HAL
open science

Blood-Brain Barrier during cerebral maturation : impact of neuro-inflammation on the regulation of drug-efflux/influx transporters

Rania Harati

To cite this version:

Rania Harati. Blood-Brain Barrier during cerebral maturation : impact of neuro-inflammation on the regulation of drug-efflux/influx transporters. Agricultural sciences. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. English. NNT : 2012PA114856 . tel-00829110

HAL Id: tel-00829110

https://theses.hal.science/tel-00829110

Submitted on 27 Nov 2014

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

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

UNIVERSITÉ PARIS XI

FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY

Ecole doctorale Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Pôle Pharmacologie - Toxicologie

Année 2012 **Série doctorat N°1214**

THÈSE

Présentée

Au Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse

CEA de Saclay

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS XI

Discipline : Pharmacologie Expérimentale et Clinique

par

Rania HARATI

Barrière Hémato-Encéphalique au cours de la Maturation Cérébrale: Impact de la Neuro-Inflammation sur la Régulation des Transporteurs d'Efflux/Influx des Médicaments

---

Soutenue le 5 Décembre 2012

JURY :	**Professeur Saadia KERDINE-RÖMER**	Examinateur
	Professeur Reina BENDAYAN	Rapporteur
	Professeur Xavier DECLÈVES	Rapporteur
	Docteur Jean-François GHERSI-EGEA	Examinateur
	Docteur Anne-Sophie VILLÉGIER	Examinateur
	Docteur Aloïse MABONDZO	Directeur de Thèse

Introduction

Les maladies du Système Nerveux Central (SNC) sont des maladies invalidantes affectant jusqu'à un milliard de personnes dans le monde entier, indépendamment de l'âge. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), ces troubles sont l'un des enjeux majeurs de la recherche scientifique du 21ème siècle à cause de l'absence de traitements efficaces, que ce soit pour les enfants ou pour les adultes. L'échec thérapeutique des maladies cérébrales est lié, entre autre, à l'existence de «barrières» entre le sang et le SNC, en particulier, la Barrière Hémato-encéphalique (BHE).

La BHE est une structure neurovasculaire spécialisée localisée au niveau du Microvaisseaux Cérébraux (MVC). Ses fonctions principales sont la protection du SNC et le maintien de son homéostasie. Plusieurs facteurs contribuent à ce rôle: 1) La présence de Jonctions Serrées (JS) entre les Cellules Endothéliales des Microvaisseaux Cérébraux (CEMVC) qui scellent l'espace entre les cellules adjacentes et limitent le passage paracellulaire de substances potentiellement neurotoxiques véhiculées par le sang dans le cerveau, 2) La présence d'un certain nombre de transporteurs d'influx et/ou d'efflux exprimés sur le côté luminale et/ou abluminale de l'unité neurovasculaire pour surmonter les JS et répondre au besoin du cerveau en nutriments et en énergie. Ces transporteurs appartiennent majoritairement à deux grandes familles (ATP-binding cassette (ABC) et SoLute Carrier (SLC)) qui facilitent le passage des nutriments (par exemple le glucose, les acides aminés, etc.) du sang vers le cerveau, et l'efflux des déchets métaboliques cérébaux et des substances neurotoxiques à l'extérieur du cerveau. Mais ces transporteurs d'efflux empêchent également les médicaments thérapeutiques de pénétrer dans le cerveau et d'atteindre leur site d'action, ce qui contribue à l'échec thérapeutique. Pour surmonter les transporteurs ABC et SLC, les recherches scientifiques visent à identifier les mécanismes de signalisation qui régulent ces transporteurs au niveau de la BHE afin de moduler leur activité et d'améliorer la pharmacothérapie des maladies cérébrales. Pendant des années, les transporteurs ABC et SLC ont été largement étudiés dans l'organisme adulte. Mais, il y a une croyance répandue parmi les pédiatres, neurologues et les neuroscientifiques que la BHE chez l'embryon, le fœtus, le nouveau-né et l'enfant est «immature», ce qui peut influencer la pharmacocinétique et la pharmacodynamique des médicaments dans le cerveau. Cependant, les connaissances actuelles sur l'état fonctionnel de la

BHE dans l'organisme immature restent très limitées. Ainsi, d'un point de vue clinique et dans la perspective de développer de nouveaux médicaments avec une efficacité optimisée dans le SNC des enfants, il est important de 1) comprendre le rôle des transporteurs d'efflux de la BHE dans le cerveau immature et 2) élucider les mécanismes qui régulent leur expression fonctionnelle dans des conditions normales et pathologiques, notemment inflammatoires, parce que des modifications dans les composantes structurales et fonctionnelles de l'unité neurovasculaire ont été rapportées dans une longue liste de pathologies du SNC chez les enfants et les adultes (Stolp et Dziegielewska, 2009; Zlokovic, 2008) .

Objectifs

Les objectifs de ce travail de thèse sont de trois ordres:

1- Etudier l'ontogenèse de quelques protéines de structure et de transport de la BHE du stade post-natal jusqu'au stade adulte, en prenant comme modèle d'étude le rat.
2- Etudier les mécanismes moléculaires de régulation de l'activité de quatres transporteurs impliqués dans le phénomène de résistance aux médicaments (P-glycoprotéine (P-gp), Breast Cancer resistence protein (bcrp), Organic Anion Transporter 3 (oat3) et Organic Anion-Transporting Polypeptide (oatp1a4).
3- Comparer l'impact de l'inflammation cérébrale aigue sur la régulation de la P-gp et la bcrp entre sujets jeunes et adultes.

Notre méthodologie de travail s'est articulée comme suit:

1 - Développement d'outils de recherche:

• Un modèle *in vivo* d'inflammation cérébrale aigue chez les rats jeunes et adultes: Ces modèles consistent à créer une inflammation cérébrale aigue en injectant en voie intra-cérébroventriculaire (icv) un neuropeptide connu pour ses actions inflammatoires, l'endothéline-1 (ET-1).

- Un modèle *in vitro* de BHE de rat jeunes: Ce modèle consiste en une co-culture de cellules primaires astrocytaires et endothéliales cérébrales exprimant les différentes composantes de la BHE [(protéines jonctionnelles, transporteurs d'efflux (e.g. P-gp et bcrp)].

2 – Etude d'ontogenèse de la BHE par l'établissement des profils de ses composantes structurales (jonctions serrées inter-endothéliales) et fonctionnelles (transporteurs ABC et SLC), du stade périnatal jusqu'au stade adulte.

Cette étude consiste à examiner dans des MVC isolés de cerveaux de rats nouveaux-nés, juvéniles et adultes, l'expression génique et protéique d'une série de transporteurs ABC et SLC de la BHE, et ceci par PCR en temps réel et par Western-Blot. Cette étude consiste également à mesurer, *in vivo*, l'activité de la P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4 en calculant le rapport des concentrations du cerveau / plasma (Kp) des substrats connus de ces transporteurs lorsque administrés par voie intraveineuse. De plus, nous nous sommes intéressés aux mécanismes moléculaires régulant l'activité de ces transporteurs et qui peuvent être à l'origine des différences liées à l'âge. Notre étude s'est focalisée en particulier sur le rôle de la voie Wnt/β-caténine.

3- Etude de l'impact de l'inflammation cérébrale aigue médiée par l'ET-1 sur la régulation des transporteurs ABC de la barrière: Comparaison entre rats jeunes et adultes.

Cette étude consiste à comparer, entre sujets jeunes et adultes, l'impact de l'injection icv de l'ET-1 sur l'expression et l'activité de la P-gp et de la bcrp, *ex vivo et in vivo*.

Cette étude a pour finalité d'élucider le statut fonctionnel de la BHE au cours de l'ontogenèse, ainsi que les mécanismes de signalisation impliqués dans la régulation des transporteurs ABC et SLC de la barrière. Ces données pourraient ouvrir de nouvelles avenues thérapeutiques pour améliorer la pharmacothérapie cérébrale et ceci en ciblant les voies régulant l'activité des transporteurs d'efflux des médicaments. De plus, il est important de comprendre la régulation de ces transporteurs dans les conditions pathologiques notemment inflammatoires, chez les sujets juvéniles par comparaison aux sujets adultes. Ces données aideront à fournir des arguments sur l'intérêt de prendre en compte les propriétés spécifiques de la BHE pédiatrique et la distinguer de la BHE adulte, notamment lors des définitions des stratégies thérapeuthiques destinées à traiter les maladies du système nerveux central chez les enfants.

Résultats et discussion

1. L'ontogenèse de la barrière hémato-encéphalique : Etude descriptive

L'étude d'ontogenèse de la BHE a fait l'objet d'un article publié dans le journal suivant « Journal of Molecular Pharmaceutics » (Septembre 2012) et intitulé :

"P-glycoprotein, Breast cancer resistance protein, Organic anion transporter 3 and transporting peptide 1a4 during Blood-Brain Barrier Maturation: Involvement of Wnt/β-Catenin and Endothelin-1 Signaling" (Harati et al., 2012a).

L'étude descriptive de l'ontogenèse de la BHE a été présentée sous forme de poster au cours du congrès suivant «14th Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers, Istanbul, Turkey» (Septembre 2011) :

"Functional Expression of ABC and SLC Transporters during Blood-Brain Barrier Maturation".

1.1. Résumé

Nos connaissances actuelles sur l'état fonctionnel de la BHE dans l'organisme immature restent très limitées. Ainsi, d'un point de vue clinique et dans la perspective de développer de nouveaux médicaments avec une efficacité optimisée dans le SNC des enfants, il est important de 1) comprendre le rôle des transporteurs d'efflux de la BHE dans le cerveau immature et 2) élucider les mécanismes qui régulent leur expression fonctionnelle.

Dans cette étude, nous avons établi le profil d'expression génique d'une série de composantes structuralles et fonctionnelles de la BHE au cours de la maturation cérébrale.

Des rats mâles Wistar à quatre stades de la maturation ont été utilisés: Post-natal (P) P2 correspondant au stade prénatal chez l'humain, P14 correspondant au stade nouveau-né, P21 correspondant au stade pédiatrique et P84 correspondant au stade adulte chez l'humain.

L'expression gènique des composantes de la BHE a été évaluée *ex vivo* dans les MVC, site de la BHE. Cette expression a été mesurée par PCR en temps réel. La méthode expérimentale est décrite dans l'article Harati et al., 2012a. Les composantes de la BHE étudiées sont les suivantes :

- Composantes structurales : Claudine-3, Claudine-5 et Zonula-Ocludens-1 (ZO-1).
- Transporteurs ABC: abcb1, abcc1, abcc4, abcc5, abcc6 et abcg2.

- Transporteurs SLC: slc22a8, slco1a4, slc2a1, slc15a2, slc7a7 et slc7a8.

Parmi ces composantes, nous nous sommes focalisés sur quatre transporteurs impliqués dans le phénomène de résistance aux médicaments (P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4). Pour ces transporteurs, nous avons mesuré l'expression protéique par Western-Blot, ainsi que leur activité *in vivo*. Cette dernière consiste à mesurer l'activité de la P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4 en calculant le rapport des concentrations du cerveau / plasma (Kp) des substrats connus de ces transporteurs lorsque administrés par voie intraveineuse. La méthode expérimentale est décrite dans l'article Harati et al., 2012a. Nos résultats ont montré que l'expression génique et protéique de la plupart des composantes de la BHE augmente avec l'âge. Quant à leur statut fonctionnel, nos résultats ont montré que l'activité de la P-gp et de la bcrp ne varie pas entre sujets jeunes et adultes. En revanche, nous avons montré que l'activité d'efflux de l'oat3 et de l'oatp1a4 est inférieure chez les rats jeunes comparés aux adultes.

1.2. Résulats et Discussion

Les principaux résultats obtenus de l'étude descriptive de l'ontogenèse de la BHE sont les suivants:

1) Les gènes de Claudine-5 et ZO1 sont bien exprimés à la naissance et gardent presque le même niveau d'expression tout au long de la maturation. Aucune différence significative n'a été observée entre les rats nouveau-nés et les adultes (figure 12 du rapport de thèse Harati, 2012).

Claudine-5 et ZO1 sont des composantes essentielles des JS; ils ont un rôle clé dans l'établissement de ces jonctions, empêchant ainsi la diffusion passive paracellulaire des molécules entre le sang et le cerveau. Nos résultats ont montré que ces deux composantes sont bien exprimées à la naissance sans différences significatives entre les rats nouveau-nés et les adultes. Ces résultats sont en accord avec ceux de la littérature. En effet, il a été démontré que le BHE se développe pendant la vie fœtale et elle est bien étanche à la naissance, en particulier pour les macromolécules (Ballabh et al., 2004; Saunders et al., 2000; Conserver et al., 1995; Preston et al., 1995; Moos et Møllgård, 1993; Saunders, 1992; Tauc et al., 1984; Olsson et al., 1968). Il a été également montré que perméabilité de la BHE au mannitol (182 Da) dans le cerveau de rats âgés d'une semaine est identique à celle des rats adultes (Preston et al. (1995)). Chez l'homme, l'expression de Claudine-5 a été détectée dans l'endothélium capillaire du cerveau des fœtus

humains âgés de 14 semaines (Virgintino et al., 2004). De plus, il a été démontré que la BHE des embryons et nouveau-nés protége le cerveau de molécules de faible poids moléculaire, et ceci parce que lea JS sont formées et fonctionnellement efficaces dès les stades précoces de la vascularisation cérébrale (Daneman et al., 2010a; Ek et al., 2006; Johansson et al., 2006; Nitta et al., 2003). Pris ensemble, ces études suggèrent que, chez les mammifères, la barrière est formée dès la naissance (Butt et al., 1990). Nos résultats sont en accord avec ces données.

2) A la différence de Claudine-5 et ZO1, Claudine-3 est exprimée à P2 mais ce niveau décroit après la naissance; au P14, P21 et P84, ce gène est détecté à des niveaux d'expression très bas (figure 12 du rapport de thèse Harati, 2012).

Claudin-3 est une composante des JS. Elle est connue pour être impliquée lors de l'établissement au cours de la vie embryonaire (Liebner et al., 2008). Son expression élevée à la naissance est en accord avec ce rôle.

3) L'expression génique de la plupart des transporteurs ABC et SLC analysés varie en fonction de l'âge (figures 13, 14 respectivement du rapport de thèse Harati, 2012).

Les transporteurs étudiés sont impliqués dans les phénomènes de résistance aux médicaments. Par conséquent, ces variations peuvent avoir un impact sur la biodisponibilité cérébrale des médicaments. Pour cela, cette étude gènique mérite d'être compléter par des études de fonctionalité.

4) L'expression protéique de la P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4 augmente avec la maturation cérébrale (figures 2 et 3, Harati et al., 2012a).

Pour la première fois, nous avons établit l'expression génique et protéique de ces quatre transporteurs d'efflux des médicaments au niveau des MVC, site de la BHE, au cours de la maturation cérébrale. Des recherches antérieures avaient établit l'expression génique de la P-gp et la bcrp dans le cerveau à différents stades de développement: E13, E15, E18, P1, P14, P21 et l'âge adulte. Ces études avaient montré que l'expression de la P-gp augmente progressivement au cours du développement, alors que l'expression de la bcrp ne varie pas avec l'âge (Ek et al., 2010, Daood et al, 2008). Notre étude a été réalisée au niveau des MVC, site de la BHE, et nos résultats montrent des variations âge-dépendantes de l'expression de P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4. Etant donné que ces transporteurs sont impliqués dans les phénomènes de résistance aux médicaments, nous avons poursuivi notre étude en évaluant leur état fonctionnel au cours de la maturation cérébrale.

5) L'activité des transporteurs P-gp et bcrp ne varie pas entre rats juvéniles et adultes tandis que celle d'oat3 et oatp1a4 augmente en passant du stade juvénile au stade adulte (figure 4, Harati et al., 2102a).

Ces résultats montrent que le cerveau des enfants peut éventuellement être plus vulnérable aux neurotoxiques que celui adulte, et que la réponse du CNS aux médicaments peut varier en fonction de l'âge ce qui exige prudence lors de l'administration des médicaments aux enfants.

6) L'activité des transporteurs ne corrèle pas toujours avec leur expression, d'où l'importance de mener les études de fonctionalité au cours des études sur les transporteurs d'efflux.

1.3. Conclusion et Perspectives

Ces données suggèrent que la réponse du système nerveux central aux médicaments peut être âge-dépendante. Ces résultats suggèrent également que d'autres facteurs peuvent être à l'origine de la régulation fonctionnelle mais pas transcriptionnelle des transporteurs d'efflux de la BHE, ce qui souligne l'importance d'évaluer leur activité dans le but d'une meilleure évaluation des profils pharmacocinétiques des médicaments.

En perspective de cette étude descriptive, il est important d'évaluer l'état fonctionnel des autres composantes de la BHE au cours de la maturation du cerveau, afin d'avoir une vue d'ensemble sur le rôle de la BHE dans le cerveau immature. Ces études donneront une idée plus claire sur les modifications des propriétés de la barrière au cours de l'ontogenèse et permetteront de savoir 1) si le cerveau des enfants est plus vulnérable aux substances neurotoxiques que celui adulte et 2) si la réponse du SNC aux médicaments est liée à l'âge. Ces données fournisseront des arguments sur l'intérêt de prendre en compte les propriétés spécifiques de la BHE pédiatrique et la distinguer de la BHE adulte lors des définitions des stratégies thérapeutiques destinées à traiter les maladies cérébrales chez les enfants.

2. Les mécanismes moléculaires de l'ontogenèse de la barrière hémato-encéphalique

2.1. Résumé

L'étude descriptive met en évidence des modifications des propriétés de la BHE au cours de l'ontogenèse. Cependant, la question utlime qui se pose concerne les mécanismes de régulation de l'expression fonctionnelle de la P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4 dans le cerveau immature ainsi que celui adulte. La nécessité de comprendre ces mécanismes reposent sur plusieurs faits : 1) Le rôle des mécanismes moléculaires régulant l'activité des transporteurs d'efflux de la BHE ne sont pas entièrement comprises, et 2) Ces études mécanistiques permetterons de trouver des cibles moléculaires pouvant être utilisés pour moduler l'activité des transporteurs d'efflux des médicaments et ainsi optimiser la biodisponibilité des médicaments dans le cerveau pédiatrique et adulte. Un mécanisme de signalisation impliqué dans la régulation des composantes structuralles de la BHE au cours du développement embryonnaire c'est la voie Wnt/β-caténine (Liebner et al., 2008). Dans cette voie, l'interaction des protéines Wnt avec des récepteurs membranaires conduit à l'inactivation d'une kinase, la Glycogène Synthase Kinase-3β (GSK-3β), ce qui conduit à la stabilisation de la β-caténine (β-cat) dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau, où il induit l'expression de gènes cibles (Logan et al., 2004) (figure 9, 10 et 11 de la partie d'introduction du rapport de thèse Harati, 2012). Fait intéressant, lorsque nous avons établit le profil de β-cat au cours de la maturation, nous avons illustré pour la première fois une régulation négative de l'expression nucléaire de la β-cat au niveau des MVC, et ceci lorsque les transporteurs P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4 sont à leur plus haut niveaux d'expression (figure 5, Harati et al., 2012a). Ces résultats suggèrent un lien entre l'expression de la β-cat et celle des transporteurs de la BHE. Quoi qu'il en soit, le rôle de la voie Wnt/β-cat dans la régulation de la maturation de la BHE reste à préciser. La détermination de ce rôle fut un des objectifs principaux de cette étude.

Pour ce faire, nous avons utilisé une approche *in vivo* qui repose sur l'activation de la β-cat dans le cerveau de rat et ceci par injection intracérébroventriculaire (icv) d'un inhibiteur de GSK-3β, le BIO (6-bromo-indirubine-3'Oxime). Ensuite, nous avons suivi l'expression génique et protéique cytoplasmique/nucléaire de β-cat ainsi que celle des transporteurs d'efflux dans des

MVC isolés de rats jeunes (P21) et adulte (P84), en présence ou en absence de l'activateur de β-cat. Nos résultats ont montré que l'activation *in vivo* de la β-cat nucléaire cérébrale augmente l'expression des ARNm de la P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4 (figures 6, Harati et al., 2012a). La modulation de l'activité de P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4 par β-cat a également été déterminée par l'évaluation *in vivo* du coefficient (Kp,uu) qui est le ratio des concentrations cérébrales libres de substrats des transporteurs, administrés par vois iv, divisées par leurs concentrations plasmatiques (Hammarlund-Udenaes et al, 2008;.. Liu et al, 2005). Nos résultats ont montré que l'activation *in vivo* de la β-cat nucléaire dans le cerveau augmente l'activité de la bcrp, oat3 et oatp1a4 chez les adultes (figures 7 et 8, Harati et al., 2012a). Nous avons également mis en évidence le rôle d'une interaction entre la voie de signalisation Wnt/β-cat et celle de l'ET-1, un peptide vasodilatateur (Wright et al., 1998; Yanagisawa et al, 1988), dans la régulation de ces transporteurs au niveau de la BHE, et ceci chez les rats adultes. En effet, l'ET-1 a fait l'objet de plusieurs études de recherche *in vitro* menées dans notre laboratoire. Ces études, en plus d'autres études antérieures, avaient mis en évidence un rôle de l'ET-1 dans la régulation de l'activité de la P-gp au niveau de la BHE (Hawkins et al, 2010; Hembury et al., 2008; Bauer et al., 2007). Pour cela, nous avons testé l'hypothèse de l'interaction de la voie Wnt/β-cat avec l'ET-1 pour réguler les transporteurs d'efflux. Chez les adultes, l'inhibition de GSK3 *in vitro* et *in vivo* augmente l'ARNm de l'ET-1 (figure 9 de Harati et al., 2012a). Fait intéressant, lorsque nous avons bloqué le récepteur ETA de l'ET-1, l'activation des transporteurs médiée par l'activation de β-cat a diminué (figures 10 et 11 de Harati et al., 2012a).

Chez les rats jeunes, contrairement aux adultes, l'inhibition de la GSK-3β *in vivo* diminue l'expression fonctionnelle de la bcrp, avec une tendance à la diminution pour la P-gp (Figure 15 du rapport de thèse Harati, 2012).

2.2. Résultats et Discussion

Les principaux résultats obtenus de l'étude descriptive de l'ontogenèse de la BHE sont les suivants:

(i) L'expression de β-caténine nucléaire varie d'une manière inverse à celle de P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4. En effet, l'expression de la β-cat nucléaire diminue de façon significative à P21 par rapport à P84 (figure 5, Harati et al., 2012a).

Plusieurs voies de signalisation ont été démontrées pour être impliquées dans la régulation du développement de la BHE au cours de la vie embryonaire. Cependant, les mécanismes régulant la maturation et la maintenance de la BHE sont encore peu étudiés. Parmi les nombreuses voies élucidées, nous nous sommes intéressés à une voie: Wnt/β-cat et ceci en se basant sur plusieurs évidences:

1) La voie Wnt/β-cat est impliquée dans la régulation du développement de la BHE (Liebner et al., 2008). En effet, la stabilisation endothéliale spécifique de la β-cat *in vivo* induit la maturation de la barrière, alors que l'inactivation de la β-cat cause une régulation négative de la Claudine-3.

2) Des études récentes ont montré que la β-cat régule les transporteurs d'efflux. En effet, l'activation des β-cat augmente l'expression de la P-gp, MRP-4 et BCRP dans des lignées de CEMVC humaines et de rats (Lim et al., 2008).

Sur la base de ces résultats, nous nous sommes intéressés au rôle de la voie de signalisation Wnt/β-cat dans la maturation et la maintenance de la BHE. En premier, nous avons établit le profil de la β-cat nucléaire au cours de la maturation. Pour la première fois, nous avons illustré une diminution de l'expression génique et protéique de la β-cat nucléaire dans les MVC au cours de la maturation (figure 5, Harati et al., 2012a). Cette diminution se produit lorsque les expressions des transporteurs P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4 sont à leurs plus hauts niveaux. Cette corrélation négative suggére un rôle potentiel de la voie de β-cat dans la régulation de des transporteurs de la BHE. Pour une meilleure démonstration du rôle de β-cat dans la régulation de la P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4, un inhibiteur de la GSK-3β , le BIO, a été administré par voie icv, et l'expression de la P-gp, bcrp, oat3 et oatp1a4 a été mesurée dans les MVC. Nous avons également mesuré l'activité de transport de ces transporteurs d'efflux/influx de la BHE, par évaluation du coefficient Kp,uu.

(ii) Chez le rat adulte, l'administration du BIO augmente l'expression de la β-cat nucléaire. Cette augmentation s'accompagne d'une augmentation de l'expression fonctionnelle de la bcrp, oat3 et oatp1a4 dans les MVC (figures 6, 7 et 8; Harati et al., 2012a). Ces données suggèrent que le traitement des animaux par BIO, qui est associée à la surexpression de β-cat nucléaire, déclenche des voies signalisations impliquées dans la régulation de l'activité des transporteurs de la BHE.

(iii) Chez le rat adulte, la modulation de la bcrp, oat3, oatp1a4 et dans une moindre mesure de la P-gp par la β-cat a été remarquablement liée à la modulation de la production d'ET-1 (figure 10 et figure 11, Harati et al., 2012 a).

Nous avons démontré que l'inhibition de la GSK-3β *in vivo* augmente l'expression de la β-cat (figure 6, Harati et al., 2012a), mais aussi celle de l'ET-1 au niveau des MVC (figure 9, Harati et al., 2012a). Ces résultats suggèrent que la régulation de la bcrp, oat3, oatp1a4 et dans une moindre mesure de la P-gp peut impliquer l'ET-1 (figures 10 et 11, Harati et al., 2012a). Pour cela nous avons étudié le rôle d'une interaction entre la signalisation Wnt/β-caténine et l'ET-1 dans la régulation des transporteurs de la BHE chez des rats adultes. L'inhibition de la GSK-3β, *in vitro* et *in vivo*, augmente l'expression génique de l'ET-1 (figure 9, Harati et al., 2012a). Fait intéressant, lorsque nous avons bloqué le récepteur ETA pour l'endothéline-1, l'activation des transporteurs médiée par la β-cat a diminué (figures 10 et 11, Harati et al., 2012a).

(iv) Chez les rats jeunes, contrairement aux adultes, l'inhibition de la GSK-3β *in vivo* diminue l'expression fonctionnelle de la bcrp, avec une tendance à la diminution pour la P-gp (figure 15 du rapport de thèse Harati, 2012).

Ces données montrent une régulation différentielle des transporteurs de médicaments dans le cerveau juvénile par comparaison aux adultes, après activation de la β-cat. Les résultats obtenus méritent d'être complétés chez les sujets jeunes. Pour cela, il serait intéressant de mesurer l'activité des transporteurs après blocage des récepteurs de l'ET-1 et activation de la β-cat. Cette information aidera à clarifier le rôle de l'interaction entre β-cat et l'ET-1 dans la régulation des transporteurs de la BHE.

Afin de vérifier si l'ET-1 est le facteur à l'origine des différences observées entre adultes et jeunes, il était important de comparer, entre les rats juvéniles et adultes, l'impact de l'ET-1 sur la régulation des transporteurs de la BHE.

2.3. Conclusion et Perspectives

En conclusion, en utilisant des modèles *ex vivo*, *in vitro* et *in vivo* de la BHE, cette étude a mis en évidence l'existence de différences fonctionnelles, en terme de passage de molécules, entre la BHE pédiatrique et celle adulte. De plus, les résultats ont mis en évidence une implication de la voie Wnt/β-caténine et l'ET-1 dans la régulation des transporteurs ABC et SLC de la barrière. Pris ensemble, ces arguments fournissent des preuves sur l'intérêt de prendre en compte les propriétés spécifiques de la BHE pédiatrique et la distinguer de la BHE adulte lors des définitions des stratégies thérapeutiques destinées à traiter les maladies cérébrales chez les enfants.

Les résultats obtenus au cours de cette étude suggèrent quelques interrogations sur les mécanismes et voies de signalisation à l'origine de la régulation différentielle entre les organismes jeunes et adultes. Des études mécanistiques complémentaires permettront de comprendre cette régulation différentielle âge-dépendante. Dans ce contexte, il est suggéré qu'une réduction sélective, dans le cortex cérébral, des facteurs de transcription impliqués pourrait diminuer l'activité des transporteurs d'efflux des médicaments au niveau de la BHE et contribuer ainsi à l'amélioration des stratégies thérapeutiques destinées à traiter les maladies du SNC chez les enfants.

3. Régulation de l'expression et l'activité de P-glycoprotéine, bcrp, oat3 et oatp1a4 de la BHE par l'inflammation cérébrale aigue induite par l'endothéline-1

Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le journal de neuroinflammation (Décembre 2012) et intitulé:

"Susceptibility of Juvenile and Adult Blood-Brain Barrier to Endothelin-1: Regulation of P-glycoprotein and Bcrp Expression and Transport Activity" (Harati et al., 2012b).

3.1. Résumé

Dans la première partie de la thèse, nous avons mis en évidence les propriétés changeantes de la BHE au cours de l'ontogenèse, ainsi qu'une régulation différentielle des transporteurs d'efflux de médicaments BBB après activation de β-cat. Nous avons supposé que les mécanismes de régulation activées dans le cerveau adulte peuvent être différents de ceux dans le cerveau juvénile, et que le facteur à l'origine de différences peut être l'ET-1, un neuropeptide-cytokine. D'autre part, plusieurs études ont fourni des preuves que l'âge pourrait influencer la réponse de l'organisme aux cytokines, qui à leur tour pourraient moduler l'expression et l'activité des transporteurs d'efflux de la BHE (Brochu et al., 2011; Miller, 2010; Salkeni et al., 2009; Stolp et Dzgieliewska, 2009; Hembury et Mabondzo, 2008; Ronaldson et Bendayan, 2006; Theron et al., 2003). Et comme dans la majorité des troubles du SNC, on note une composante inflammatoire (Miller, 2010), il est très important de comparer l'impact de l'inflammation sur la régulation des

transporteurs d'efflux de la BHE entre les différents âges. Tel était l'objectif principal de la troisième partie de la thèse.

Dans cette étude, nous avons comparé l'impact de l'inflammation cérébrale aigue induite par l'ET-1 sur la régulation des transporteurs d'efflux de la BHE entre les rats juvéniles et adultes. Plus précisément, nous avons évalué, *ex vivo* et *in vivo*, l'impact de l'injection icv de l'ET-1 sur l'expression et l'activité de deux transporteurs d'efflux cliniquement relevant, la P-gp et la bcrp. Le schéma ci-dessous présente une illustration de notre modèle expérimental:

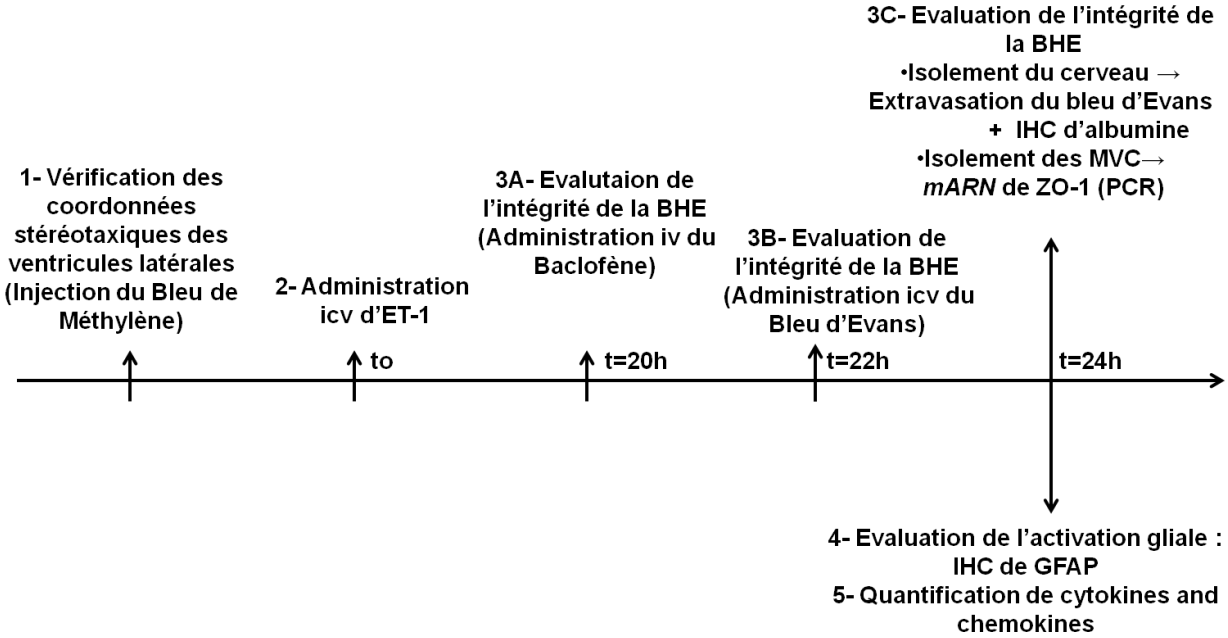

Illustration du modèle expérimental.

Des rats mâles Wistar à deux stades de la maturation cérébrale ont été utilisés dans nos expériences: Post-natal (P) P21 correspondant au stade pédiatrique et P84 correspondant au stade adulte chez l'homme. La démarche expérimentale a été articulée en plusieurs étapes: 1. Vérification des coordonnées stéréotaxiques des ventricules latérales chez les rats juvéniles et adultes: Le bleu de méthylène a été injecté par voie intracérébroventriculaire afin de visualiser l'implantation des canules d'injection dans les ventricules cérébraux latéraux. 2. Évaluation de l'intégrité de la BHE par l'évaluation du passage du Bleu d'Evans et du Baclofène ainsi que par la mesure de l'expression de l'ARNm d'une composante des JS, la ZO1: Pour ce faire, l'ET-1 (25 pmol/kg) a été administré par voie icv. Vingt-deux heures plus tard, une solution de 3% de Bleu d'Evans dissoute dans une solution saline à 0,9% a été administrée par voie intraveineuse (4ml/kg). Deux heures plus tard, les cerveaux ont été isolés et l'intégrité de la BHE a été évaluée en vérifiant l'absence de trace bleue et de l'albumine par immunohistochimie (IHC) et ceci dans le cortex et l'hippocampe. De plus, nous avons mésuré par PCR en temps réèl, l'expression génique de la ZO1 dans des MVC isolés 24h après traitement par l'ET-1. 3. Mesure de l'expression protéique de la P-gp et la bcrp dans des MVC isolés 24h après traitement par l'ET-1. 4. Mesure de l'activité de la P-gp et la bcrp, in vivo, 24h après l'injection d'ET-1: Vingt heures après le traitement par l'ET-1, des substrats pour la P-gp et la bcrp (1 mg/kg/h) ont été administrés par voie intraveineuse pendant quatre heures (état d'équilibre (stady state (ss)). Après perfusion, le sang a été prélevé, le cerveau a été isolé et les substrats administrés ont été quantifiées dans les deux compartiments par spectrométrie de masse. L'activité de transport de la P-gp et la bcrp a été estimée en évaluant le rapport entre les concentrations cérébrales libres des substrats (C) administrés et leurs concentrations plasmatiques. Ce rapport c'est le coefficient de partage, Kp, uu: Kp, uu = [Css totale, dans le cerveau / Css total, dans le plasma] x fub / fp. 5. Immunohistochimie de la GFAP (gliale fibrillaire acide Protein)), un marqueur de l'activation gliale (Raine, 1999), dans le cortex et l'hippocampe de cerveaux de rats.

Afin d'évaluer si des réponses neuro-inflammatoires différentes pourraient contribuer à une régulation différentielle des transporteurs d'efflux, des rats à P21 et P84 correspondant aux stades juvéniles et adultes respectivement chez l'humain, ont été traités par l'ET-1 par voie intracérébroventriculaire. Vingt-quatre heures après l'administration d'ET-1, nous avons mesuré l'expression protéique de la P-gp (figure 2, Harati et al, 2012b) et la bcrp (figure 3, Harati et al., 2012b) dans des MVC isolés par immunoblot, et nous évalué leur activité de transport *in vivo* en mesurant le coefficient de partition (Kp, uu cerveau) des substrats des transporteurs d'efflux (Hammarlund-Udenaes et al., 2008; Liu et al., 2005) administrée par voie intraveineuse. Nous avons constaté que dans les conditions physiologiques normales, il n'y avait pas de différences dans l'expression protéique ainsi que dans l'activité de transport de la P-gp et la bcrp entre sujets juvéniles et adultes. Toutefois, l'exposition du cerveau juvénile à faible dose d'ET-1 ne modifie pas l'activité de transport de la P-gp (figure 4, Harati et al., 2012b) et conduit à une tendance à la baisse de l'activité de la bcrp (figure 5, Harati et al., 2012b), tandis que, dans le cerveau adulte, une augmentation significative de l'activité des deux transporteurs a été observé.

Ensuite, après avoir comparé l'impact de l'ET-1 sur l'activité de transport de la P-gp et la bcrp entre sujets jeunes et adultes, nous avons cherché à comprendre les mécanismes qui sous-tendent cette régulation différentielle. Pour cela, nous avons étudié le rôle de la réponse neuro-inflammatoire déclenchée par l'ET-1, car il est probable que la sécrétion de cytokines dans le cerveau contrôle la régulation des transporteurs de la BHE et soit à l' origine de la régulation différentielle de la P-gp et la bcrp observée entre sujets juvéniles et adultes (Miller et al, 2010; Hartz et al, 2004). Pour tester cette hypothèse, nous avons étudié deux processus qui se déroulent au cours de l'inflammation: 1) L'activation gliale: par quantification de la GFAP, un marqueur de cette activation, dans l'hippocampe et le cortex de cerveau de rats traités avec l'ET-1, et 2) la sécrétion de cytokines et chemokines. Nos résultats ont montré une activation gliale prononcée dans le cortex et l'hippocampe des rats juvéniles et adultes avec une différence dans les niveaux basaux de la GFAP entre les deux âges (Figure 6; Harati et al, 2012b). Quant aux cytokines/chemokines sécrétées, nos résultats ont montré que les cytokines suivantes: IL6, IL-1β, CCL2/MCP-1, TIMP-1 et IL-10 étaient significativement augmentées dans le cerveau adulte, contrairement au cerveau juvénile (figures 7, Harati et al., 2012b). Pour mieux comprendre si les cytokines secretées sont à l'origine de la régulation différentielle de l'activité des transporteurs de la BHE entre juvéniles et adultes, nous avons augmenté la dose d'ET-1 administrée. A la dose de

125 pmol/kg d'ET-1, le cerveau juvénile présente une augmentation des IL-1β, MCP-1 et IL6 (fichier supplémentaire 2, Harati et al., 2012b). Malgré le niveau de ces cytokines dans le cerveau, nos résultats ont montré une diminution de l'activité de la bcrp. En revanche, l'augmentation de la dose d'ET-1 administrée ne change pas l'activité de la P-gp. Dans le cerveau adulte, l'activité de la P-gp et la bcrp augmente que ce soit après administration de 25 pmol / kg ou bien de 125 pmol / kg d'ET-1. Ces résultats suggèrent l'implication d'autres paramètres dans la régulation différentielle de la P-gp et la bcrp au niveau de la BHE.

Ainsi, nous avons hypothétisé que, dans des conditions inflammatoires, les transporteurs d'efflux de la BHE sont régulés de manière différente selon l'âge et ceci en raison:

1) Des propriétés différentes des composants de la BHE juvénile comparée à celle adulte, comme l'a montré notre étude de l'ontogenèse descriptive.

2) Des réponses neuro-inflammatoire différentes à cause des niveaux basaux de la GFAP différents selon les âges (figure 6; Harati et al, 2012b).

3) Des différences de maturation dans les récepteurs à l'ET-1. Pour cela, nous avons établi le profil de l'ETA, l'un des deux récepteurs à l'ET-1, au cours de la maturation du cerveau. Nos résultats ont montré des différences significatives de l'expression d'ETA dans les MVC des sujets juvénile par comparaison aux adultes (figure 17 du rapport de thèse Harati, 2012).

4) Des voies de signalisation activées différemment selon l'âge.

3.2. Résultats et Discussion

Pour récapituler, cette étude avait plusieurs principales conclusions:

(i) L'exposition du cerveau juvénile à faible dose d'ET-1 ne modifie pas l'activité de transport de la P-gp (figure 4, Harati et al., 2012b) et conduit à une tendance à la baisse de l'activité de la bcrp (figure 5, Harati et al., 2012b), tandis que, dans le cerveau adulte, une augmentation significative de l'activité des deux transporteurs a été observé.

Dans les conditions physiologiques normales, nous avons constaté qu'il n'y avait pas de différences dans l'expression protéique ainsi que dans l'activité de transport de la P-gp et la bcrp entre sujets juvéniles et adultes. En revanche, l'ET-1 augmente l'activité de transport de la P-gp et la bcrp chez l'adulte. Ces résultats sont en accord avec des études précédentes; En effet, Baeur et ses collègues (2007) ont montré qu'une exposition des MVC de rats à l'ET-1 conduit à une

augmentation de l'activité de la P-gp au niveau de la BHE (Bauer et al, 2007). Contrairement aux adultes, l'exposition du cerveau juvénile à faible dose d'ET-1 ne modifie pas l'activité de transport de la P-gp et conduit à une tendance à la baisse de l'activité de la bcrp. Ainsi, ces résultats donnent la preuve que les transporteurs P-gp et la bcrp de la BHE sont régulés différemment dans des conditions pathologiques dans le cerveau juvénile par rapport à l'adulte.

(ii) L'exposition du cerveau juvénile à faible dose d'ET-1 entraine une activation gliale prononcée dans le cortex et l'hippocampe des rats juvéniles et adultes avec une différence dans les niveaux basaux de la GFAP entre les deux âges (Figure 6; Harati et al, 2012b).

(iii) Lorsque les sujets juvéniles et adultes présentent un profil de cytokines/chemokines sécrétées similaire, l'activité des transporteurs de la BHE était toujours regulée d'une manière différente entre les deux âges. Ces résultats suggèrent l'implication des paramètres autre que la réponse inflammatoire dans la régulation différentielle de la P-gp et la bcrp au niveau de la BHE.

Ainsi, pour comprendre les mécanismes à l'origine de la régulation différentielle, plusieurs pistes méritent d'être explorées :

1) Des propriétés différentes des composants de la BHE juvénile comparée à celle adulte, comme l'a montré notre étude de l'ontogenèse descriptive.

2) Des réponses neuro-inflammatoire différentes à cause des niveaux basaux de la GFAP différents selon les âges.

3) Des différences de maturation dans les récepteurs à l'ET-1.

4) Des voies de signalisation activées différemment selon l'âge.

3.3. Conclusion et Perspectives

Cette étude a apporté la preuve d'une régulation différentielle de deux transporteurs ABC de la BHE, la P-gp et la bcrp, entre les rats juvéniles et adultes sous l'impact de l'inflammation cérébrale aigue. Ces données soulignent une fois de plus l'importance de prendre en compte les propriétés spécifiques de la BHE juvénile. Les résultats obtenus suggèrent quelques interrogations sur les mécanismes et voies de signalisation à l'origine de la régulation différentielle entre les organismes jeunes et adultes. En perspective pour ce travail, il serait

important de mener des études complémentaires dans le but de déterminer les mécanismes à l'origine de la régulation différentielle des transporteurs d'efflux de la BHE liée à l'âge.

En conclusion, notre étude a fournit des arguments sur l'intérêt de prendre en compte les propriétés spécifiques de la BHE pédiatrique et la distinguer de la BHE adulte lors des définitions des stratégies thérapeutiques destinées à traiter les maladies cérébrales chez les enfants.