last access : 12/10/2019. [GRCm38.primary\\_assembly.genome.fa.gz](http://GRCm38.primary_assembly.genome.fa.gz).
- [20] The european bioinformatics institute. genecode mouse, release m23, gencode.vm23.annotation, 2019. Last access : 12/10/2019. [gencode.vM23.annotation.gtf.gz](http://gencode.vM23.annotation.gtf.gz).
- [21] A. Dobin, C. A. Davis, F. Schlesinger, *et al.* STAR: ultrafast universal Rna-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1):15–21, 2013. ISSN 1367-4803. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635> .
- [22] M. I. Love, W. Huber, and S. Anders. Moderated estimation of fold change and dispersion for Rna-seq data with Deseq2. *Genome Biology*, 15(12):550, 2014. ISSN 1474-760X. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8> .
- [23] L. Cucullo, N. Marchi, M. Hossain, *et al.* A dynamic in vitro Bbb Model for the Study of Immune Cell Trafficking into the Central Nervous System. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(2):767–777, 2011. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.162> .

- [24] A. M. Blamire, D. C. Anthony, B. Rajagopalan, *et al.* Interleukin-1 $\beta$  -Induced Changes in Blood–Brain Barrier Permeability, Apparent Diffusion Coefficient, and Cerebral Blood Volume in the Rat Brain: A magnetic Resonance Study. *The Journal of Neuroscience*, 20(21):8153, 2000. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-21-08153.2000> .
- [25] C. A. Dinarello. Overview of the Il-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunological reviews*, 281(1):8–27, 2018. ISSN 1600-065X 0105-2896. <https://doi.org/10.1111/imr.12621> .
- [26] S. J. O’Carroll, D. T. Kho, R. Wiltshire, *et al.* Pro-inflammatory Tnf $\alpha$  and Il-1 $\beta$  differentially regulate the inflammatory phenotype of brain microvascular endothelial cells. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1):131, 2015. ISSN 1742-2094. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0346-0> .
- [27] D. Brough and N. J. Rothwell. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1 $\beta$  is cytosolic and precedes cell death. *Journal of Cell Science*, 120(5):772–781, 2007. <https://doi.org/10.1242/jcs.03377> .
- [28] W. A. Banks, A. M. Gray, M. A. Erickson, *et al.* Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption: roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1):223, 2015. ISSN 1742-2094. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1> .
- [29] C. Greene and M. Campbell. Tight junction modulation of the blood brain barrier: Cns delivery of small molecules. *Tissue Barriers*, 4(1):e1138017, 2016. ISSN null. <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1138017> .
- [30] C. Larochelle, J. I. Alvarez, and A. Prat. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Letters*, 585(23):3770–80, 2011. ISSN 1873-3468 (Electronic) 0014-5793 (Linking). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.066> .
- [31] S. Vilar, M. Chakrabarti, and S. Costanzi. Prediction of passive blood-brain partitioning: straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 28(8):899–903, 2010. ISSN 1873-4243 (Electronic) 1093-3263 (Linking). <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2010.03.010> .
- [32] P. Lu, C. Gonzales, Y. Chen, *et al.* CNs penetration of small molecules following local inflammation, widespread systemic inflammation or direct injury to the nervous system. *Life Sciences*, 85(11):450–456, 2009. ISSN 0024-3205. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.07.009> .



- [33] M. Laksitorini, V. D. Prasasty, P. K. Kiptoo, *et al.* Pathways and progress in improving drug delivery through the intestinal mucosa and blood-brain barriers. *Therapeutic delivery*, 5(10):1143–1163, 2014. ISSN 2041-5990 2041-6008. <https://doi.org/10.4155/tde.14.67> .
- [34] J. Yin, H. Duan, Y. Shirasaka, *et al.* Atenolol renal secretion is mediated by human organic cation transporter 2 and multidrug and toxin extrusion proteins. *Drug Metabolism and Disposition*, 43(12):1872–1881, 2015. ISSN 0090-9556. <https://doi.org/False> .
- [35] Y. Kato, T. Miyazaki, T. Kano, *et al.* Involvement of influx and efflux transport systems in gastrointestinal absorption of celiprolol. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(7):2529–2539, 2009. ISSN 0022-3549. <https://doi.org/10.1002/jps.21618> .
- [36] Y. Kobayashi, N. Ohshiro, A. Tsuchiya, *et al.* Renal transport of organic compounds mediated by mouse organic anion transporter 3 (MoaT3) : further substrate specificity of MoaT3. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(5):479, 2004. <https://doi.org/10.1124/dmd.32.5.479> .
- [37] R. Daneman, L. Zhou, D. Agalliu, *et al.* The Mouse Blood-Brain Barrier Transcriptome: A new Resource for Understanding the Development and Function of Brain Endothelial Cells. *PLOS ONE*, 5(10):e13741, 2010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013741> .
- [38] S. M. Stamatovic, A. M. Johnson, R. F. Keep, *et al.* Junctional proteins of the blood-brain barrier: New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers*, 4(1):e1154641, 2016. ISSN 2168-8362 2168-8370. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1154641> .
- [39] P. T. Ronaldson and T. P. Davis. Targeted Drug Delivery to Treat Pain and Cerebral Hypoxia. *Pharmacological Reviews*, 65(1):291, 2013. <https://doi.org/10.1124/pr.112.005991> .
- [40] B. V. Zlokovic. The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003> .
- [41] X. Chen, T. Slättengren, E. C. M. de Lange, *et al.* Revisiting atenolol as a low passive permeability marker. *Fluids and Barriers of the CNS*, 14(1):30, 2017. ISSN 2045-8118. <https://doi.org/10.1186/s12987-017-0078-x> .
- [42] L.-h. Qin, W. Huang, X.-a. Mo, *et al.* Lps induces occludin dysregulation in cerebral microvascular endothelial cells via mapk signaling and augmenting mmp-2 levels. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015:120641–120641, 2015. ISSN 1942-0994 1942-0900. <https://doi.org/10.1155/2015/120641> .
- [43] P. Balbuena, W. Li, and M. Ehrlich. Assessments of tight junction proteins occludin, claudin 5 and scaffold proteins Zo1 and Zo2 in endothelial cells of the rat blood–brain barrier: Cellular

- responses to neurotoxicants malathion and lead acetate. *NeuroToxicology*, 32(1):58–67, 2011. ISSN 0161-813X. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.10.004> .
- [44] H. Jiao, Z. Wang, Y. Liu, *et al.* Specific Role of Tight Junction Proteins Claudin-5, Occludin, and Zo-1 of the Blood–Brain Barrier in a Focal Cerebral Ischemic Insult. *Journal of Molecular Neuroscience*, 44(2):130–139, 2011. ISSN 1559-1166. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9496-4> .
- [45] J. D. Huber, R. D. Egleton, and T. P. Davis. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends in Neurosciences*, 24(12):719–725, 2001. ISSN 0166-2236. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)02004-X](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)02004-X) .
- [46] F. Wu, L. Liu, and H. Zhou. Endothelial cell activation in central nervous system inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(5):1119–1132, 2017. ISSN 0741-5400. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0816-352RR> .

# Chapitre 5

## Discussion et perspectives

### 5.1 Résumé des travaux réalisés

Au cours de ce travail doctoral, nos recherches ont porté sur le développement d'un modèle de BHE pour l'étude de la perméabilité de petites molécules. Dans un premier temps, nous avons isolé, à partir du cerveau de souris, les trois types de cellules formant majoritairement la BHE : les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes. Dans un second temps, nous avons évalué différents modèles possibles de la BHE. Par la suite, nous avons validé, par une corrélation *in vitro- in vivo*, le modèle composé uniquement des cellules endothéliales. Finalement, dans une dernière partie, nous avons démontré l'utilisation du modèle de BHE dans un contexte inflammatoire pour l'étude de la perméabilité de petites molécules et la découverte des mécanismes impliqués dans l'augmentation de la perméabilité de certaines des molécules testées. Dans ce chapitre, nous discuterons les méthodes et les techniques employées. Nous discuterons également des résultats obtenus et de leur pertinence dans l'étude de la perméabilité des médicaments destinés au SNC. De plus, nous évaluerons les différentes pistes qui n'ont pas été explorées. Enfin nous verrons les perspectives futures de l'utilisation des modèles sains et pathologiques développés durant ces travaux de doctorat.

### 5.2 Isolation et enrichissement des cellules de la BHE

L'isolation des trois types cellulaires formant la BHE n'est pas nouvelle. La première isolation des cellules endothéliales a eu lieu dans le début des années 70 mais le protocole le plus proche de celui utilisé présentement a été publié en 1975 [169]. Le premier protocole pour l'isolation des péricytes de la BHE date de 1996 [55] et celui des astrocytes de 1970 [42]. Cependant, même après 50 ans et de nombreux protocoles publiés, la majorité d'entre eux manque d'informations cruciales telles que le nombre total d'animaux utilisés, le rendement et la pureté des cellules isolées, l'expression de marqueurs d'intérêt, sans oublier l'évaluation de la reproductibilité de ces protocoles.

Ces informations, souvent testées, mais peu ou pas rapportées dans la littérature, sont critiques. En effet, elles permettent une meilleure appréciation de la qualité des isolations, la comparaison des protocoles entre eux et le choix éclairé de la méthode la plus appropriée selon l'utilisation qui sera faite des cellules. De plus, suite à la constatation que la littérature n'offrait pas d'article rassemblant l'isolation, l'enrichissement et la caractérisation des trois types cellulaires majeurs de la BHE, nous avons décidé d'entreprendre des recherches dans ce sens. L'obtention de cellules primaires est bien souvent la matière première pour les études. Des recherches sur l'isolation, l'enrichissement et la caractérisation des cellules ont été utiles pour commencer sur de bonnes bases le développement d'un modèle de la BHE.

Un point important dans l'utilisation de cellules primaires est l'aspect animal. En effet, le choix de la souris n'est pas anodin car le nombre de cellules isolées par cerveau est proportionnel à la taille de ce dernier. Ainsi, l'utilisation du cerveau de porc ou de bovin serait intéressante. Cependant, l'obtention de cerveaux issus de ces animaux se fait principalement via les abattoirs. Il est difficile d'obtenir les mêmes certifications et contrôles que pour les petits animaux de laboratoire, reproduits et élevés dans des conditions bien plus strictes. Au final, il était donc primordial que le nombre de souris sacrifiées permette d'obtenir, toute proportion gardée, un ratio nombre d'expériences par animaux *in vitro* supérieur à celui *in vivo*.

Les recherches ont commencé avec l'idée d'isoler et d'enrichir les trois types cellulaires depuis l'équivalent d'un seul cerveau de souris. Un tel protocole aurait été une avancée majeure d'un point de vue scientifique et éthique. Le plus intéressant aurait été l'isolation à partir des souris adultes pour éviter tout potentiel problème de maturité des cellules. Chez la souris adulte, il est déjà possible d'obtenir les ECs et les PCs [170]. Le problème auquel nous nous sommes heurtés est que les ACs sont sénescents lorsqu'elles sont isolées chez la souris adulte. D'un autre côté, les ACs s'obtiennent très facilement et en grand nombre chez la souris nouveau-née. Les ECs peuvent être également obtenues chez le nouveau-nés, seulement elles sont immatures [171, 172]. Une concentration en puromycine aussi élevée que dans une isolation d'ECs adultes entraîne la mort des ECs de nouveau-né. Cette observation pourrait impliquer une sous-expression de la P-gp à ce stade-là du développement du cerveau mammifère. Ce point a d'ailleurs été évoqué par Tsai C. E. *et al.* [173].

Concernant les PCs, aucun protocole ne mentionnait jusqu'alors la possibilité de les isoler depuis le cerveau des souris nouvellement nées. Chez la souris adulte, après l'obtention de l'homogénat de capillaires, on aurait ainsi séparé le broyat en deux cultures différentes : l'une contenant de la puromycine, qui aurait sélectionné les ECs, l'autre culture n'en aurait pas contenue. À la suite de plusieurs passages, nous aurions obtenu une culture pure en PCs [170]. Cette technique requiert environ 5 semaines pour obtenir les PCs, alors que les ECs sont disponibles après 1 semaine. Ainsi à chaque isolation, nous aurions utilisé les ECs et les PCs de la précédente isolation. Le problème

chez la souris adulte n'était donc pas l'obtention des ECs et des PCs mais seulement des ACs. En effet, les ACs ne se multiplient pas lorsqu'elles sont isolées chez la souris adulte. La recherche et le développement d'un milieu enrichi et plus spécialisé auraient sans doute permis de maintenir (et non d'accroître) une population viable d'astrocytes adultes [174]. Chez la souris nouveau-née, il est donc techniquement possible d'isoler les trois types cellulaires. En effet, lors de nos travaux, nous avons mis au point une méthode d'isolation des PCs chez le nouveau-né, présentée dans l'article 1 ([Chapitre 2](#)). Cependant, le problème de maturité apparente des ECs du nouveau-né aurait causé un surcroît d'investigation pour rechercher des milieux et des méthodes qui leur auraient permis de devenir matures. Pour répondre à nos besoins pour l'étude de la perméabilité, nous avons donc décidé de poursuivre avec les ECs isolés chez la souris adulte et d'utiliser les PCs et les ACs obtenues chez les souris nouvellement nées.

Un autre aspect qui pourrait améliorer le ratio expérience / nombre d'animaux sacrifiés serait d'augmenter le rendement de cellules obtenues. Notre protocole a été développé pour des plaques de 6 puits. Dans des flasques, le rendement pourrait être plus intéressant, si l'on admet que la réduction de la densité de capillaires permet d'obtenir plus de cellules à confluence. Lorsque 20 souris sont sacrifiées, nous déposons l'homogénat de capillaires équivalent à 1 cerveau par puits d'une plaque de 6 puits. Ainsi pour 20 cerveaux, la surface d'un puits étant de  $1,6 \text{ cm}^2$ , la surface de croissance totale est de  $32 \text{ cm}^2$ . Alors que si l'on dépose 10 cerveaux par flasque de 25 ou 75  $\text{cm}^2$ , on disposerait alors d'une surface totale de 50 ou 150  $\text{cm}^2$ . Cependant, des essais devraient être effectués car les ECs changent de morphologie et se multiplient mal lorsqu'elles sont trop éloignées les unes des autres. Ce problème n'a pas été observé lors des expériences réalisées dans le [Chapitre 4](#). De plus, aucune diminution de TEER ([Fig 5.4-a](#)) ou de changement notable de la perméabilité ([S4.5](#)) n'a été observée entre les expériences du [Chapitre 3](#) et du [Chapitre 4](#). Une autre façon d'augmenter la concentration de capillaires, et possiblement le rendement obtenu en cellules endothéliales, serait de supprimer le gradient de Percoll lors de l'isolation. En effet, selon mon expérience, il est difficile de récupérer la totalité des capillaires entre les différentes couches de densité, alors qu'à l'étape précédente, la totalité des capillaires est culottée au fond d'un tube. Cependant, ces capillaires sont également en présence d'une grande quantité de globules rouges et autres débris cellulaires. La présence de ces déchets pourrait être toxique et nuire à l'expression des caractéristiques des ECs.

Le dernier point général que je souhaiterais aborder est le fait que les dernières avancées en séquençage cellule par cellule ont permis de démontrer que chaque région du cerveau semble posséder des sous-populations de cellules [175]. Ceci ne semble pas induire de problème en apparence, puisque l'étude de la perméabilité *in vivo* se réalise sur l'entièreté du cerveau. Cependant, dans une culture *in vitro*, nous ne contrôlons pas la prolifération des sous-populations, ce qui pourrait induire de la variabilité entre les expériences, ou encore la prédominance d'un sous-type cellulaire

par rapport à un autre. Ce point sera sans doute davantage étudié dans les décennies à venir.

### 5.2.1 Améliorations possibles pour l'obtention des cellules endothéliales

Le protocole semble optimisé pour isoler les capillaires qui permettent ensuite d'enrichir la culture en ECs à environ 90 %. Outre le commentaire précédent sur le Percoll, il y a peu de place aux changements. Néanmoins, enlever les méninges cause une perte non négligeable de tissus sur le filtre. Dans le protocole actuel, les méninges sont retirées car elles sont composées majoritairement de fibroblastes qui croissent bien plus rapidement que la majorité des autres types cellulaires [176]. Ainsi, avant que l'on découvre que la puromycine pouvait être utilisée comme méthode de purification des ECs, il fallait limiter la contamination de la culture par d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes. À ma connaissance, les protocoles ont continué à reporter l'élimination des méninges mais personne n'a testé si la puromycine pouvait être suffisante pour purifier une culture de capillaires en ECs de la BHE sans enlever les méninges. Cette méthode pourrait améliorer le rendement d'ECs obtenues chez la souris adulte. Cependant, elle serait sans doute difficilement applicable pour les PCs car les conditions de culture sont moins sélectives. L'utilisation des digestions enzymatiques est inévitable. D'après mes observations, lorsque la deuxième digestion n'est pas réalisée, les capillaires semblent plus longs et ils sont moins répartis de façon uniforme sur toute la surface du puits, la densité est augmentée, ce qui semble provoquer une diminution du rendement de cellules obtenues.

Les ECs primaires répondent à l'inflammation par une diminution de l'expression de claudine-5, occludine et zonula occludens-1. Ces changements s'accompagnent, d'une diminution de la TEER et d'une augmentation de la perméabilité du dextran 4 kDa. Les transporteurs d'influx, tels que la P-gp et la BCRP présentent également des expressions diminuées [98]. Toutefois, ces résultats sont à nuancer, en fonction de la molécule utilisée pour inflammer les cellules (TNF- $\alpha$  seul ou en combinaison avec IFN- $\gamma$ , l'IL1- $\beta$  ou le LPS), les concentrations utilisées et la variabilité entre les lots de cellules isolées. De plus, dans l'article d'isolation ([Chapitre 2](#)), les résultats obtenus par q-PCR n'ont pas été confirmés avec une méthode quantitative. Parallèlement, dans l'article sur l'inflammation ([Chapitre 4](#)), la présence du vérapamil, un substrat de la P-gp, ne met pas en évidence que la diminution d'ARN codant pour la P-gp impacte notablement la perméabilité du substrat ([Fig 4.2](#) et [Fig 4.3](#)).

### 5.2.2 Obtention des péricytes : un avantage, des inconvénients

L'isolation et l'enrichissement des PCs depuis la souris nouvellement née sont une approche qui génère un grand nombre de cellules. Plusieurs questions sont soulevées par ce résultat. Les péricytes de nouveau-né prolifèrent plus car ils présentent encore de nombreuses propriétés des cellules

souches [18]. De même, les PCs obtenus chez la souris adulte sont en grande majorité sénescents, ce qui limite le nombre de cellules produites [177]. Cependant, bien que les péricytes soient obtenus en plus grand nombre chez le nouveau-né, la maturité de ces cellules peut être remise en question. En effet, leur coculture avec les ECs ne produit pas d'augmentation de la TEER (Chapitre 2, Fig 2.4-a), ni même un changement dans la perméabilité d'un marqueur paracellulaire (Chapitre 2, Fig 2.4-b) [98], contrairement à ce qui est largement rapporté par d'autres [178]. En effet, nous avons vu dans l'introduction que les PCs régulent les jonctions serrées par la sécrétion de différents facteurs. Une comparaison entre les cellules obtenues chez la souris nouvellement née et la souris adulte permettrait de vérifier d'éventuelles différences de niveau d'expression des facteurs de croissance TGF $\beta$ 1, GDNF et ANG1, majoritairement reconnus responsables de cette communication intercellulaire [179].

### 5.2.3 Obtention des astrocytes : peu de pistes d'amélioration du protocole

L'obtention des cortex de souris nouvellement née est une des étapes les plus compliquées dans l'isolation et l'enrichissement des ACs. Cette étape demande un microscope de dissection et des pinces adaptées mais surtout de la dextérité pour 'peler' les méninges qui ont une épaisseur d'environ 4  $\mu$ m. Il faut ensuite retirer seulement les cortex qui forment des disques concaves facilement déchirables. Malheureusement, il n'existe pas de méthode pour s'affranchir de cette étape tout en offrant un aussi bon rendement. Les méthodes utilisant des billes magnétiques sur lesquels un anticorps dirigé contre un des marqueurs des ACs (généralement GLAST-1) est greffé permettent d'obtenir de bons résultats en termes de pureté [48]. Cependant, le nombre de cellules est limité aux nombres de billes et d'interactions qu'elles peuvent générer avec les cellules. Il s'agit également d'une solution bien plus coûteuse.

## 5.3 Cahier des charges du modèle de BHE pour évaluer la perméabilité

Le développement d'un modèle *in vitro* doit répondre aux besoins des expérimentateurs. Pour cela, il est important que, très tôt, dès sa conceptualisation, une liste de ses critères principaux soit établie. Un modèle ne peut malheureusement pas tenir compte de l'ensemble des caractéristiques connues du tissu qu'il doit représenter. En effet, plus les caractéristiques du modèle sont nombreuses, plus sa complexité augmente et le modèle sera alors potentiellement plus difficile à mettre en œuvre que l'utilisation d'un organisme vivant. Ces concepts de critères et de complexité expliquent en grande partie le grand nombre de modèles de BHE développés et qui restent à développer.

Dans le contexte de note étude, notre premier critère était que le modèle *in vitro* devait se

rapprocher le plus possible d'un modèle de criblage à haut débit. Le criblage à haut débit (*high throughput screening*, HTS) sous-entend que le nombre de molécules testées doit être le plus grand possible dans une période la plus courte possible. L'utilisation de plaque Transwell® est la plus courante pour répondre aux besoins d'un modèle HTS. En effet, l'utilisation d'une plaque séparant deux puits par un filtre de composition et de porosité variables permet de mimer simplement une interface sang / cerveau. Cette interface est ensuite modifiée de différentes façons afin de changer les paramètres de perméabilité évalués. En plus d'être une interface simple pour produire des modèles de BHE, il est également possible d'automatiser l'emploi de telles plaques. Dans un premier temps, le PAMPA-BBB nous a servi de référence : il s'agit d'un simple filtre imprégné de lipides. Nous avons, par la suite, utilisé des cellules immortalisées (bEnd.3) de la même espèce que le modèle que nous souhaitions développer, pour le comparer au final au modèle que nous souhaitions, constitué de cellules primaires.

Le deuxième critère était que le modèle *in vitro* devait nous permettre de classer des molécules selon leur capacité à traverser la BHE. Ce classement devait être le plus fidèle possible aux observations *in vivo*. En effet, la finalité du modèle résidait dans l'obtention d'un modèle suffisamment prédictif pour permettre la prise de décisions quant à l'utilisation ou l'amélioration d'une molécule ou d'un vecteur, bien avant les tests réalisés *in vivo*. L'espèce animale que nous avons privilégiée est la souris, qui possède de nombreux avantages : coût par animal, taille de l'animal, possibilité de réaliser facilement des études *in vivo* ainsi que tous les détails présentés dans l'introduction.

Le troisième critère était que le modèle *in vitro* de BHE développé devait nous permettre d'étudier de manière plus approfondie les mécanismes en jeu dans les phénomènes perméabilité. L'avantage d'un modèle Transwell® est que le milieu est suffisamment simple pour être contrôlé et modifié. De plus, les cellules sont facilement accessibles pour les techniques d'immunofluorescence et selon la taille des puits, pour des méthodes telles que la q-PCR ou la spectrométrie de masse. Cela demande également que le modèle comporte au minimum des cellules exprimant les récepteurs et les transporteurs que l'on souhaite étudier.

Le modèle composé seulement de cellules endothéliales primaires déposées sur un filtre de polyester recouvert de collagène type IV est le modèle qui répond aux exigences que nous nous sommes fixées. Ce modèle de BHE est bien moins proche d'un modèle HTS que le PAMPA-BBB ou le modèle composé de cellules immortalisées. Cependant, le modèle de BHE primaire peut tout de même être automatisé. Les ECs primaires sont aussi le modèle qui fournissait des résultats les plus proches des observations *in vivo*, comme nous avons pu le démontrer dans le [Chapitre 3](#). En effet, les bEnd.3 ont présenté une forte différence d'expression d'ARN comparé aux ECs pour les jonctions et les transporteurs étudiés. Cela se traduit par une TEER bien plus faible et une incapacité à prédire la perméabilité *in vivo* d'un panel représentatif de 7 molécules thérapeutiques. Cependant, certains points n'ont pas encore été abordés et discutés tels que : le non emploi des trois



types cellulaires pour établir notre modèle et la variabilité des modèles de BHE construits.

L'utilisation de cellules primaires pour mesurer la perméabilité de molécules à travers la BHE permet de réduire le nombre d'animaux utilisés *ceteris paribus*. Selon le protocole décrit dans le [Chapitre 2](#), une isolation utilisant 20 souris adultes permet d'obtenir  $20 \times 1,5 \times 10^5 = 3 \times 10^6$  ECs ([S2.1](#)). Sachant que pour réaliser les tests de perméabilité dans les Transwell<sup>®</sup>, onensemence  $0,33 \times 2 \times 10^5 = 6,6 \times 10^4$  ECs/puits ([3.3.3](#)). Une isolation d'ECs à partir de 20 souris permet donc de réaliser  $3 \times 10^6 / 6,6 \times 10^4 \approx 45$  tests. Le nombre de souriceaux utilisés pour isoler les ACs et les PCs permet d'obtenir suffisamment de cellules pour ensemenecer les 45 tests. Le modèle de BHE primaire reste donc pertinent pour mesurer la perméabilité de molécules à travers la BHE.

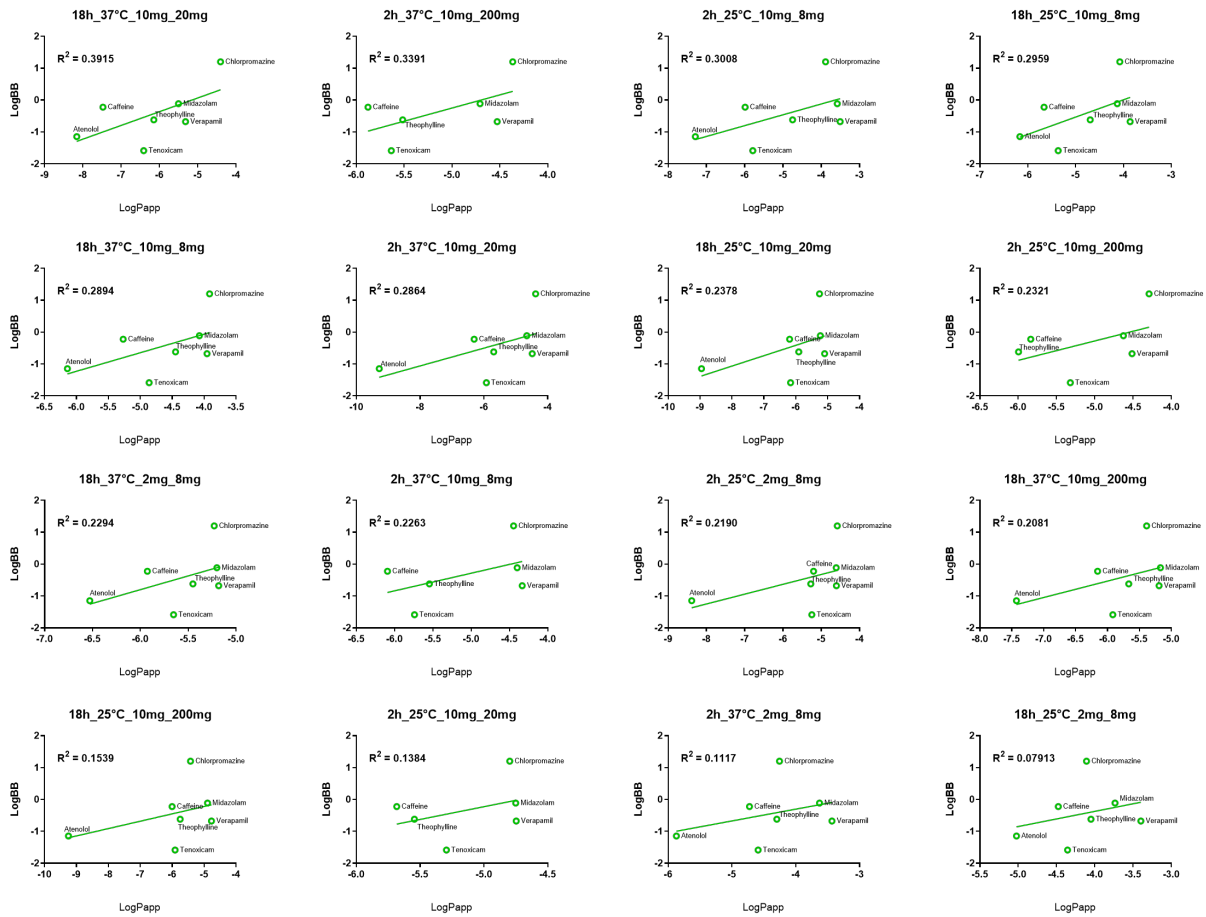
### 5.3.1 Les modèles multicellulaires – trop complexes actuellement pour des applications HTS

Nous avons vu dans l'introduction que les PCs et également les ACs avaient de nombreuses interactions avec les ECs de la BHE. Ces interactions sont maintenant bien connues, même si les mécanismes impliqués ne sont pas encore totalement élucidés. Une grande partie de ces interactions réside dans l'induction et le maintien des caractéristiques de la BHE telles que l'expression des jonctions adhérentes, des jonctions serrées et des transporteurs. C'est pour cette raison qu'initialement, nous avons développé et validé le protocole d'isolation pour les trois types cellulaires de la BHE. Lors des expériences de validation de la fonctionnalité des cellules enrichies, nous avons constaté que la coculture de péricytes n'induisait pas de changement de la TEER et de la perméabilité du marqueur paracellulaire comparé aux ECs seules. D'un autre côté, les ACs induisaient une augmentation de la TEER et une réduction de la perméabilité ([Fig 2.4](#)). Ceci était attendu compte tenu des résultats rapportés par d'autres chercheurs [39]. Un modèle est pertinent plus il est proche de ce que l'on connaît de la BHE *in vivo*. Dans le contexte de nos études, le modèle multicellulaire à base d'ECs et d'ACs pourrait être considéré comme le meilleur des modèles. Seulement, une forte augmentation ou diminution de la TEER ne se traduit pas nécessairement par un changement significatif de perméabilité ([Fig 4.2](#)). De plus, même entre 50 et  $70 \Omega \cdot cm^2$ , la TEER des ECs primaires seules reste largement supérieure à celle de nombreux modèles cellulaires immortalisés dont les bEnd.3 ([Fig 3.3-a](#)). Ce constat, étayé par une recherche de la littérature, nous a conduit à ne pas complexifier notre modèle de BHE formé des ECs seulement par l'addition d'ACs. En effet, cultiver deux types cellulaires aux exigences divergentes alourdit les procédures. Selon notre protocole, les ACs doivent être déposés sur une surface de poly-L-ornithine, là où les ECs sont cultivées sur du collagène de type IV. Les ACs nécessitent un milieu contenant de l'HEPES alors que les ECs sont cultivées dans un milieu riche en éléments (bFGF, ITS, héparine, hydrocortisone). Les ACs sont ajoutés 24 h avant les ECs [98]. Cependant, il reste tout de même un intérêt à in-

clure les autres cellules de la BHE qui pourraient induire des changements dans l'expression des récepteurs ou des transporteurs utiles à l'étude de la perméabilité des molécules et des vecteurs thérapeutiques. Plusieurs auteurs ont observé une augmentation de l'expression de la P-gp [149] et de la Glut-1 [148]. D'un point de vue enzymatique, les facteurs solubles exprimés par les ACs promeuvent l'expression d'enzyme telles que la phosphatase alcaline, acétylcholinestérase, et la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Le récepteur à la transferrine est également augmenté [180].

### 5.3.2 Le modèle PAMPA-BBB – simplissime mais peu fiable

La méthode PAMPA-BBB est une de celles couramment utilisées par l'industrie pharmaceutique pour classer des molécules selon leur capacité à traverser la BHE. Elle est également la plus rapide des techniques *in vitro*, en plus d'être la plus simple. Avant de débiter avec les modèles cellulaires, nous avons, dans un premier temps, cherché à optimiser et tester le modèle PAMPA-BBB. En effet, celui-ci est souvent réalisé sur 18 h à une température de 22°C avec une concentration variable en lipide [181]. Nous avons voulu déterminer si une température physiologique de 37°C combinée à une quantité optimale de lipides en un temps réduit de 2 h pouvaient permettre une meilleure classification des 7 molécules utilisées tout au long de ce projet. Notre objectif principal était une optimisation pour réduire le temps nécessaire à son utilisation mais également permettre de tester plus de molécules par puits. Les résultats obtenus ne démontrent pas une tendance précise sur l'impact de la température, de la quantité de lipides utilisés pour réaliser le modèle ou encore de la durée (Fig 5.1).



**Figure 5.1 – Corrélation *in vitro/in vivo* pour 7 molécules réalisées sur différentes conditions de PAMPA-BBB.**

Les conditions testées sont le temps d'incubation (18 h ou 2 h), la température à laquelle le test est réalisé (25°C ou 37°C), la quantité de dodécane utilisé (2 mg ou 10 mg) et la quantité de lipides extraite du cerveau de porc (8 mg, 20 mg ou 200 mg). Les résultats sont présentés de la plus haute corrélation à la plus basse. Les données sont la moyenne de 6 réplicats.

Néanmoins, ces expériences nous ont confortés dans l'idée qu'un modèle cellulaire serait plus approprié. En effet, le PAMPA-BBB ne permet d'évaluer que la perméabilité passive, bien que cela soit la voie principale de nombreuses molécules. Cette voie ignore l'impact des transporteurs à efflux, ne permet pas l'étude des médicaments biologiques (peptides et protéines complexes) et encore moins des vecteurs thérapeutiques (liposomes, nanoparticules). Cependant cette étude nous a permis de valider le choix des 7 molécules ainsi que la technique d'analyse par spectrométrie de masse (5.1).

**Table 5.1** – Résumé des spécifications pour la validation de la méthode LC-MS/MS

Molécules	Verapamil	Chlorpromazine	Midazolam	Caffeine	Theophylline	Atenolol	Tenoxicam
<b>LLOD (nM)</b>	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
<b>LLOQ (nM)</b>	8	40	20	2.5	15	4	15
<b>Linearity range (nM)</b>	8-800	40-750	20-800	4-800	15-800	4-800	15-800
<b>R<sup>2</sup></b>	0.9962	0.9948	0.9970	0.9980	0.9990	0.9992	0.9984
<b>Accuracy (%)</b>							
LLOQ	107	88	112	109	115	119	115
Middle	98	113	104	90	99	102	99
ULOQ	97	97	96	104	102	101	102
<b>Precision (%)</b>							
LLOQ	4	4	2	10	5	3	6
Middle	3	4	3	2	2	2	3
ULOQ	4	5	2	2	1	3	4
<b>Selectivity (%)</b>	89	106	102	91	97	100	96
<b>Carry Over (%)</b>	15	18	13	17	17	18	19

LLOD : Plus petite limite de quantification; LLOQ : Plus petite limite de quantification; Accuracy : exactitude; Precision : précision;

### 5.3.3 Le modèle composé de cellules bEnd.3

Les cellules b.End3 sont des cellules dérivées d'endothéliome de souris [182]. Présentement, elles sont citées dans de très nombreuses publications traitant d'étude de perméabilité [183] et de nanovectorisation. Nous avons d'ailleurs utilisé un tel modèle pour l'étude de la longueur des chaînes PEG sur les capacités de transcytose de nanoparticules [184]. Faciles à manipuler, leur milieu de culture est simple et ne contient que du sérum et des antibiotiques. Les bEnd3 sont intéressantes car elles présentent les mécanismes nécessaires à l'endocytose (macropinocytose, clathrine-dépendante, induite par calveolae et clathrin/calveolae indépendante). Ces mécanismes sont essentiels pour l'étude de la vectorisation des nanoobjets (Fig 5.2 et Fig 5.3).

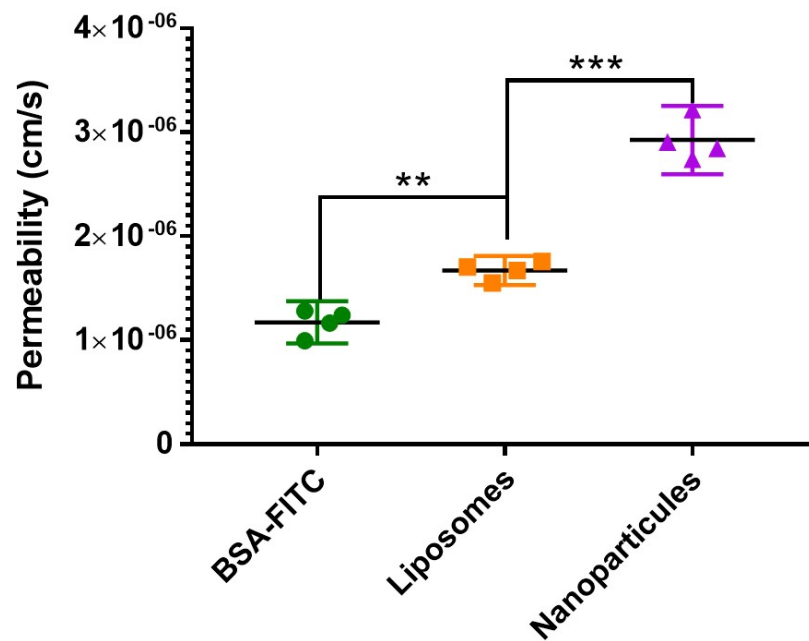
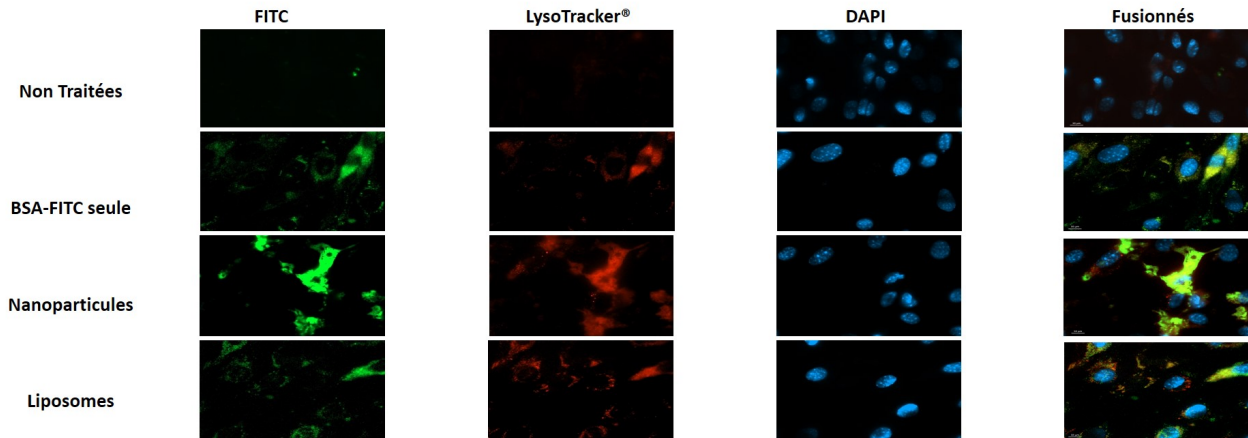


Figure 5.2 – Perméabilité de la BSA-FITC seule ou encapsulée au travers d'une monocouche de bEnd.3.

Le test de perméabilité est réalisé sur 22 h. Liposomes composés de cholestérol et de DSPE PEG-2000. Les nanoparticules sont composées d'acide hyaluronique, de TPP et de Triosan®. \*\* : P-valeur < 0.01 ; \*\*\* : P-valeur < 0.001. ANOVA unidirectionnelle avec un test post-hoc de Tukey.



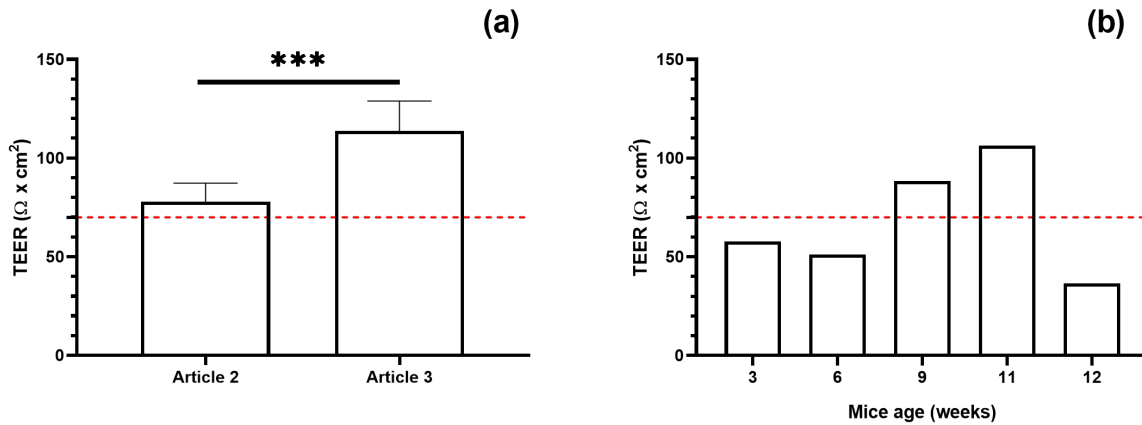
**Figure 5.3 – Internalisation par les bEnd.3 de la BSA-FITC seule ou encapsulée.**

Le test d'internalisation est réalisé sur 22 h. Liposomes composés de cholestérol et de DSPE PEG-2000. Les nanoparticules sont composées d'acide hyaluronique, de TPP et de Triosan®. BSA-FITC (FITC, vert), lysozyme (LysoTrackerD99®, rouge), noyau (DAPI, bleu). La colocalisation de la BSA-FITC et des lysosomes est en jaune. Microscopie à fluorescence x63, échelle 10  $\mu m$ .

Les nanoobjets semblent être en mesure de transporter un plus grand nombre de BSA-FITC au travers de la monocouche de bEnd.3 comparé à la BSA-FITC seule (Fig 5.2). Cette observation est également liée à une plus grande quantité de BSA-FITC présente dans les cellules lorsqu'elle est transportée par les nanoobjets (Fig 5.3). Ces résultats préliminaires indiqueraient que les bEnd.3 possèdent les mécanismes d'endocytose nécessaires à la perméabilité des nanoobjets. Néanmoins, les voies empruntées par les nanoobjets n'interviennent pas dans la perméabilité des petites molécules. Malgré une TEER faible se traduisant par la sous-expression de nombreuses jonctions serrées et transporteurs dont la P-gp, les bEnd.3 peuvent être utilisés dans des études mécanistiques.

### 5.3.4 Le modèle composé de cellules endothéliales primaires

Les cellules endothéliales primaires peuvent être obtenues en 7 jours d'enrichissement, après une isolation des capillaires du cerveau en moins d'une journée. Les ECs peuvent former un modèle étanche, exprimant les jonctions majeures de la BHE, les transporteurs d'influx d'intérêt et ils prédisent environ 75 % de la perméabilité des petites molécules *in vivo* (Fig 3.5-c). Cependant, la variation entre chaque isolation n'est pas négligeable. Par exemple la TEER moyenne des expériences de l'article 2 (Chapitre 3) est 1,5 fois moins élevée que celle de l'article 3 (Fig 5.4-a).



**Figure 5.4 – TEER pour différents modèles de la BHE composée d'ECs.**

(a) Moyenne des TEER pour les expériences réalisées dans l'article 2 ([Chapitre 3](#)) et dans l'article 3 ([Chapitre 4](#)) ( $n \geq 12$ ). (b) Comparaison préliminaire des TEER selon l'âge des animaux utilisées pour former le modèle de BHE ( $n = 1$ ).

Cette observation nous a conduit à nous interroger sur les différents facteurs pouvant influencer la TEER du modèle. Dans un premier temps, l'âge des souris a été avancé comme cause possible de ces différences ([Fig 5.4-b](#)). Comme nous l'avons déjà évoqué, les ECs ne sont pas matures lorsque les souris naissent mais le deviennent progressivement pendant la croissance de l'animal vers l'âge adulte [171]. Comme constaté sur la [Fig 5.4-b](#) il semblerait que les cellules isolées avec des souris plus âgées forment des monocouches avec une TEER supérieure. Ces résultats nécessiteraient toutefois d'être reproduits pour confirmer cette tendance. Nous avons ensuite envisagé que le volume des différents compartiments pouvait être partiellement responsable de la variabilité observée. Toutefois, les résultats de nos divers essais ([Fig S4.1](#)) n'impliquent pas de changement significatif. Le fait de ne pas changer de milieu avant l'expérience de perméabilité peut cependant induire une diminution de la TEER ([Fig S4.3](#)). Le dernier élément qui pourrait influencer les variations de TEER serait la composition du milieu. L'élément le plus variable est le sérum fœtal bovin qui ne provient jamais du même lot entre les isolations. Il serait intéressant d'évaluer son impact sur des cellules aussi sensibles que les ECs primaires. L'impact de l'expérimentateur semble peu probable sur les caractéristiques intrinsèques (TEER, perméabilité et expressions des transporteurs) des ECs. Cependant, si l'expérimentateur est moins expérimenté dans la réalisation du protocole cela entraîne une grande variation dans le rendement final. Maîtriser au mieux les divers paramètres du modèle est crucial pour garantir la reproductibilité de ce dernier. Néanmoins, les variations de TEER ne semblent pas avoir d'impact sur le passage des molécules que nous avons étudiées. Ainsi on ne trouve pas de différence significative entre les résultats de perméabilité des molécules thérapeu-

tiques des article 2 et 3 ([Chapitre 3](#) et [Chapitre 4](#), [Table S4.5](#)).

À notre connaissance, notre étude est la première à réaliser une corrélation *in vitro/ in vivo* d'un modèle de souris. Nakagawa *et al.* [185] ont réalisé une IVIVC chez le rat et ils ont obtenu une corrélation de 0,89, mais en utilisant un modèle complexe composé des trois types cellulaires. Notre étude obtient des résultats proches en termes de corrélation ( $R^2 = 0,76$ ) pour une méthode plus simple et rapide à mettre en place. Cependant, il est intéressant de noter que les résultats *in vivo* qu'ils obtiennent sont comparables à nos données *in vivo* chez la souris pour les trois molécules que nous avons en commun (caféine, vérapamil, aténolol).

## 5.4 Le modèle pathologique

### 5.4.1 Les limites de notre modèle pathologique

Les maladies neuro-inflammatoires sont associées en général à l'inflammation chronique (voir [1.3](#)). L'inflammation chronique est caractérisée par une quantité de cytokines supérieure par rapport à la normale et cela sur une période de temps prolongée. Dans notre étude, l'inflammation est ponctuelle (une seule dose de cytokine sur 24 h) et peut donc être considéré comme aiguë. Cependant certaines études observent *in vitro* des changements induits par les cytokines après 1 h et 6 h de traitement (voir [1.3.2](#)). Dans l'étude ([Chapitre 4](#)) l'utilisation des cytokines, dans les conditions testées, produit des effets comparables à ce qui a pu être observé dans certaines pathologies (voir [1.3.2](#)). Cette association entre cytokine et pathologie est à relativiser car elle est majoritairement qualitative. De plus, l'origine de la production des cytokines et l'évolution de leur concentration n'est pas encore connue [109, 108, 119]. En effet, une théorie récente basée sur l'âge impliquerait directement les cellules endothéliales sénescents comme source principale de la production de cytokines telle que l'IL1- $\beta$  ou le TNF- $\alpha$  [109]. Dans ces conditions, il est difficile d'associer clairement l'effet d'une cytokine observée *in vitro* à une pathologie. Cependant, étudier les effets des cytokines sur les ECs reste un bon moyen de faire progresser nos connaissances. Malgré que les molécules pro-inflammatoires produisent des effets mesurables sur les ECs ces effets ne se traduisent pas par davantage de perméabilité pour toutes les petites molécules pharmaceutiques ([Chapitre 4](#)).

Néanmoins, la modélisation *in vitro* de la BHE permet l'étude simplifiée de l'effet de cytokines pro-inflammatoires localement sur les ECs. En effet, *in vivo*, l'administration systémique d'éléments induisant l'inflammation génèrera une inflammation généralisée peu propice à l'étude de la perméabilité au travers de la BHE. De plus, les méthodes d'infusion ou de mesure de l'index cérébral d'absorption (*Brain uptake index*, BUI) nécessitent un délai court entre l'injection et l'échantillonnage, qui ne laisse que peu de temps à la cytokine d'agir. Cependant, le LPS est la molécule



retenue *in vivo* pour induire l'inflammation de la BHE. Par exemple, Banks *et al.* ont démontré qu'une seule dose de LPS injectée à 3 mg/kg permettait d'induire des changements de perméabilité 24 h post injection *in vivo* [186]. Le choix de la cytokine peut également influencer sur l'état final de la monocouche d'ECs comme nous l'avons vu précédemment (voir 1.3.2). Mais un paramètre tout aussi important est la concentration à laquelle la molécule est utilisée [187, 119]. Malgré les conditions restreintes (concentration, temps d'expositions, méthodes de caractérisations) étudiées dans le Chapitre 4 le modèle composé d'ECs primaires présente néanmoins les caractéristiques d'une BHE inflammée (voir 1.3.2). De plus ce modèle de BHE inflammé peut être utilisé pour mesurer la perméabilité de petites molécules.

Dans leur étude, Lu *et al.* concluent que l'inflammation de la BHE avait un impact sur la perméabilité des petites molécules mais cet effet est modeste, complexe et dépendant de la molécule testée [143]. Nous tendons ici à la même conclusion mais nous apportons de nouvelles pistes d'investigations. Il semblerait que seules les molécules avec une faible perméabilité soient impactées par l'inflammation de la BHE. Nos résultats tendent à démontrer que c'est par la combinaison de la réduction des jonctions et des transporteurs que la perméabilité des molécules augmente. Ces résultats sont à confirmer mais ils pourraient être une explication de certains résultats *in vivo* qui ne présentent pas de différence majeure entre le modèle naïf et pathologique (voir 1.3.3).

#### 5.4.2 Les limitations de notre étude sur l'inflammation

Ces travaux de recherche ont permis de confirmer que le modèle de BHE développé était pertinent pour étudier l'inflammation. Néanmoins, les ECs étant des cellules polarisés (1.2.3), tester l'inflammation via le compartiment basolatéral pourrait avoir un effet différent. Cette méthode permettrait de simuler les pathologies neuro-inflammatoires (1.3) et ainsi mimer l'impact de l'inflammation produit par le SNC sur les ECs. Dans le cas du LPS traité, les cellules du côté basolatéral entraînent une sécrétion d'IL-6 du côté luminal [114]. Cependant, il semblerait que le modèle ne puisse pas être généralisé à toutes les petites molécules. En effet, on ne constate pas d'effet commun, comme une augmentation de la perméabilité, pour toutes les molécules testées (Chapitre 4). La concentration en cytokine et la durée d'exposition pourraient également avoir un impact sur les résultats observés. Dans ce modèle, l'inflammation est réalisée sur seulement 24h, à une concentration relativement élevée. Le fait de diminuer, de répéter et de prolonger la durée d'exposition des cytokines pourrait induire des changements différents dans les caractéristiques de notre modèle de BHE. Ces changements dans le modèle pourraient, par exemple, apparaître lorsque les mécanismes de réparation sont épuisés (voir 1.3). Pour l'instant, dans les conditions évaluées, on ne voit pas de différence pour les molécules qui sont déjà très perméables. Cependant, l'expression d'ARN codant pour la P-gp est diminuée mais la perméabilité du vérapamil, qui est substrat de ce transporteur, n'en est pas impactée (Fig 4.3). La confirmation de cette diminution de l'expression de l'ARN codant pour

la P-gp devrait également être confirmée par western blot. Si l'expression d'ARN de la P-gp était confirmée, la quantité d'ARN ne corrèlerait donc pas directement avec le nombre de protéines ou tout changement de sa fonctionnalité. La quantification réelle du nombre de P-gp nous permettrait de le vérifier. Cette observation pourrait faire l'objet de travaux futurs sur le modèle. De plus, cette exploration systématique devrait être étendue au minimum à tous les transporteurs obligatoires devant être vérifiée selon les agences américaine et européenne du médicament (voir section 1.2.3).

Un autre point est que l'activation des microglies conduit à la sécrétion de cytokines ainsi que d'autres facteurs (voir les sections : 1.2.4.1, 1.3). Il faudrait vérifier que le modèle ne soit pas influencé par la présence des 6 % de microglies dans la culture (Fig S2.2). En effet, les microglies ayant pour effet d'induire une réponse robuste de l'inflammation et comme cette sous-population de la culture n'est pas contrôlée, les résultats observés pourraient être un artefact. Pour vérifier ce point, il faudrait réaliser un tri cellulaire et s'assurer que dans une culture pure d'ECs les effets observés dans l'étude (Chapitre 4) sont comparables. Une autre limitation de l'étude sur l'inflammation est que l'exploitation de l'ensemble des résultats de séquençage n'a pas été réalisé. Ces résultats permettraient sans doute de mettre en évidence de nouveaux mécanismes et protéines intervenant dans l'étanchéité de la BHE. De plus, les résultats de séquençage ont été obtenue sur seulement 3 échantillons biologiques. Un plus grand nombre d'échantillons permettrait de limiter les biais et d'augmenter la puissance statistique de l'expression différentielle des gènes. De plus, le séquençage a été réalisé avec l'utilisation de séquences à une seule (*single-end*) extrémité, comparativement aux séquences aux deux extrémités (*paired-end*), qui est connue pour augmenter l'incertitude sur les résultats d'expressions différentielles des gènes [188]. La dernière limitation est que le séquençage ARN ne nous renseigne pas sur la quantité réelle de protéines dans les cellules ou les modifications post-traductionnelles qu'elles pourraient subir. Ce qui limite grandement l'interprétation direct des données de séquençages sur les résultats de perméabilité de molécules. Une méthode quantitative tel que la spectrométrie de masse serait plus appropriée pour compléter les résultats et améliorer la finesse de l'interprétation qui en sont faites.

Finalement, l'étude de la perméabilité ne doit pas se limiter aux petites molécules. Il faudrait également que le modèle pathologique proposé soit également caractérisé pour ces mécanismes de transcytoses, par exemple les récepteurs impliqués dans la perméabilité de protéines (peptides et anticorps).

## 5.5 Perspectives futures

On notera que les travaux réalisés lors de ce travail doctoral s'appuient majoritairement sur des résultats qualitatifs (microscopie, TEER, perméabilité) et semi-quantitatif (q-PCR) pour tout ce qui concerne la présence des jonctions et des transporteurs. De plus, les récepteurs ne sont pas

abordés dans nos travaux car ils n'interviennent pas dans la perméabilité des petites molécules. Une des faiblesses dans nos études est donc le manque de quantification des protéines par des méthodes telles que le FACS, l'immunobuvardage (*western blot*) ou la spectrométrie de masse. La reproductibilité des isolations et des constructions du modèle est également un enjeu majeur pour assurer la qualité des résultats obtenus. Elle doit être atteinte à deux niveaux :

- Premièrement, dans les paramètres de base de construction du modèle, c'est-à-dire que la TEER et la perméabilité des marqueurs de références (Na-Fluorescéine, FITC-Dextran) doivent être constantes.
- Deuxièmement, les propriétés biologiques des cellules isolées doivent pouvoir être normalisées pour tenir compte des différences d'expressions en jonctions, transporteurs et récepteurs.

De plus, l'utilisation d'un nombre restreint de petites molécules, choisies judicieusement pour représenter un large spectre, est un bon début dans le développement du modèle. Cependant, le modèle de BHE gagnerait en fiabilité s'il était utilisé pour tester davantage de molécules. Néanmoins, le modèle présenté dans cette thèse possède déjà un éventail de caractéristiques intéressant qui pourra être utilisé pour d'autres applications.

### 5.5.1 Consolider la reproductibilité du modèle

Nous avons vu que le modèle comportait de possibles variations dans l'expression des jonctions, transporteurs et récepteurs d'une expérience à l'autre. Dans un premier temps, ces variations devront être confirmées en explorant la variabilité entre différentes isolations. Une fois les variations confirmées, et si possible quantifiées afin d'en évaluer l'impact et la significativité, nous pourrions mettre en place des méthodes pour normaliser les variations produites par les isolations.

La première méthode, très pratique, qui pourrait être mise en place dans les expériences de perméabilité est l'utilisation systématique d'un marqueur paracellulaire. Ce marqueur serait utilisé dans le même puits que la molécule testée. Il ne devrait pas interagir avec un quelconque mécanisme de perméabilité connue. Un tel marqueur pourrait être la fluorescéine sodique. Cette molécule de  $376 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$  est capable de passer entre les cellules (voie paracellulaire, Fig 1.8). La valeur de perméabilité de cette molécule permettrait de normaliser les résultats de perméabilité et d'éliminer les variations entre les expériences dues, par exemple, à de légères différences dans l'étanchéité du modèle. Il faudrait cependant vérifier que l'ajout de ces étapes dans le protocole de perméabilité n'induit pas plus de variabilités et permet de corriger effectivement les résultats. Le contrôle serait une réduction de la variabilité par comparaison des écarts-types.

La deuxième moyen serait l'emploi de la spectrométrie de masse (MS) pour la quantification des jonctions, transporteurs et des récepteurs. Les dernières avancées technologiques et méthodologiques

de cette technique analytique, telle que la quantification par temps de vol (*quantitative time of flight*, Q-ToF), permettent une identification extrêmement précise des protéines. Développer une méthode qui permettrait de relier quantité de protéines et un nombre de cellules ou de protéines totales permettrait d'apprécier les variations de quantité en protéines d'intérêt entre les différentes expériences d'isolations d'ECs. À la suite de l'expérience de perméabilité, les cellules sur les filtres seraient récoltées, lysées puis les protéines séparées des autres débris cellulaires. Une simple quantification par la méthode de Bradford nous donnerait la quantité totale de protéines. Les échantillons préparés seraient injectés dans le MS. À l'aide de courbe de calibration, nous pourrions ainsi quantifier les protéines d'intérêts [189]. Pour chaque mesure de perméabilité, nous aurions le profil protéomique des cellules utilisées. Nous pourrions également corrélérer l'expression des protéines et les valeurs de perméabilité. Dans leur étude, Houfu *et al.* observent une corrélation, en moyenne supérieure à 0,8, entre la quantité de BCRP et le ratio d'efflux de plusieurs molécules substrats de la protéine. De plus, leurs études mettent en évidence l'importance de corriger la perméabilité par l'expression du transporteur afin de prédire plus précisément la distribution *in vivo* des molécules testées [190]. De plus, cela pourrait également permettre d'identifier certains changements post-traductionnels tels que la méthylation, l'acétylation, la phosphorylation, la glycosylation et la désamination [191]. Ces changements seraient également, si ce n'est plus, profitables dans l'utilisation du modèle inflammé.

### 5.5.2 Étendre l'utilisation du modèle

Dans un premier temps, pour améliorer notre compréhension générale du modèle de BHE développé dans des conditions saines et pathologiques le nombre de molécules thérapeutiques testées devrait être augmenté. Cette augmentation permettrait de mettre en évidence des molécules ne corrélant pas avec les observations *in vivo*. Ces valeurs aberrantes permettraient la mise en évidence de possibles limitations ou biais du modèle *in vitro* qui pourrait être amélioré ou alors prises pour acquises. Concernant le modèle pathologique, l'augmentation du nombre de molécules testées permettrait plutôt d'évaluer si certaines classes de molécules sont plus susceptibles d'être impactées par une barrière inflammée.

Dans un second temps, la vocation première du modèle est d'améliorer la prédiction de la perméabilité *in vivo* afin de minimiser de potentiels échecs dans le développement du médicament. Le modèle devrait donc être évalué avec des molécules nouvellement créées. Ces expériences démontreraient comment l'intégration d'un tel modèle pourrait atteindre les objectifs recherchés dans le développement de médicaments.

Dans un troisième temps, la suite logique serait d'évaluer et de valider le modèle pour l'étude de vecteurs thérapeutiques. Deux formes de vectorisations sont principalement développées dans notre équipe : les nanoparticules polymériques et les liposomes. Ces deux types de vecteurs pourraient grandement profiter du modèle BHE que nous avons développé. Cependant, le modèle nécessite-

rait ainsi de valider la présence de récepteurs induisant l'endocytose et réaliser des corrélations *in vitro/ in vivo*. Ce travail ferait suite à nos précédents travaux préliminaires réalisés sur les cellules bEnd.3 (Section 5.3.3). À l'heure actuelle, les données obtenues *in vitro* se traduisent très mal en prédiction *in vivo*. De plus, Jain *et al.* soulignent l'importance que les méthodes *in vitro* utilisées soient physiologiquement pertinentes [192]. A notre connaissance, il n'y a pas d'étude présentant un modèle validé pour les vecteurs par une corrélation *in vitro/ in vivo*.

Finalement, l'étude des médicaments biologiques pourrait être envisagée si l'on démontre que l'isolation des cellules endothéliales et la formation du modèle de BHE permettent toujours l'expression de récepteurs ou de transporteurs chimériques. En effet, les anticorps ne peuvent pas être étudiés dans une autre espèce puisqu'ils sont développés directement pour la cible humaine. Une possibilité est de faire exprimer à l'animal ou aux cellules le récepteur d'intérêt humain.



# Chapitre 6

## Conclusion

Dans ce travail doctoral, nous nous sommes intéressés aux modèles permettant de prédire la perméabilité de petites molécules thérapeutiques au travers de la barrière sang-cerveau. Notre hypothèse a été confirmée en plusieurs points. Nous avons pu développer un modèle *in vitro* de la BBB composée de cellules endothéliales primaires. Ce modèle a été validé par une corrélation *in vitro/in vivo* pour sa capacité à prédire la perméabilité de médicaments chez la souris. Enfin, le modèle de BHE nous a donné la possibilité d'étudier, dans différentes conditions, plusieurs des jonctions et des transporteurs impliqués dans la perméabilité de petites molécules thérapeutiques.

Notre premier objectif a été partiellement atteint, car nous n'avons pas pu produire un seul protocole d'isolation regroupant les trois types cellulaires. Cependant, les protocoles présentés dans ce travail doctoral offrent un très haut rendement d'isolation, à moindre coût, produisant des cultures très pures. De même toutes les informations nécessaires pour la comparaison de l'efficacité et la qualité d'isolation entre les protocoles sont fournies, ce qui constitue une amélioration notable par rapport à ce qui est déjà publié. De plus, des caractérisations des fonctionnalités des trois types cellulaires majeurs de la BHE ont été réalisées.

Notre deuxième objectif a été complètement atteint. En effet, nous avons produit un modèle de BHE composé d'ECs démontrant une forte valeur ajoutée pour prédire la perméabilité de médicament *in vivo*. La validation du modèle est le résultat d'une corrélation *in vitro/in vivo* réalisée chez la souris. La forte valeur ajoutée de notre modèle de BHE produit a été obtenue en le comparant aux modèles composés de cellules immortalisées ou seulement formés d'un revêtement de lipides.

Dans notre dernier objectif, nous avons été en mesure d'utiliser le modèle de BHE précédemment validé pour l'étude de la perméabilité dans des conditions d'inflammation. En effet, les ECs de notre modèle réagissent à différentes molécules pro-inflammatoires. Ce système présente alors des caractéristiques similaires aux pathologies associées à la BHE. Cela nous a également permis de mettre en évidence de potentiels mécanismes impactés par l'inflammation de la BHE.

Le modèle de barrière hémato-encéphalique développé durant cette thèse pourrait avoir de nombreuses applications dans le développement de nouveaux vecteurs et molécules destinés au système

nerveux central. D'un point de vue fondamental, ce modèle, simple et polyvalent, pourrait contribuer à améliorer nos connaissances de la BHE et cela dans des conditions saines, mais également pathologiques.



# Bibliographie

- [1] R. Daneman and A. Prat. The Blood-Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(1), 2015. ISSN 1943-0264. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412> .
- [2] N. J. Abbott, L. Rönnbäck, and E. Hansson. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1) :41–53, 2006. ISSN 1471-0048. <https://doi.org/10.1038/nrn1824> .
- [3] M. V. Sofroniew and H. V. Vinters. Astrocytes : biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1) :7–35, 2010. ISSN 1432-0533. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0619-8> .
- [4] S. A. Liddelow. Fluids and barriers of the cns : a historical viewpoint. *Fluids and Barriers of the CNS*, 8(1) :2, 2011. ISSN 2045-8118. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-8-2> .
- [5] P. Stewart and M. Wiley. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells : a study using quail-chick transplantation chimeras. *J Developmental biology*, 84(1) :183–192, 1981. ISSN 0012-1606. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(81\)90382-1](https://doi.org/10.1016/0012-1606(81)90382-1) .
- [6] L. L. Rubin and J. M. Staddon. THE CELL BIOLOGY OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER. 22(1) :11–28, 1999. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.22.1.11> .
- [7] D. A. Volpe. Transporter assays as useful in vitro tools in drug discovery and development. *Expert Opinion on Drug Discovery*, pages 1–13, 2015. ISSN 1746-0441. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1101064> .
- [8] J. Cervos-Navarro, S. Kannuki, and Y. Nakagawa. Blood-brain barrier (Bbb). Review from morphological aspect. *Histology and histopathology*, 1988. ISSN 0213-3911.
- [9] T. Tilling, C. Engelbertz, S. Decker, *et al.* Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures. *Cell and Tissue Research*, 310(1) :19–29, 2002. ISSN 0302-766X. <https://doi.org/10.1007/s00441-002-0604-1> .

- [10] R. Daneman. The blood-brain barrier in health and disease. *Ann Neurol*, 72(5) :648–72, 2012. ISSN 1531-8249. <https://doi.org/10.1002/ana.23648> .
- [11] N. J. Abbott. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for cns drug delivery. *J Inherit Metab Dis*, 36(3) :437–49, 2013. ISSN 1573-2665 (Electronic) 0141-8955 (Linking). <https://doi.org/10.1007/s10545-013-9608-0> .
- [12] A. V. Molofsky and B. Deneen. Astrocyte development : A guide for the Perplexed. *Glia*, 63(8) :1320–1329, 2015. ISSN 0894-1491. <https://doi.org/10.1002/glia.22836> .
- [13] R. Koehler, D. Gebremedhin, and D. Harder. Role of astrocytes in cerebrovascular regulation. *J Appl Physiol*, 100 :307 – 317, 2006. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00938.2005> .
- [14] S. F. Rodrigues and D. N. Granger. Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers*, 3(1-2) :e978720, 2015. ISSN null. <https://doi.org/10.4161/21688370.2014.978720> .
- [15] G. S. P. Santos, L. A. V. Magno, M. A. Romano-Silva, *et al.* Pericyte Plasticity in the Brain. *Neuroscience Bulletin*, 35(3) :551–560, 2019. ISSN 1995-8218. <https://doi.org/10.1007/s12264-018-0296-5> .
- [16] N. Hamilton, D. Attwell, and C. Hall. Pericyte-mediated regulation of capillary diameter : a component of neurovascular coupling in health and disease. 2(5), 2010. ISSN 1662-6427. <https://doi.org/10.3389/fnene.2010.00005> .
- [17] S. Wang, M. B. Voisin, K. Y. Larbi, *et al.* Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J Exp Med*, 203(6) :1519–32, 2006. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007. <https://doi.org/10.1084/jem.20051210> .
- [18] M. D. Sweeney, S. Ayyadurai, and B. V. Zlokovic. Pericytes of the neurovascular unit : key functions and signaling pathways. *Nature neuroscience*, 19(6) :771–783, 2016. ISSN 1546-1726 1097-6256. <https://doi.org/10.1038/nn.4288> .
- [19] A. Bhowmik, R. Khan, and M. K. Ghosh. Blood Brain Barrier : A challenge for Effective Therapy of Brain Tumors. *BioMed Research International*, 2015 :20, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/320941> .
- [20] A. S. Kesselheim, T. J. Hwang, and J. M. Franklin. Two decades of new drug development for central nervous system disorders. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(12) :815–816, 2015. ISSN 1474-1784. <https://doi.org/10.1038/nrd4793> .

- [21] A. Domínguez, A. Álvarez, E. Hilario, *et al.* Central nervous system diseases and the role of the blood-brain barrier in their treatment. *Neuroscience Discovery*, 1(1), 2013. ISSN 2052-6946. <https://doi.org/10.7243/2052-6946-1-3> .
- [22] . C. N. R. Riordan, H. J. The Death of Cns Drug Development : Overstatement or Omen ? *Journal for Clinical Studies*, 3(6) :12–15, 2011.
- [23] E. C. M. de Lange, W. van den Brink, Y. Yamamoto, *et al.* Novel Cns drug discovery and development approach : model-based integration to predict neuro-pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(12) :1207–1218, 2017. ISSN 1746-0441. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1380623> .
- [24] W. M. Pardridge. The blood-brain barrier : Bottleneck in brain drug development. *NeuroRX*, 2(1) :3–14, 2005. ISSN 1545-5343. <https://doi.org/10.1602/neurorx.2.1.3> .
- [25] E. E. Goldmann. Die aussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Liche der" vitalen Farbung". *J Beitr. Klin. Chir.*, 64 :192–265, 1909.
- [26] G. B. Wislocki. Experimental studies on fetal absorption. *J Contrib. Embryol*, 11 :47–60, 1920.
- [27] N. R. Saunders, J. J. Dreifuss, K. Dziegielewska, *et al.* The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies : a walk through 100 years of history. *Frontiers in Neuroscience*, 8(404) :26, 2014. ISSN 1662-453X. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00404> .
- [28] P. Ehrlich. The relationship existing between chemical constitution, distribution, and pharmacological action. *J The collected papers of Paul Ehrlich*, pages 596–618, 1956.
- [29] L. Stern and R. Gautier. II. –Les Rapports Entre Le Liquide Céphalo-Rachidien Et Les éléments Nerveux De L'axe Cerebrospinal. *Archives Internationales de Physiologie*, 17(4) :391–448, 1922. ISSN 0301-4541. <https://doi.org/10.3109/13813452209146219> .
- [30] Y. Sharif, F. Jumah, L. Coplan, *et al.* Blood brain barrier : A review of its anatomy and physiology in health and disease. *Clin Anat*, 31(6) :812–823, 2018. ISSN 0897-3806. <https://doi.org/10.1002/ca.23083> .
- [31] L. Stern. A propos de la method d'investigation du fonctionnement de la barrière hémato-encéphalique. *CR Soc. Biol*, 115 :1059–1061, 1934.
- [32] T. Reese and M. J. Karnovsky. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J The Journal of cell biology*, 34(1) :207–217, 1967. ISSN 1540-8140. <https://doi.org/10.1083/jcb.34.1.207> .

- [33] B. Zhou, Y.-X. Zuo, and R.-T. Jiang. Astrocyte morphology : Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 25(6) :665–673, 2019. ISSN 1755-5930. <https://doi.org/10.1111/cns.13123> .
- [34] H. S. Domingues, C. C. Portugal, R. Socodato, *et al.* Oligodendrocyte, Astrocyte, and Microglia Crosstalk in Myelin Development, Damage, and Repair. 4(71), 2016. ISSN 2296-634X. <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00071> .
- [35] B. S. Khakh and B. Deneen. The Emerging Nature of Astrocyte Diversity. *Annual Review of Neuroscience*, 42(1) :187–207, 2019. ISSN 0147-006X. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050443> .
- [36] Y. Bernardinelli, J. Randall, E. Janett, *et al.* Activity-Dependent Structural Plasticity of Perisynaptic Astrocytic Domains Promotes Excitatory Synapse Stability. *Current Biology*, 24(15) :1679–1688, 2014. ISSN 0960-9822. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.06.025> .
- [37] K. T. Baldwin and C. Eroglu. Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology*, 45 :113–120, 2017. ISSN 0959-4388. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.05.006> .
- [38] E. Boué-Grabot and Y. J. N. p. Pankratov. Modulation of central synapses by astrocyte-released Atp and postsynaptic P2x receptors. 2017, 2017. ISSN 2090-5904. <https://doi.org/10.1155/2017/9454275> .
- [39] U. H. Langen, S. Ayloo, and C. Gu. Development and Cell Biology of the Blood-Brain Barrier. 35(1) :591–613, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100617-062608> .
- [40] J. I. Alvarez, A. Dodelet-Devillers, H. Kebir, *et al.* The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and Cns immune quiescence. *Science*, 334(6063) :1727–31, 2011. ISSN 1095-9203 (Electronic) 0036-8075 (Linking). <https://doi.org/10.1126/science.1206936> .
- [41] Y. Yao, Z.-L. Chen, E. H. Norris, *et al.* Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nature Communications*, 5(1) :3413, 2014. ISSN 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/ncomms4413> .
- [42] H. M. Shein, A. Britva, H. H. Hess, *et al.* Isolation of hamster brain astroglia byin vitro cultivation and subcutaneous growth, and content of cerebroside, ganglioside, Rna and Dna. *Brain Research*, 19(3) :497–501, 1970. ISSN 0006-8993. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(70\)90394-X](https://doi.org/10.1016/0006-8993(70)90394-X) .

- [43] D. G. Souza, B. Bellaver, D. O. Souza, *et al.* Characterization of Adult Rat Astrocyte Cultures. *PLoS ONE*, 8(3) :e60282, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060282> .
- [44] X. Sun, X. Hu, D. Wang, *et al.* Establishment and characterization of primary astrocyte culture from adult mouse brain. *Brain Research Bulletin*, 132 :10–19, 2017. ISSN 0361-9230. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2017.05.002> .
- [45] R. G. Giffard and Y. B. Ouyang. *Cell Culture : Primary Neural Cells*, pages 633–637. Academic Press, Oxford, 2009. ISBN 978-0-08-045046-9. <https://doi.org/10.1016/B978-008045046-9.00867-6> .
- [46] M. Jana, A. Jana, U. Pal, *et al.* A simplified Method for Isolating Highly Purified Neurons, Oligodendrocytes, Astrocytes, and Microglia from the Same Human Fetal Brain Tissue. *Neurochemical Research*, 32(12) :2015–2022, 2007. ISSN 1573-6903. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9340-y> .
- [47] M. Deli, C. Ábrahám, Y. Kataoka, *et al.* Permeability Studies on In Vitro Blood–Brain Barrier Models : Physiology, Pathology, and Pharmacology. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 25(1) :59–127, 2005. ISSN 0272-4340. <https://doi.org/10.1007/s10571-004-1377-8> .
- [48] M. Jungblut, M. C. Tiveron, S. Barral, *et al.* Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GlSt-specific monoclonal antibody AcsA-1. *Glia*, 60(6) :894–907, 2012. ISSN 1098-1136. <https://doi.org/10.1002/glia.22322> .
- [49] A. V. Molofsky, R. Krencik, E. M. Ullian, *et al.* Astrocytes and disease : a neurodevelopmental perspective. *Genes & development*, 26(9) :891–907, 2012. ISSN 1549-5477 0890-9369. <https://doi.org/10.1101/gad.188326.112> .
- [50] P. Dore-Duffy and K. Cleary. Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol Biol*, 686 :49–68, 2011. ISSN 1940-6029 (Electronic) 1064-3745 (Linking). [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-938-3_2) .
- [51] E. A. Winkler, R. D. Bell, and B. V. Zlokovic. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat Neurosci*, 14(11) :1398–1405, 2011. ISSN 1097-6256. <https://doi.org/10.1038/nn.2946> .
- [52] T. Nakagomi, S. Kubo, A. Nakano-Doi, *et al.* Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells. *Stem Cells*, 33(6) :1962–74, 2015. ISSN 1066-5099. <https://doi.org/10.1002/stem.1977> .

- [53] R. K. Mittapalli, C. E. Adkins, K. A. Bohn, *et al.* Quantitative fluorescence microscopy measures vascular pore size in primary and metastatic brain tumors. *Cancer Res*, 77, 2017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-16-1711> .
- [54] S. M. Buzney, R. N. Frank, and W. G. Robison. Retinal capillaries : proliferation of mural cells in vitro. *Science*, 190(4218) :985, 1975. <https://doi.org/10.1126/science.810891> .
- [55] R. Balabanov, R. Washington, J. Wagnerova, *et al.* CNs Microvascular Pericytes Express Macrophage-like Function, Cell Surface Integrin  $\alpha$  M, and Macrophage Marker Ed-2. *Microvascular Research*, 52(2) :127–142, 1996. ISSN 0026-2862. <https://doi.org/10.1006/mvre.1996.0049> .
- [56] P. Dore-Duffy. *Isolation and Characterization of Cerebral Microvascular Pericytes*, pages 375–382. Humana Press, Totowa, NJ, 2003. ISBN 978-1-59259-419-1. <https://doi.org/10.1385/1-59259-419-0:375> .
- [57] U. Tigges, J. V. Welser-Alves, A. Boroujerdi, *et al.* A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvascular Research*, 84(1) :74–80, 2012. ISSN 0026-2862. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.03.008> .
- [58] J. Xu, T. Gong, B. C. Heng, *et al.* A systematic review : differentiation of stem cells into functional pericytes. 31(5) :1775–1786, 2017. <https://doi.org/10.1096/fj.201600951RRR> .
- [59] S. Saraswati, S. M. W. Marrow, L. A. Watch, *et al.* Identification of a pro-angiogenic functional role for Fsp1-positive fibroblast subtype in wound healing. *Nature Communications*, 10(1) :3027, 2019. ISSN 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10965-9> .
- [60] B. V. Zlokovic. The blood–brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*, 57, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.01.003> .
- [61] V. M. Pulgar. Transcytosis to Cross the Blood Brain Barrier, New Advancements and Challenges. *Frontiers in neuroscience*, 12 :1019–1019, 2019. ISSN 1662-4548 1662-453X. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01019> .
- [62] Z. M. Qian, H. Li, H. Sun, *et al.* Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway. *Pharmacological Reviews*, 54(4) :561, 2002. <https://doi.org/10.1124/pr.54.4.561> .
- [63] L. Horonchik and M. Wessling-Resnick. The small-molecule iron transport inhibitor ferristatin/Nsc306711 promotes degradation of the transferrin receptor. *Chemistry & biology*, 15(7) :647–653, 2008. ISSN 1074-5521 1879-1301. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.05.011> .



- [64] E. M. Rhea, C. Rask-Madsen, and W. A. Banks. Insulin transport across the blood-brain barrier can occur independently of the insulin receptor. *The Journal of physiology*, 596(19) :4753–4765, 2018. ISSN 1469-7793 0022-3751. <https://doi.org/10.1113/JP276149> .
- [65] L. Schäffer, C. L. Brand, B. F. Hansen, *et al.* A novel high-affinity peptide antagonist to the insulin receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376(2) :380–383, 2008. ISSN 0006-291X. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.08.151> .
- [66] X. Zhang, W. C. Sessa, and C. Fernández-Hernando. Endothelial Transcytosis of Lipoproteins in Atherosclerosis. *Frontiers in cardiovascular medicine*, 5 :130–130, 2018. ISSN 2297-055X. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00130> .
- [67] A. Magalhaes, I. Matias, I. Palmela, *et al.* LDL-Cholesterol Increases the Transcytosis of Molecules through Endothelial Monolayers. *PLOS ONE*, 11(10) :e0163988, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163988> .
- [68] A. Blanco and G. Blanco. *Chapter 15 - Lipid Metabolism*, pages 325–365. Academic Press, 2017. ISBN 978-0-12-803550-4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00015-X> .
- [69] A. Muruganandam, J. Tanha, S. Narang, *et al.* Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium. *The FASEB Journal*, 16(2) :1–22, 2002. ISSN 0892-6638. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0343fje> .
- [70] A. Abulrob, H. Sprong, P. V. B. En Henegouwen, *et al.* The blood–brain barrier transmigrating single domain antibody : mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *Journal of Neurochemistry*, 95(4) :1201–1214, 2005. ISSN 0022-3042. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03463.x> .
- [71] Y. A. Komarova, K. Kruse, D. Mehta, *et al.* Protein Interactions at Endothelial Junctions and Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability. *Circulation Research*, 120(1) :179–206, 2017. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.306534> .
- [72] S. M. Stamatovic, A. M. Johnson, R. F. Keep, *et al.* Junctional proteins of the blood-brain barrier : New insights into function and dysfunction. *Tissue Barriers*, 4(1) :e1154641, 2016. ISSN 2168-8362 2168-8370. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1154641> .
- [73] C. Greene, N. Hanley, and M. Campbell. Claudin-5 : gatekeeper of neurological function. *Fluids and barriers of the CNS*, 16(1) :3–3, 2019. ISSN 2045-8118. <https://doi.org/10.1186/s12987-019-0123-z> .

- [74] T. Nitta, M. Hata, S. Gotoh, *et al.* Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology*, 161(3) :653–660, 2003. ISSN 0021-9525 1540-8140. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302070> .
- [75] M. Castro Dias, C. Coisne, I. Lazarevic, *et al.* Claudin-3-deficient C57Bl/6J mice display intact brain barriers. *Scientific reports*, 9(1) :203–203, 2019. ISSN 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36731-3> .
- [76] C. Greene and M. Campbell. Tight junction modulation of the blood brain barrier : Cns delivery of small molecules. *Tissue barriers*, 4(1) :e1138017–e1138017, 2016. ISSN 2168-8362 2168-8370. <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1138017> .
- [77] N. Duong Cao, F. Nottebaum Astrid, S. Butz, *et al.* Interference With EsaM (Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule) Plus Vascular Endothelial-Cadherin Causes Immediate Lethality and Lung-Specific Blood Coagulation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 40(2) :378–393, 2020. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.119.313545> .
- [78] S. Citi. The mechanobiology of tight junctions. *Biophysical Reviews*, 11(5) :783–793, 2019. ISSN 1867-2469. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00582-7> .
- [79] S. Tietz and B. Engelhardt. Brain barriers : Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *Journal of Cell Biology*, 209(4) :493–506, 2015. ISSN 0021-9525. <https://doi.org/10.1083/jcb.201412147> .
- [80] W. Li, Z. Chen, I. Chin, *et al.* The Role of Ve-cadherin in Blood-brain Barrier Integrity Under Central Nervous System Pathological Conditions. *Current Neuropharmacology*, 16(9) :1375–1384, 2018. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180222164809> .
- [81] A. Lalatsa and A. M. Butt. *Chapter 3 - Physiology of the Blood–Brain Barrier and Mechanisms of Transport Across the BBB*, pages 49–74. Academic Press, 2018. ISBN 978-0-12-812218-1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812218-1.00003-8> .
- [82] J. R. Privratsky, D. K. Newman, and P. J. Newman. PEcaM-1 : Conflicts of interest in inflammation. *Life Sciences*, 87(3) :69–82, 2010. ISSN 0024-3205. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.06.001> .
- [83] M. De Bock, L. Leybaert, and C. Giaume. Connexin Channels at the Glio-Vascular Interface : Gatekeepers of the Brain. *Neurochemical Research*, 42(9) :2519–2536, 2017. ISSN 1573-6903. <https://doi.org/10.1007/s11064-017-2313-x> .



- [84] D. Thuringer, E. Solary, and C. Garrido. The Microvascular Gap Junction Channel : A route to Deliver MicroRnas for Neurological Disease Treatment. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10(246), 2017. ISSN 1662-5099. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00246> .
- [85] D. Dong, W. Xie, and M. Liu. Alteration of cell junctions during viral infection. *Thoracic Cancer*, 11(3) :519–525, 2020. ISSN 1759-7706. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13344> .
- [86] A. Mahringer and G. Fricker. ABC transporters at the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 12(5) :499–508, 2016. ISSN 1744-7607 (Electronic) 1742-5255 (Linking). <https://doi.org/10.1517/17425255.2016.1168804> .
- [87] K. A. Nałęcz. Solute Carriers in the Blood–Brain Barrier : Safety in Abundance. *Neurochemical Research*, pages 1–15, 2016. ISSN 1573-6903. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2030-x> .
- [88] L. Sanchez-Covarrubias, L. M. Slosky, B. J. Thompson, *et al.* Transporters at Cns Barrier Sites : Obstacles or Opportunities for Drug Delivery? *Current pharmaceutical design*, 20(10) :1422–1449, 2014. ISSN 1381-6128 1873-4286. <https://doi.org/10.2174/13816128113199990463> .
- [89] M. Mueckler and B. Thorens. The Slc2 (GluT) family of membrane transporters. *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3) :121–138, 2013. ISSN 0098-2997. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.07.001> .
- [90] E. Bloise and S. G. Matthews. *Chapter 19 - Multidrug Resistance P-Glycoprotein (P-gp), Glucocorticoids, and the Stress Response*, pages 227–241. Academic Press, 2019. ISBN 978-0-12-813146-6. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00019-9> .
- [91] K. Linnet and T. B. Ejning. A review on the impact of P-glycoprotein on the penetration of drugs into the brain. Focus on psychotropic drugs. *European Neuropsychopharmacology*, 18(3) :157–169, 2008. ISSN 0924-977X. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2007.06.003> .
- [92] M. Leopoldo, P. Nardulli, M. Contino, *et al.* An updated patent review on P-glycoprotein inhibitors (2011-2018). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 29(6) :455–461, 2019. ISSN 1354-3776. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1618273> .

- [93] D. Peña-Solórzano, S. A. Stark, B. König, *et al.* ABCg2/BcrP : Specific and Nonspecific Modulators. *Medicinal Research Reviews*, 37(5) :987–1050, 2017. ISSN 0198-6325. <https://doi.org/10.1002/med.21428> .
- [94] E. M. Agency. Guideline investigation drug interactions, 2012 [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions_en.pdf).
- [95] Food and D. Administration. In vitro drug interaction studies – cytochrome p450 enzyme- and transporter-mediated drug interactions guidance for industry, 2020 <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/vitro-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions>.
- [96] H. P. Modarres, M. Janmaleki, M. Novin, *et al.* In vitro models and systems for evaluating the dynamics of drug delivery to the healthy and diseased brain. *Journal of Controlled Release*, 273 :108–130, 2018. ISSN 0168-3659. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.024> .
- [97] N. Perrière, P. Demeuse, E. Garcia, *et al.* Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood–brain barrier-specific properties. *Journal of Neurochemistry*, 93(2) :279–289, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.03020.x> .
- [98] F. Bernard-Patrzynski, M.-A. Lécuyer, I. Puscas, *et al.* Isolation of endothelial cells, pericytes and astrocytes from mouse brain. *PLOS ONE*, 14(12) :e0226302, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226302> .
- [99] N. V. Goncharov, A. D. Nadeev, R. O. Jenkins, *et al.* Markers and Biomarkers of Endothelium : When Something Is Rotten in the State. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017 :9759735–9759735, 2017. ISSN 1942-0994 1942-0900. <https://doi.org/10.1155/2017/9759735> .
- [100] M.-J. Hannocks, J. Huppert, X. Zhang, *et al.* *The Contribution of the Extracellular Matrix to the BBB in Steady State and Inflammatory Conditions*, pages 49–60. Springer International Publishing, Cham, 2017. ISBN 978-3-319-45514-3. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45514-3\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45514-3_3) .
- [101] S. Liebner, R. M. Dijkhuizen, Y. Reiss, *et al.* Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 135(3) :311–336, 2018. ISSN 1432-0533. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1> .

- [102] A. C. C. da Fonseca, D. Matias, C. Garcia, *et al.* The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8 :362–362, 2014. ISSN 1662-5102. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00362> .
- [103] K. Haruwaka, A. Ikegami, Y. Tachibana, *et al.* Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation. *Nature Communications*, 10(1) :5816, 2019. ISSN 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13812-z> .
- [104] H. Thurgur and E. Pinteaux. Microglia in the Neurovascular Unit : Blood–Brain Barrier–microglia Interactions After Central Nervous System Disorders. *Neuroscience*, 405 :55–67, 2019. ISSN 0306-4522. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.046> .
- [105] Y. Fan, Z. Chen, J. L. Pathak, *et al.* Differential regulation of adhesion and phagocytosis of resting and activated microglia by dopamine. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(309), 2018. ISSN 1662-5102. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00309> .
- [106] H. Zeng and J. R. Sanes. Neuronal cell-type classification : challenges, opportunities and the path forward. *Nature Reviews Neuroscience*, 18(9) :530–546, 2017. ISSN 1471-0048. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.85> .
- [107] H. L. McConnell, C. N. Kersch, R. L. Woltjer, *et al.* The Translational Significance of the Neurovascular Unit. *Journal of Biological Chemistry*, 292(3) :762–770, 2017. ISSN 0021-9258. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.760215> .
- [108] S. A. Sonar and G. Lal. Blood–brain barrier and its function during inflammation and autoimmunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 103(5) :839–853, 2018. ISSN 0741-5400. <https://doi.org/10.1002/jlb.1ru1117-428r> .
- [109] S. I. Graves and D. J. Baker. Implicating endothelial cell senescence to dysfunction in the ageing and diseased brain. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 0(0) :1–9, 2020. ISSN 1742-7835. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13403> .
- [110] R. Lyck and G. Enzmann. *The Blood Brain Barrier and Inflammation*. Springer, 2017. ISBN 9783319455143. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45514-3> .
- [111] T. Kielian. Toll-like receptors in central nervous system glial inflammation and homeostasis. *Journal of neuroscience research*, 83(5) :711–730, 2006. ISSN 0360-4012 1097-4547. <https://doi.org/10.1002/jnr.20767> .
- [112] C. Farina, F. Aloisi, and E. Meinl. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*, 28(3) :138–45, 2007. ISSN 1471-4906 (Print) 1471-4906. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.01.005> .

- [113] S. Lehnardt. Innate immunity and neuroinflammation in the CNS : the role of microglia in toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*, 58(3) :253–63, 2010. ISSN 0894-1491. <https://doi.org/10.1002/glia.20928> .
- [114] W. A. Banks and M. A. Erickson. The blood–brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiology of Disease*, 37(1) :26–32, 2010. ISSN 0969-9961. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.031> .
- [115] F. Wu, L. Liu, and H. Zhou. Endothelial cell activation in central nervous system inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, 101(5) :1119–1132, 2017. ISSN 0741-5400. <https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0816-352RR> .
- [116] L. Klotz, I. Kuzmanov, S. Hucke, *et al.* B7-h1 shapes t-cell–mediated brain endothelial cell dysfunction and regional encephalitogenicity in spontaneous CNS autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(41) :E6182–E6191, 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601350113> .
- [117] C. Laroche, J. I. Alvarez, and A. Prat. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Letters*, 585(23) :3770–80, 2011. ISSN 1873-3468 (Electronic) 0014-5793 (Linking). <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.066> .
- [118] S. Liebner, R. M. Dijkhuizen, Y. Reiss, *et al.* Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathologica*, 135(3) :311–336, 2018. ISSN 1432-0533. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1> .
- [119] A. Varatharaj and I. Galea. The blood-brain barrier in systemic inflammation. *Brain, Behavior, and Immunity*, 60 :1–12, 2017. ISSN 0889-1591. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.03.010> .
- [120] B. P. Daniels and R. S. Klein. Knocking on closed doors : Host interferons dynamically regulate blood-brain barrier function during viral infections of the central nervous system. *PLoS pathogens*, 11(9) :e1005096–e1005096, 2015. ISSN 1553-7374 1553-7366. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005096> .
- [121] S. Bonney, S. Seitz, C. A. Ryan, *et al.* Gamma interferon alters junctional integrity via rho kinase, resulting in blood-brain barrier leakage in experimental viral encephalitis. *mBio*, 10(4) :e01675–19, 2019. <https://doi.org/10.1128/mBio.01675-19> .
- [122] N. N. Mehta, H. L. Teague, W. R. Swindell, *et al.* Ifn- $\gamma$  and tnf- $\alpha$  synergism may provide a link between psoriasis and inflammatory atherogenesis. *Scientific Reports*, 7(1) :13831, 2017. ISSN 2045-2322. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14365-1> .

- [123] C. A. Dinarello. Cytokines as endogenous pyrogens. *The Journal of Infectious Diseases*, 179(Supplement\_2) :S294–S304, 1999. ISSN 0022-1899. <https://doi.org/10.1086/513856> .
- [124] J. Liu, M. W. Marino, G. Wong, *et al.* Tnf is a potent anti-inflammatory cytokine in autoimmune-mediated demyelination. *Nature Medicine*, 4(1) :78–83, 1998. ISSN 1546-170X. <https://doi.org/10.1038/nm0198-078> .
- [125] K. D. Rochfort and P. M. Cummins. The blood–brain barrier endothelium : a target for pro-inflammatory cytokines. *Biochemical Society Transactions*, 43(4) :702–706, 2015. ISSN 0300-5127. <https://doi.org/10.1042/bst20140319> .
- [126] R. Cheung, V. Ravyn, L. Wang, *et al.* Signaling mechanism of hiv-1 gp120 and virion-induced il-1 $\beta$  release in primary human macrophages. *The Journal of Immunology*, 180(10) :6675–6684, 2008. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.10.6675> .
- [127] M. L. Werhane, N. D. Evangelista, A. L. Clark, *et al.* Pathological vascular and inflammatory biomarkers of acute- and chronic-phase traumatic brain injury. *Concussion*, 2(1) :CNC30, 2017. <https://doi.org/10.2217/cnc-2016-0022> .
- [128] N. J. Rothwell and G. N. Luheshi. Interleukin 1 in the brain : biology, pathology and therapeutic target. *Trends in Neurosciences*, 23(12) :618–625, 2000. ISSN 0166-2236. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(00\)01661-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-2236(00)01661-1) .
- [129] E. Fahey and S. L. Doyle. Il-1 family cytokine regulation of vascular permeability and angiogenesis. *Frontiers in Immunology*, 10(1426), 2019. ISSN 1664-3224. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01426> .
- [130] S. Feng, L. Zou, H. Wang, *et al.* Rhoa/rock-2 pathway inhibition and tight junction protein upregulation by catalpol suppresses lipopolysaccharide-induced disruption of blood-brain barrier permeability. *Molecules*, 23(9) :2371, 2018. ISSN 1420-3049.
- [131] A. Bein, A. Zilbershtein, M. Golosovsky, *et al.* Lps induces hyper-permeability of intestinal epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 232(2) :381–390, 2017. <https://doi.org/doi:10.1002/jcp.25435> .
- [132] A. K. Singh, Y. Jiang, and S. Gupta. Effects of bacterial toxins on endothelial tight junction in vitro : A mechanism-based investigation. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 17(6) :331–347, 2007. ISSN 1537-6516. <https://doi.org/10.1080/15376510601077029> .
- [133] L.-h. Qin, W. Huang, X.-a. Mo, *et al.* Lps induces occludin dysregulation in cerebral microvascular endothelial cells via mapk signaling and augmenting mmp-2 levels. *Oxidative*

- medicine and cellular longevity*, 2015 :120641–120641, 2015. ISSN 1942-0994 1942-0900. <https://doi.org/10.1155/2015/120641> .
- [134] M. A. Erickson and W. A. Banks. Cytokine and chemokine responses in serum and brain after single and repeated injections of lipopolysaccharide : Multiplex quantification with path analysis. *Brain, Behavior, and Immunity*, 25(8) :1637–1648, 2011. ISSN 0889-1591. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.06.006> .
- [135] C. T. Capaldo and A. Nusrat. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1788(4) :864–871, 2009. ISSN 0005-2736. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2008.08.027> .
- [136] W. Pan, K. P. Stone, H. Hsueh, *et al.* Cytokine signaling modulates blood-brain barrier function. *Current pharmaceutical design*, 17(33) :3729–3740, 2011. ISSN 1873-4286 1381-6128. <https://doi.org/10.2174/138161211798220918> .
- [137] M. Von Wedel-Parlow, P. Wölte, and H.-J. Galla. Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 111(1) :111–118, 2009. ISSN 0022-3042. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06305.x> .
- [138] E. O’Keeffe and M. Campbell. Modulating the paracellular pathway at the blood–brain barrier : current and future approaches for drug delivery to the cns. *Drug Discovery Today : Technologies*, 20 :35–39, 2016. ISSN 1740-6749. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2016.07.008> .
- [139] S. Gustafsson, V. Lindström, M. Ingelsson, *et al.* Intact blood-brain barrier transport of small molecular drugs in animal models of amyloid beta and alpha-synuclein pathology. *Neuropharmacology*, 128 :482–491, 2018. ISSN 0028-3908. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.08.002> .
- [140] M. Laksitorini, V. D. Prasasty, P. K. Kiptoo, *et al.* Pathways and progress in improving drug delivery through the intestinal mucosa and blood-brain barriers. *Therapeutic delivery*, 5(10) :1143–1163, 2014. ISSN 2041-5990 2041-6008. <https://doi.org/10.4155/tde.14.67> .
- [141] M. Campbell, A.-S. Kiang, P. F. Kenna, *et al.* Rnai-mediated reversible opening of the blood-brain barrier. *The Journal of Gene Medicine*, 10(8) :930–947, 2008. ISSN 1099-498X. <https://doi.org/10.1002/jgm.1211> .



- [142] G. J. Schenk, G. Kooij, A. Reijkerkerk, *et al.* *Disease Influence on BBB Transport in Inflammatory Disorders*, pages 573–589. Springer New York, New York, NY, 2014. ISBN 978-1-4614-9105-7. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9105-7\\_21](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9105-7_21) .
- [143] P. Lu, C. Gonzales, Y. Chen, *et al.* Cns penetration of small molecules following local inflammation, widespread systemic inflammation or direct injury to the nervous system. *Life Sciences*, 85(11) :450–456, 2009. ISSN 0024-3205. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2009.07.009> .
- [144] P. T. Ronaldson and T. P. Davis. Targeting blood-brain barrier changes during inflammatory pain : an opportunity for optimizing Cns drug delivery. *Therapeutic delivery*, 2(8) :1015–1041, 2011. ISSN 2041-5990 2041-6008. <https://doi.org/10.4155/tde.11.67> .
- [145] N. Mihajlica, C. Betsholtz, and M. Hammarlund-Udenaes. Pharmacokinetics of pericyte involvement in small-molecular drug transport across the blood-brain barrier. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 122 :77–84, 2018. ISSN 0928-0987. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2018.06.018> .
- [146] N. J. Abbott. Prediction of blood–brain barrier permeation in drug discovery from in vivo, in vitro and in silico models. *Drug Discovery Today : Technologies*, 1(4) :407–416, 2004. ISSN 1740-6749. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.014> .
- [147] A. Siflinger-Birnboim, P. J. del Vecchio, J. A. Cooper, *et al.* Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer. *Journal of Cellular Physiology*, 132(1) :111–117, 1987. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041320115> .
- [148] D. Stanimirovic, M. Bani-Yaghoub, M. Perkins, *et al.* Blood-brain barrier models : In vitro to in vivo translation in preclinical development of Cns-targeting biotherapeutics. *Expert opinion on drug discovery*, 10 :1–15, 2014. <https://doi.org/10.1517/17460441.2015.974545> .
- [149] B. Sharma, K. Luhach, and G. T. Kulkarni. *4 - In vitro and in vivo models of BBB to evaluate brain targeting drug delivery*, pages 53–101. Academic Press, 2019. ISBN 978-0-12-814001-7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814001-7.00004-4> .
- [150] B. Feng, J. B. Mills, R. E. Davidson, *et al.* In Vitro P-glycoprotein Assays to Predict the in Vivo Interactions of P-glycoprotein with Drugs in the Central Nervous System. *Drug Metabolism and Disposition*, 36(2) :268, 2008. <https://doi.org/10.1124/dmd.107.017434> .

- [151] S. Bagchi, T. Chhibber, B. Lahooti, *et al.* In-vitro blood-brain barrier models for drug screening and permeation studies : an overview. *Drug design, development and therapy*, 13 :3591, 2019. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S218708> .
- [152] Y. Li, T. Chen, X. Miao, *et al.* Zebrafish : A promising in vivo model for assessing the delivery of natural products, fluorescence dyes and drugs across the blood-brain barrier. *Pharmacological Research*, 125 :246–257, 2017. ISSN 1043-6618. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.08.017> .
- [153] M. Morissette and T. Di Paolo. Non-human primate models of Pd to test novel therapies. *Journal of Neural Transmission*, 125(3) :291–324, 2018. ISSN 1435-1463. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1722-y> .
- [154] S. J. Hindle and R. J. Bainton. Barrier mechanisms in the Drosophila blood-brain barrier. *Frontiers in Neuroscience*, 8(414), 2014. ISSN 1662-453X. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00414> .
- [155] Y. M. Ambrosini, D. Borchering, A. Kanthasamy, *et al.* The Gut-Brain Axis in Neurodegenerative Diseases and Relevance of the Canine Model : A review. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 11(130), 2019. ISSN 1663-4365. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2019.00130> .
- [156] A. H. Hainsworth, S. M. Allan, J. Boltze, *et al.* Translational models for vascular cognitive impairment : a review including larger species. *BMC Medicine*, 15(1) :16, 2017. ISSN 1741-7015. <https://doi.org/10.1186/s12916-017-0793-9> .
- [157] J. Mensch, J. Oyarzabal, C. Mackie, *et al.* In vivo, in vitro and in silico methods for small molecule transfer across the Bbb. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(12) :4429–4468, 2009. ISSN 0022-3549. <https://doi.org/10.1002/jps.21745> .
- [158] E. Vandenhoute. *Establishment and characterization of new in vitro blood-brain barrier models : from fundamental to applied research*. Thesis, 2011.
- [159] Y. Takasato, S. I. Rapoport, and Q. R. Smith. An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 247(3) :H484–H493, 1984. ISSN 0363-6135. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1984.247.3.H484> .
- [160] V. I. Chefer, A. C. Thompson, A. Zapata, *et al.* Overview of brain microdialysis. *Current protocols in neuroscience*, Chapter 7 :Unit7.1–Unit7.1, 2009. ISSN 1934-8576 1934-8584. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0701s47> .



- [161] K. S. Saili, T. J. Zurlinden, and T. B. Knudsen. *Chapter 11 - Modeling the Neurovascular Unit In Vitro and In Silico*, pages 127–142. Academic Press, 2018. ISBN 978-0-12-809405-1. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809405-1.00011-0> .
- [162] A. R. Mehdipour and M. Hamidi. Brain drug targeting : a computational approach for overcoming blood–brain barrier. *Drug Discovery Today*, 14(21) :1030–1036, 2009. ISSN 1359-6446. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2009.07.009> .
- [163] S.-Y. Yang, Q. Huang, L.-L. Li, *et al.* An integrated scheme for feature selection and parameter setting in the support vector machine modeling and its application to the prediction of pharmacokinetic properties of drugs. *Artificial Intelligence in Medicine*, 46(2) :155–163, 2009. ISSN 0933-3657. <https://doi.org/10.1016/j.artmed.2008.07.001> .
- [164] I. Puscas, F. Bernard-Patrzynski, M. Jutras, *et al.* IVivC assessment of Two Mouse Brain Endothelial Cell Models for Drug Screening. *Pharmaceutics*, 11(11), 2019. ISSN 1999-4923. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110587> .
- [165] S. Aday, R. Cecchelli, D. Hallier-Vanuxeem, *et al.* Stem Cell-Based Human Blood–Brain Barrier Models for Drug Discovery and Delivery. *Trends in Biotechnology*, 34(5) :382–393, 2016. ISSN 0167-7799. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.01.001> .
- [166] T.-E. Park, N. Mustafaoglu, A. Herland, *et al.* Hypoxia-enhanced blood-brain barrier chip recapitulates human barrier function and shuttling of drugs and antibodies. *Nature Communications*, 10(1) :2621, 2019. ISSN 2041-1723. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10588-0> .
- [167] L. Di, E. H. Kerns, and G. T. Carter. Strategies to assess blood–brain barrier penetration. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3(6) :677–687, 2008. ISSN 1746-0441. <https://doi.org/10.1517/17460441.3.6.677> .
- [168] N. J. Abbott. 5.13 - In Vitro Models for Examining and Predicting Brain Uptake of Drugs. pages 301–320, 2007. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00128-0> .
- [169] G. W. Goldstein, J. S. Wolinsky, J. Csejtey, *et al.* Isolation of metabolically active capillaries from rat brain<sup>1,2</sup>. *Journal of Neurochemistry*, 25(5) :715–717, 1975. ISSN 0022-3042. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1975.tb04395.x> .
- [170] A. Boroujerdi, U. Tigges, J. Welser-Alves, *et al.* *Isolation and Culture of Primary Pericytes from Mouse Brain*, volume 1135 of *Methods in Molecular Biology*, book section 31, pages 383–392. Springer New York, 2014. ISBN 978-1-4939-0319-1. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7\\_31](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0320-7_31) .

- [171] F. Takata, S. Dohgu, A. Yamauchi, *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*, 8(1) :e55166–e55166, 2013. ISSN 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055166> .
- [172] H. Legros, S. Launay, B. D. Roussel, *et al.* Newborn- and adult-derived brain microvascular endothelial cells show age-related differences in phenotype and glutamate-evoked protease release. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 29(6) :1146–1158, 2009. ISSN 0271-678X. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2009.39> .
- [173] C. E. Tsai, M. J. Daood, R. H. Lane, *et al.* P-glycoprotein expression in mouse brain increases with maturation. *Neonatology*, 81(1) :58–64, 2002. ISSN 1661-7800. <https://doi.org/10.1159/000047185> .
- [174] J. Tcw, M. Wang, A. A. Pimenova, *et al.* An Efficient Platform for Astrocyte Differentiation from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 9(2) :600–614, 2017. ISSN 2213-6711. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.06.018> .
- [175] R. Cuevas-Diaz Duran, H. Wei, and J. Q. Wu. Single-cell Rna-sequencing of the brain. *Clinical and translational medicine*, 6(1) :20–20, 2017. ISSN 2001-1326. <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0150-9> .
- [176] M. Ni and M. Aschner. Neonatal rat primary microglia : isolation, culturing, and selected applications. *Current protocols in toxicology*, Chapter 12 :Unit–12.17, 2010. ISSN 1934-9262 1934-9254. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx1217s43> .
- [177] P. Dore-Duffy. Pericytes : pluripotent cells of the blood brain barrier. *J Current pharmaceutical design*, 14(16) :1581–1593, 2008. ISSN 1381-6128. <https://doi.org/10.2174/138161208784705469> .
- [178] A. Armulik, G. Genové, and C. Betsholtz. Pericytes : Developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental Cell*, 21(2) :193–215, 2011. ISSN 1534-5807. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001> .
- [179] F. Shimizu, Y. Sano, M.-a. Abe, *et al.* Peripheral nerve pericytes modify the blood–nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *Journal of Cellular Physiology*, 226(1) :255–266, 2011. ISSN 0021-9541. <https://doi.org/10.1002/jcp.22337> .

- [180] P. Naik and L. Cucullo. In vitro blood–brain barrier models : Current and perspective technologies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 101(4) :1337–1354, 2012. ISSN 0022-3549. <https://doi.org/10.1002/jps.23022> .
- [181] J. Mensch, A. Melis, C. Mackie, *et al.* Evaluation of various PamPa models to identify the most discriminating method for the prediction of Bbb permeability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 74(3) :495–502, 2010. ISSN 0939-6411. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.01.003> .
- [182] D. Yuen, R. Leu, J. Tse, *et al.* Novel characterization of bend.3 cells that express lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1. *Lymphology*, 47(2) :73–81, 2014. ISSN 0024-7766.
- [183] M. A. Kaisar, V. V. Abhyankar, and L. Cucullo. *In Vitro BBB Models : Working with Static Platforms and Microfluidic Systems*, pages 55–70. Springer New York, New York, NY, 2019. ISBN 978-1-4939-8946-1. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8946-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8946-1_4) .
- [184] S. F. Tehrani, F. Bernard-Patrzynski, I. Puscas, *et al.* Length of surface Peg modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells. *Nanomedicine*, 16 :185–194, 2018. ISSN 1549-9634. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.11.016> .
- [185] S. Nakagawa, M. A. Deli, H. Kawaguchi, *et al.* A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int*, 54(3-4) :253–63, 2009. ISSN 0197-0186. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2008.12.002> .
- [186] W. A. Banks, A. M. Gray, M. A. Erickson, *et al.* Lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier disruption : roles of cyclooxygenase, oxidative stress, neuroinflammation, and elements of the neurovascular unit. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1) :223, 2015. ISSN 1742-2094. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0434-1> .
- [187] S. J. O’Carroll, D. T. Kho, R. Wiltshire, *et al.* Pro-inflammatory IFN- $\gamma$  and IL1- $\beta$  differentially regulate the inflammatory phenotype of brain microvascular endothelial cells. *Journal of Neuroinflammation*, 12(1) :131, 2015. ISSN 1742-2094. <https://doi.org/10.1186/s12974-015-0346-0> .
- [188] E. González and S. Joly. Impact of rna-seq attributes on false positive rates in differential expression analysis of de novo assembled transcriptomes. *BMC Research Notes*, 6(1) :503, 2013. ISSN 1756-0500. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-6-503> .

- [189] D. Gomez-Zepeda, M. Taghi, M. Smirnova, *et al.* LC–Ms/Ms-based quantification of efflux transporter proteins at the Bbb. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164 :496–508, 2019. ISSN 0731-7085. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.013> .
- [190] H. Liu, L. Huang, Y. Li, *et al.* Correlation between Membrane Protein Expression Levels and Transcellular Transport Activity for Breast Cancer Resistance Protein. *Drug Metabolism and Disposition*, 45(5) :449, 2017. <https://doi.org/10.1124/dmd.116.074245> .
- [191] P. Hao, S. S. Adav, X. Gallart-Palau, *et al.* Recent advances in mass spectrometric analysis of protein deamidation. *Mass Spectrometry Reviews*, 36(6) :677–692, 2017. ISSN 0277-7037. <https://doi.org/10.1002/mas.21491> .
- [192] P. Jain, R. S. Pawar, R. S. Pandey, *et al.* In-vitro in-vivo correlation (ivivc) in nanomedicine : Is protein corona the missing link? *Biotechnology Advances*, 35(7) :889–904, 2017. ISSN 0734-9750. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.08.003> .

# Annexe A - *Curriculum vitae* scientifique

## 6.0.0.1 Articles

### Publiés

- F. Bernard-Patrzynski<sup>†</sup>, M.-A. Lécuyer<sup>†</sup>, I. Puscas, et al. *Isolation of endothelial cells, pericytes and astrocytes from mouse brain*. PLOS ONE, 14(12) :e0226302, 2019.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226302>.
- Puscas I<sup>†</sup>, Bernard-Patrzynski F<sup>†</sup>, Jutras M, Lécuyer M-A, Bourbonnière L, Prat A, Leclair G and Roullin VG. *IVIVC Assessment of Two Mouse Brain Endothelial Cell Models for Drug Screening*. Pharmaceutics. 2019 ;11(11).  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11110587>.
- S. F. Tehrani, F. Bernard-Patrzynski, I. Puscas, et al. *Length of surface peg modulates nanocarrier transcytosis across brain vascular endothelial cells*. Nanomedicine, 16 :185-194, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.11.016>.

### À soumettre

- Bernard-Patrzynski F, Lécuyer M-A, Ramassamy C, Prat A, Leclair G and Roullin VG. *Acute inflammation of the blood-brain barrier has unexpected impact on the permeability of small drugs in a validated in vitro model*. Article écrit pour le journal : journal of pharmaceutical sciences.

## 6.0.0.2 Communications

### Orales

- (2019), Würzburg,, Allemagne. International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers. Florian Bernard-Patrzynski Ina Puscas, Marc-André Lécuyer, Marc Charabati, Lyne Bourbonnières, Martin Jutras1, Charles Ramassamy, Alexandre Prat, Grégoire Leclair and V. Gaelle Roullin. Primary endothelial cells from brain mouse : a useful tool to assess drug permeability to the CNS in healthy and pathological conditions

- (2017), Orford, Canada. Conférences Armand Frappier. *Florian Bernard-Patrzynski*, Marc-André Lécuyer, Charles Ramassamy, Alexandre Prat, Grégoire Leclair and V. Gaëlle Roullin. *In vitro* pathological MVU models to study drug permeability and formulations
- (2017), Québec, Canada. Annual Canadian Pharmacy Education and Research Conference (CPERC). *Florian Bernard-Patrzynski* and V Gaëlle Roullin. Pharmaceutical calculations : diagnosing at-risk students is like finding a needle in a haystack
- (2016), Montréal, Canada. Association francophone pour le savoir (AFPS). *Florian Bernard-Patrzynski*, Hania Kebir, Marc-André L'Ecuyer, Alexandre Prat, Grégoire Leclair and V Gaëlle Roullin. Une barrière hématoencéphalique reconstituée pour le criblage de la perméabilité de molécules et de formulations
- (2014), Montréal, Canada. Réseau québécois de recherche sur le médicament (RQRM). *Florian Bernard-Patrzynski*, Hania Kebir, Marc-André L'Ecuyer, Alexandre Prat, Grégoire Leclair and V Gaëlle Roullin. Establishing a multicellular model of the Blood Brain Barrier with high throughput screening.
- (2014), Montréal, Canada. Groupe de recherche universitaire sur le médicament (GRUM). *Florian Bernard-Patrzynski*, Martin Jutras, Mihaela Friciu, Pierre-Luc Latreille, V Gaëlle Roullin and Grégoire Leclair. Optimization of a PAMPA-BBB Model and Subsequent Validation by a Consolidated LC-MS/MS Method
- (2014), Montréal, Canada. Société canadienne des sciences pharmaceutiques (CSPS). *Florian Bernard-Patrzynski*, Martin Jutras, Mihaela Friciu, Pierre-Luc Latreille, V Gaëlle Roullin and Grégoire Leclair. Optimization of a PAMPA-BBB Model and Subsequent Validation by a Consolidated LC-MS/MS Method

### Affiches

- (2016), Vancouver, Canada. Société canadienne des sciences pharmaceutiques (CSPS). *Florian Bernard-Patrzynski*, Hania Kebir, Marc-André L'Ecuyer, Alexandre Prat, Grégoire Leclair and V Gaëlle Roullin. Isolation of primary murine brain endothelial cells, pericytes and astrocytes
- (2015), Boston, États-Unis. World preclinical congress (WPC). *Florian Bernard-Patrzynski*, Martin Jutras, Mihaela Friciu, Pierre-Luc Latreille, V Gaëlle Roullin and Grégoire Leclair. OptiB3-PAMPA : a biorelevant, validated PAMPA-BBB assay using a cassette of 7 standard drugs

- (2015), Montréal, Canada. Groupe de recherche universitaire sur le médicament (GRUM). *Florian Bernard-Patrzynski*, Hania Kebir, Marc-André L'Ecuyer, Alexandre Prat, Grégoire Leclair and V Gaëlle Roullin. Multicellular model of the blood brain barrier for drug discovery
- (2015), Paris, France. International conference on cerebral vascular biology (CVB). *Florian Bernard-Patrzynski*, Martin Jutras, Mihaela Friciu, Pierre-Luc Latreille, V Gaëlle Roullin and Grégoire Leclair. OptiB3-PAMPA : a biorelevant, validated PAMPA-BBB assay using a cassette of 7 standard drugs

### 6.0.0.3 Bourses et prix

#### Bourses

- (2019), 12000 \$. Bourse de fin de doctorat – Attribuée selon le dossier académique. Faculté des Études Supérieures et Post-Doctoral – Université de Montréal (FESP).
- (2018), 5000 \$. Bourse d'excellence – Attribuée selon le dossier académique. Faculté des Études Supérieures et Post-Doctoral – Université de Montréal (FESP).
- (2017), 5000 \$. Bourse d'excellence – Attribuée selon le dossier académique. Faculté des Études Supérieures et Post-Doctoral – Université de Montréal (FESP).
- (2016), 9000 \$. Bourse de recrutement – Attribuée selon le dossier académique. Faculté de Pharmacie – Université de Montréal.
- (2015), 6400 \$. Bourse de la réussite étudiante – Attribuée selon le dossier académique. Faculté des Études Supérieures et Post-Doctoral – Université de Montréal (FESP).
- (2015), 500 \$. Bourse de formation – Attribuée selon le dossier académique. Groupement de recherche universitaire sur le médicament (GRUM).
- (2014), 6000 \$. Bourse de recrutement – Meilleure présentation du sujet de recherche. Réseau Québécois de recherche sur le médicament (RQRM).

#### Prix

- (2015), 500 \$. Prix du vice-décanat – Attribuée au meilleur présentateur. Faculté de Pharmacie – Université de Montréal.
- (2015), 1500 \$. Bourse d'aide à la mobilité – Attribuée aux trois meilleurs présentateurs. Axe de formulation et d'analyse du médicament (AFAM).