



HAL
open science

Caractérisation des fonctions neuroprotectives des interfaces sang-cerveau au cours du développement normal, dans les tumeurs périventriculaires et dans un modèle d'excitotoxicité périnatale

Alexandre Vasiljevic

► **To cite this version:**

Alexandre Vasiljevic. Caractérisation des fonctions neuroprotectives des interfaces sang-cerveau au cours du développement normal, dans les tumeurs périventriculaires et dans un modèle d'excitotoxicité périnatale. Neurosciences. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1328 . tel-01757322

HAL Id: tel-01757322

<https://theses.hal.science/tel-01757322>

Submitted on 3 Apr 2018

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.



N°d'ordre NNT : xxx

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° 476
Neurosciences et Cognition

Soutenue publiquement le 21/12/2017, par :
Alexandre Vasiljevic

Caractérisation des fonctions neuroprotectives des interfaces sang-cerveau au cours du développement normal, dans les tumeurs périventriculaires et dans un modèle d'excitotoxicité périnatale

Devant le jury composé de :

Guibaud, Laurent PU-PH, Faculté de médecine Lyon Est

Président

Adle-Biasette, Homa PU-PH, Faculté de médecine Paris 7

Rapporteuse

Maurage, Claude-Alain PU-PH, Faculté de médecine de Lille

Rapporteur

Marquette, Christel Chargée de recherche, CEA

Examinatrice

Gherzi-Egea, Jean-François DR, INSERM

Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. X. PERROT

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Directeur : Mme C. FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE

REMERCIEMENTS

A Jean-François Gherzi-Egea, mon directeur de thèse. Je souhaitais te remercier pour ta patience, ton encadrement et ton soutien tout au long de ces années. Par sa nature translationnelle et collaborative, ce travail de thèse illustre bien la dynamique de l'équipe que tu diriges et l'intérêt qu'ont les interactions étroites entre le monde médical et le monde scientifique. J'espère pouvoir dans le futur continuer à collaborer avec ton équipe au « démantèlement » des interfaces sang-cerveau.

A Anne Juvet et Michelle Fèvre-Montange. Vous m'avez mis le pied à l'étrier « scientifique ». Veuillez trouver ici l'expression de ma toute ma gratitude et de toute mon amitié.

A l'ensemble de mon jury, le Pr Homa Adle-Biassette, le Pr Claude-Alain Maurage, le Pr Laurent Guibaud et Madame Christel Marquette, chargée de recherche au CEA. Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie l'ensemble de l'équipe FLUID, Nathalie, Ingrid, Sandrine, Elodie et tous ceux sans qui ce travail n'aurait pu voir le jour.

A Olivier, pour son soutien indéfectible.

Table des matières

| | |
|--|-----------|
| Liste des figures | 6 |
| Liste des tableaux | 9 |
| Abréviations | 10 |
| INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE | 11 |
| PARTIE I: Les interfaces cellulaires d'échanges au sein du système nerveux central chez l'adulte et au cours du développement | 12 |
| I) Généralités et fonctions | 12 |
| II) Mécanismes de barrière..... | 15 |
| III) La barrière hémato-encéphalique | 16 |
| 1) Structure | 16 |
| 2) Transports à travers la barrière hémato-encéphalique..... | 18 |
| IV) La barrière sang-LCR | 19 |
| 1) Barrière sang-LCR « interne » : les plexus choroïdes..... | 19 |
| 2) La barrière sang-LCR « externe » : le revêtement arachnoïdien | 21 |
| V) Interface parenchyme cérébral-LCR | 22 |
| 1) Interface parenchyme cérébral-LCR « interne » : le revêtement épendymaire..... | 22 |
| 2) Interface parenchyme cérébral-LCR « externe » : la glie limitans | 23 |
| VI) Particularités des organes circumventriculaires | 23 |
| 1) Définition et généralités..... | 23 |
| 2) Classification fonctionnelle des organes circumventriculaires | 26 |
| a) Les OCV sensitifs | 27 |
| b) Les OCV sécrétoires | 27 |
| 3) Cas particulier de l'organe sous-commissural | 28 |
| a) Aspect de l'OSC chez l'embryon et le fœtus humain..... | 31 |
| b) Aspect de l'OSC chez le nouveau-né | 31 |
| c) Aspect de l'OSC chez l'enfant..... | 31 |
| d) Aspect de l'OSC chez l'adulte..... | 31 |
| VII) Les barrières du SNC au cours du développement | 32 |
| 1) Généralités | 32 |
| 2) Barrière hémato-encéphalique au cours du développement | 34 |
| 3) Barrière sang-LCR..... | 35 |
| PARTIE 2 : Barrière physique moléculaire: les jonctions serrées | 37 |
| I) Introduction : les différents types de systèmes jonctionnels cellulaires..... | 37 |
| II) Généralités sur les jonctions serrées | 38 |
| 1) Fonctions et aspect général des jonctions serrées..... | 38 |
| 2) Propriétés physiques des jonctions serrées..... | 41 |
| 3) Constitution moléculaire des jonctions serrées | 42 |
| III) Les claudines : | 43 |
| 1) Les claudines : structure et fonctions..... | 43 |
| 2) Interactions entre claudines : | 45 |
| 3) Distribution des claudines dans les tissus | 46 |

| | |
|--|-----------|
| IV) Barrière hémato-encéphalique et claudines : ce qui est connu..... | 46 |
| V) Barrière sang-LCR et claudines : ce qui est connu | 47 |
| PARTIE III: JONCTIONS SERREES ET PATHOLOGIE..... | 51 |
| I) Tumeurs périventriculaires du SNC : origine cellulaire et difficultés diagnostiques..... | 51 |
| 1) Définition..... | 51 |
| 2) L'exemple de la tumeur papillaire de la région pinéale | 52 |
| 3) Tumeur papillaire de la région pinéale et jonctions serrées | 56 |
| II) Atteinte hypoxo-ischémique périnatale | 56 |
| 1) Généralités..... | 56 |
| 2) Excitotoxicité et encéphalopathie hypoxo-ischémique..... | 58 |
| 4) Agents neuroprotecteurs..... | 60 |
| 5) Intérêt de l'étude des jonctions serrées dans les atteintes hypoxo-ischémiques et hémorragiques périnatales | 61 |
| PARTIE IV : BARRIERE ENZYMATIQUE: ENZYMES DE DETOXIFICATION..... | 62 |
| I) Généralités sur les mécanismes enzymatiques de détoxification des xénobiotiques :.... | 62 |
| II) Enzymes de détoxification et interfaces sang-cerveau..... | 64 |
| a) Au niveau de la barrière hémato-encéphalique..... | 65 |
| b) Au niveau de la barrière sang-LCR (plexus choroïdes) | 66 |
| c) Système anti-oxydant | 67 |
| III) Exemple des époxyde hydrolases | 68 |
| a) Généralités | 68 |
| b) Les époxydes hydrolases au niveau des interfaces sang-cerveau | 70 |
| i) Chez le rongeur | 70 |
| ii) Chez l'homme..... | 71 |
| IV) Enzymes de détoxification et interfaces sang-cerveau au cours du développement | 72 |
| OBJECTIFS | 73 |
| ETUDE 1 : Analyse de l'expression des claudines au niveau de la barrière sang-LCR au cours du développement chez le rat et chez l'homme | 74 |
| ETUDE 2 : Analyse des modifications de la barrière hémato-encéphalique et de la barrière sang-LCR dans un modèle d'excitotoxicité néonatale | 74 |
| ETUDE 3 : Analyse de l'expression des claudines dans l'organe sous-commissural chez l'homme. Evaluation de leur intérêt dans le diagnostic des tumeurs périventriculaires.... | 75 |
| ETUDE 4 : Analyse de l'expression d'enzymes de détoxification dans l'encéphale fœtal humain | 76 |
| MATERIEL ET METHODES | 77 |
| 1) Prélèvements d'origine humaine..... | 78 |
| a) Plexus choroïdes fœtaux humains..... | 78 |
| b) Tumeurs périventriculaires | 79 |
| 2) Animaux et prélèvements d'origine animale | 79 |
| a) Animaux utilisés | 79 |
| b) Génération des lésions excitotoxiques | 80 |
| c) Prélèvements tissulaires | 81 |

| | |
|--|------------|
| 3) Analyse histologique standard | 82 |
| 4) Microscopie électronique..... | 82 |
| 5) Analyse par immunofluorescence | 83 |
| 6) Analyse immunohistochimique | 84 |
| 7) Western Blot..... | 86 |
| 8) RT-PCR quantitative | 87 |
| RESULTATS..... | 90 |
| Résultats Etude 1 | 90 |
| 1) Introduction..... | 91 |
| 2) Analyse morphologique des plexus choroïdes fœtaux humains en coloration standard HES | 94 |
| 3) Expression des claudines 1, 2 et 3 dans les plexus choroïdes au cours du développement chez le rat et chez l'homme..... | 95 |
| a) CLAUDINE 1 (CLDN1) | 95 |
| b) CLAUDINE 2 (CLDN2) | 98 |
| c) CLAUDINE 3 (CLDN3)..... | 101 |
| 4) Expression d'autres claudines d'intérêt (CLDN5 et CLDN11) dans les plexus choroïdes au cours du développement chez le rat et chez l'homme | 104 |
| a) CLAUDINE 5 (CLDN5) | 104 |
| b) CLAUDINE 11 (CLDN11)..... | 107 |
| 5) DISCUSSION | 109 |
| Résultats Etude 2 | 113 |
| 1) Introduction..... | 114 |
| 2) Résumé des travaux de R.Moretti et ses collègues | 114 |
| 3) Altérations morphologiques en HPS (hématoxyline, phloxine, safran)..... | 115 |
| 4) Analyse de l'expression de la claudine 5 (CLDN5) et de la claudine 2 (CLDN2) par immunohistochimie : | 118 |
| 5) DISCUSSION | 120 |
| Résultats Etude 3 | 124 |
| 1) Données cliniques | 125 |
| 2) Histopathologie | 125 |
| 3) Microscopie électronique..... | 131 |
| 4) Analyse immunohistochimique | 133 |
| 5) Expression des claudines dans l'organe sous-commissural, le neuro-épendyme et les plexus choroïdes chez le fœtus humain | 137 |
| 6) Expression des claudines (CLDN) dans différentes tumeurs périventriculaires | 140 |
| 7) DISCUSSION | 144 |

| | |
|--|------------|
| Résultats Etude 4 | 151 |
| 1) Epoxyde hydrolase microsomale (EPHX1)..... | 152 |
| 2) Glutathion peroxydase (GPx1)..... | 153 |
| 3) Glutathion Réductase (GR) | 153 |
| 4) Glutathion-S-transférase (GST) mu1/2 | 153 |
| 5) Glutathion-S-transférase (GST) mu5 | 154 |
| 6) DISCUSSION | 157 |
| DISCUSSION GENERALE | 159 |
| I - L'interface sang-cerveau (plexus choroïde) au cours du développement : barrière immature ou complexe hautement régulé ?..... | 160 |
| II- Les claudines : intérêt dans le domaine de la neuropathologie tumorale..... | 162 |
| Conclusions et perspectives : | 165 |
| Références | 166 |
| Résumé..... | 175 |

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1. Vue d'ensemble des différentes interfaces du système nerveux central | 14 |
| Figure 2. Mécanismes généraux des barrières biologiques | 16 |
| Figure 3. Détails de la barrière hémato-encéphalique | 17 |
| Figure 4. Barrière sang-LCR « interne » au niveau des plexus choroïdes | 19 |
| Figure 5. Barrière sang-LCR externe ou barrière arachnoïdienne/méningée | 21 |
| Figure 6. Barrière épendymaire | 22 |
| Figure 7. Organes circumventriculaires (OCV) | 24 |
| Figure 8. Organisation schématique d'un organe circumventriculaire « standard » | 25 |
| Figure 9. Position anatomique de l'organe sous-commissural | 29 |
| Figure 10. Les 5 principaux types de jonctions au niveau des cellules intestinales | 38 |
| Figure 11. Polarisation de la cellule grâce aux jonctions serrées | 39 |
| Figure 12. Barre terminale | 40 |
| Figure 13. Morphologie en microscopie électronique de différents types de jonctions dans l'épithélium intestinal du hamster | 41 |
| Figure 14. Jonction serrée : composition moléculaire schématique | 42 |
| Figure 15. Structure moléculaire schématique des claudines | 45 |
| Figure 16. IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) d'une tumeur papillaire de la région pinéale | 52 |
| Figure 17. Histopathologie et profil immunohistochimique de la tumeur papillaire de la région pinéale (TPRP) | 54 |
| Figure 18. Distribution caractéristique des lésions de leucomalacie périventriculaire « kystique » | 59 |
| Figure 19. Métabolisme des xénobiotiques | 64 |
| Figure 20. Profil d'expression génique de CLDN1, CLDN 2 et CLDN 3 au cours du développement dans les plexus choroïdes de rat | 92 |

| | |
|---|---------|
| Figure 21. Profil d'expression génique de CLDN5, CLDN6 et CLDN11 au cours du développement dans les plexus choroïdes de rat | 93 |
| Figure 22. Aspect histologique des plexus choroïdes chez le fœtus humain | 94 |
| Figure 23. Analyse en Western Blot et distribution cellulaire de CLDN1 dans le plexus choroïde de rat au cours du développement | 96 |
| Figure 24. Expression immunohistochimique de CLDN1 dans les plexus choroïdes humains au cours du développement | 97 |
| Figure 25. Expression différentielle de CLDN2 dans les plexus choroïdes durant le développement cérébral chez le rat | 99 |
| Figure 26. Expression immunohistochimique de CLDN2 dans les plexus choroïdes humains au cours du développement. | 100 |
| Figure 27. Western blot et distribution cellulaire de CLDN3 dans les plexus choroïdes et le parenchyme cérébral du rat au cours du développement | 102 |
| Figure 28. Expression immunohistochimique de CLDN3 dans les plexus choroïdes humains au cours du développement | 103 |
| Figure 29. CLDN5 est exprimée dans les cellules endothéliales de l'encéphale en développement | 105 |
| Figure 30. Expression immunohistochimique de CLDN5 dans les plexus choroïdes humains au cours du développement | 106 |
| Figure 31. Immunoexpression de CLDN11 dans le cerveau fœtal humain | 107 |
| Figure 32. Sections coronales d'encéphale de rat après injection d'iboténate, sans et avec traitement par la mélatonine | 117-118 |
| Figure 33. Immunoexpressions de la CLDN2 et de CLDN5 dans les encéphales de rat après injection d'iboténate, avec et sans traitement par mélatonine | 119-120 |
| Figure 34. Architecture des TPRP | 126 |
| Figure 35. Vascularisation dans les TPRP | 127 |
| Figure 36. Espaces clairs périvasculaires dans les TPRP | 128 |
| Figure 37. Signes histopathologiques d'agressivité dans les TPRP | 130 |
| Figure 38. Caractéristiques ultrastructurales des TPRP (1) | 132 |
| Figure 39. Caractéristiques ultrastructurales des TPRP (2) | 133 |

| | |
|--|-----|
| Figure 40. Immunophénotypage des TPRP | 136 |
| Figure 41. Organe sous-commissural fœtal | 137 |
| Figure 42. Organe sous-commissural (OSC) fœtal et expression des claudines | 138 |
| Figure 43. Neuroépithélium fœtal et expression des claudines | 139 |
| Figure 44. Plexus choroïdes et expression des claudines | 139 |
| Figure 45. Immunomarquages anti-CLDN1 et anti-CLDN2 dans les TPRP | 141 |
| Figure 46. Immunomarquages anti-CLDN1 et anti-CLDN2 dans les épendymomes | 142 |
| Figure 47. Immunomarquages anti-CLDN1 et anti-CLDN2 dans les papillomes des plexus choroïdes | 143 |
| Figure 48. Expression de EPHX1 chez le fœtus à 22 SA et chez le nourrisson de 2 mois | 155 |
| Figure 49. Expression de GPx1, de GR et de GST mu5 chez le fœtus à 22 SA | 156 |

Liste des tableaux

| | |
|---|-----|
| Tableau 1. Différences principales entre un organe circumventriculaire (OCV) standard et la barrière hémato-encéphalique (BHE) | 26 |
| Tableau 2. Organes circumventriculaires | 28 |
| Tableau 3. Barrière sang-LCR et claudines | 49 |
| Tableau 4. Composition moléculaire en claudines des 2 principales interfaces du SNC | 50 |
| Tableau 5. Différences immunohistochimiques générales entre l'épendymome, le papillome des plexus choroïdes et la tumeur papillaire de la région pinéale (TPRP) | 55 |
| Tableau 6. Techniques suivant les études | 77 |
| Tableau 7. Matériel fœtal humain | 78 |
| Tableau 8. Anticorps primaires utilisés dans les différentes études | 85 |
| Tableau 9. Expression immunohistochimique de CLDN1, CLDN2 et CLDN3 dans les plexus choroïdes fœtaux au cours du développement | 108 |
| Tableau 10. Analyse immunohistochimique des TPRP | 135 |
| Tableau 11. Résumé des données immunohistochimiques de CLDN1, CLDN2 et CLDN3 sur les tissus tumoraux et fœtaux | 143 |
| Tableau 12. Analyse immunohistochimique des enzymes Epoxyde hydrolase microsomale (EPHX1), Glutathion peroxydase (GPx1), Glutathion Réductase (GR) et Glutathion-S-transférases (GST) mu1/2 et mu5 dans le cerveau humain | 154 |

Abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : acide ribonucléique
BEC : boucle extracellulaire
BHE : barrière hémato-encéphalique
CLDN : claudine
CYP: cytochrome P450
EH : époxyde hydrolase
EHm ou EPHX1 : époxyde hydrolase microsomale
EHs : époxyde hydrolase soluble
GPx: glutathione peroxydase
GR: glutathione réductase
GST : glutathion-S-transférase
HPS: Hématoxyline-Phloxine-Safran
JAM : Junctional Adhesion Molecule
LCR : liquide céphalo-rachidien
LPV: leucomalacie périventriculaire
OCV : organe circumventriculaire
OSC : organe sous-commissural
PC : plexus choroïdes
SNC : système nerveux central
SULT: sulfo-transférase
TPRP : tumeur papillaire de la région pinéale
V3 : 3^{ème} ventricule
V4 : 4^{ème} ventricule
VL : ventricule latéral
ZO : zonula occludens

INTRODUCTION

BIBLIOGRAPHIQUE

PARTIE I: Les interfaces cellulaires d'échanges au sein du système nerveux central chez l'adulte et au cours du développement

I) Généralités et fonctions

Pour assurer leurs fonctions, les cellules du système nerveux central (SNC) nécessitent un microenvironnement finement régulé. Le fonctionnement des neurones et notamment la génération et la transmission des potentiels d'action sont dépendants de concentrations précises et stables d'ions inorganiques. Le maintien de cet environnement est rendu possible par la présence de plusieurs interfaces entre les différents compartiments du SNC (Saunders NR et al, 2016). Ces interfaces sont les suivantes (Fig.1):

- Entre le parenchyme cérébral et le sang au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux, se situe la **barrière hémato-encéphalique**. Cette barrière est présente dans l'ensemble du SNC excepté dans certaines structures spécialisées dénommées « organes circumventriculaires ».
- Entre le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le sang se situe la **barrière sang-LCR**. Cette dernière présente 2 composantes :
 - L'épithélium des plexus choroïdes qui est en contact avec le LCR du système ventriculaire (LCR « interne »).
 - Le revêtement arachnoïdien qui est en contact avec le LCR de l'espace sous-arachnoïdien et des citernes (LCR « externe »).

- Entre le parenchyme cérébral et le LCR, se situent :
 - L'interface épendymaire séparant le tissu cérébral du LCR ventriculaire ou LCR « interne ».
 - La glie limitans séparant le tissu cérébral du LCR « externe », sous-arachnoïdien et cisternal.

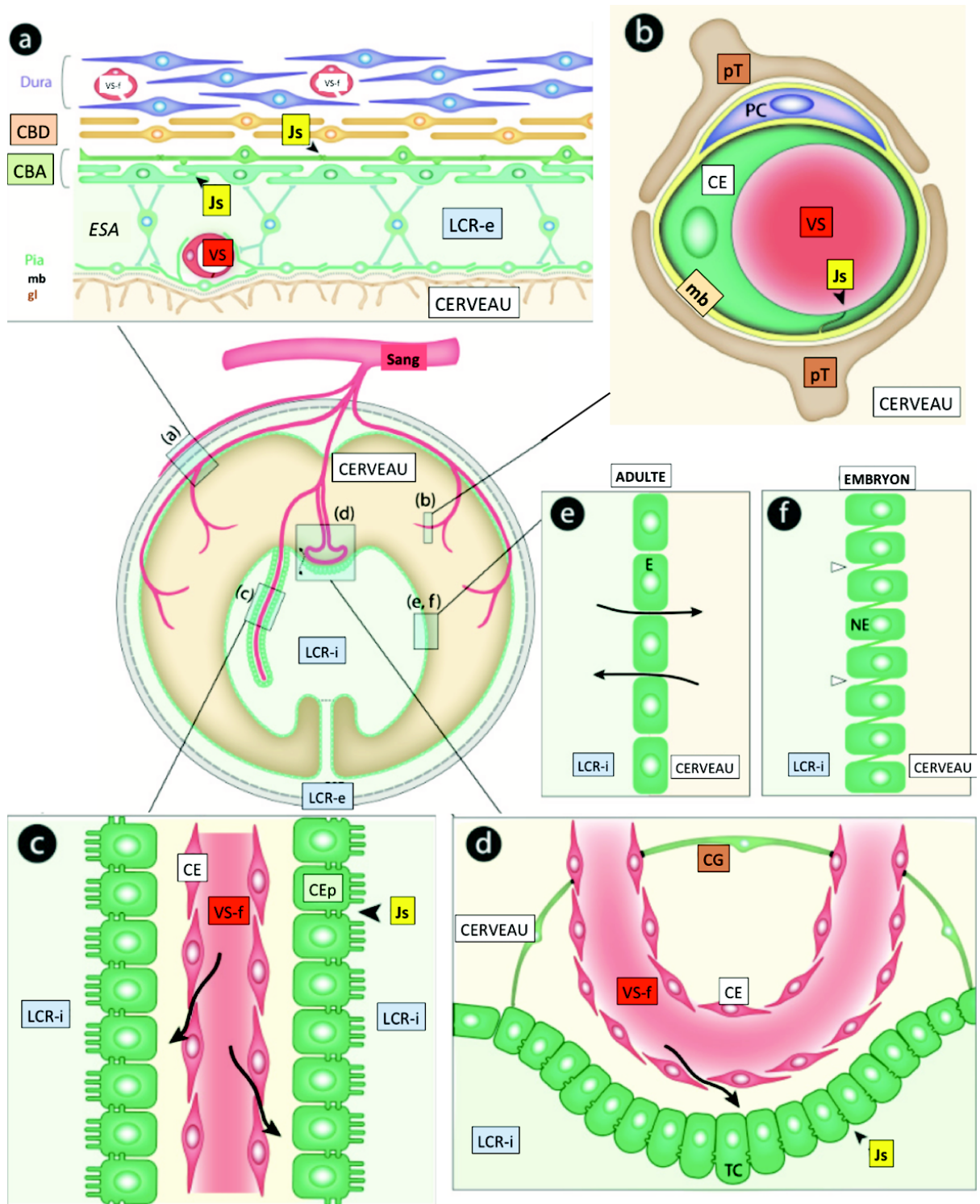


Figure 1. Vue d'ensemble des différentes interfaces du système nerveux central (modifiée d'après Saunders NR et al, 2016)

- a) La barrière méningée sang-LCR-cerveau, externe.
- b) La barrière hémato-encéphalique.
- c) La barrière sang-LCR.
- d) Organe circumventriculaire.
- e) La barrière LCR-cerveau, interne/ ou barrière épendymaire chez l'adulte.
- f) La barrière LCR-cerveau, interne/ ou barrière épendymaire chez l'embryon.

II) Mécanismes de barrière

Pour assurer une fonction de barrière entre milieu « intérieur » et milieu « extérieur » vis-à-vis d'une molécule X, une interface cellulaire dispose de plusieurs moyens (Fig.2) :

a) Obstacle physique :

Des jonctions serrées entre 2 cellules empêchent ou régulent le passage paracellulaire de X à travers l'interface.

b) Efflux :

La molécule X pénètre dans la cellule mais est prise en charge par un transporteur qui la reflue dans le milieu « extérieur » (exemple : transporteurs ATP-Binding Cassette ABC) (Saunders NR et al, 2016).

c) Transformation enzymatique :

La molécule X est prise en charge par une enzyme cellulaire qui modifie sa structure en une molécule Y. Au final, la molécule X n'a pas traversé l'interface.

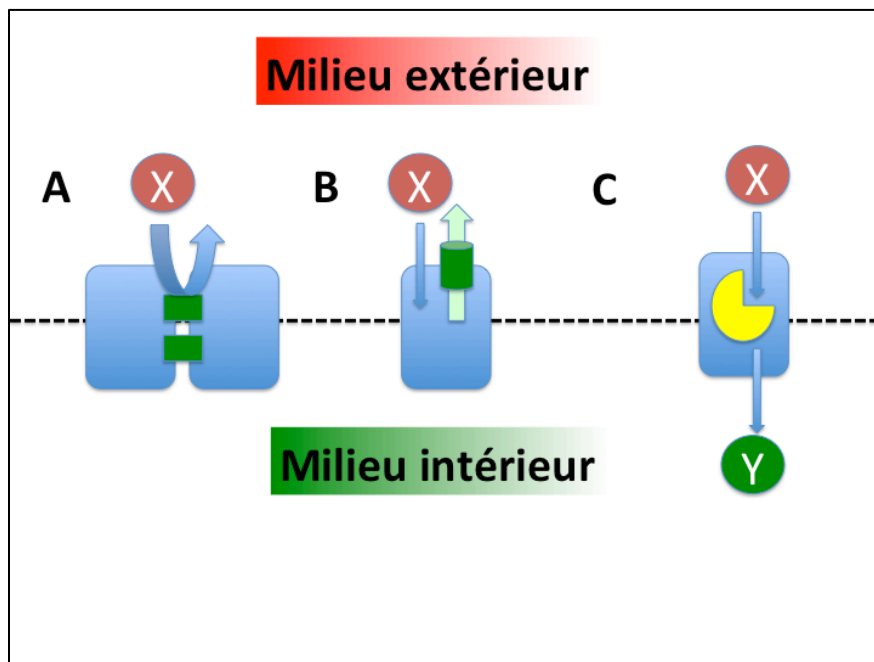


Figure 2. Mécanismes généraux des barrières biologiques

A- Barrière « physique » : des jonctions serrées empêchent le passage paracellulaire de la molécule X.

B- Barrière d'efflux : un transporteur d'efflux refoule la molécule X dans le milieu d'où elle provient.

C- Barrière « enzymatique » : une enzyme intracellulaire transforme la molécule X en molécule Y, empêchant *de facto* le passage de X à travers la barrière.

III) La barrière hémato-encéphalique

1) Structure

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est une barrière de diffusion essentielle au bon fonctionnement du SNC. La BHE est constituée, d'interne en externe, d'une couche continue de cellules endothéliales, de la membrane basale capillaire, des péricytes et des pieds astrocytaires (Serlin Y et al, 2015) (Fig.3). Les astrocytes assurent une connexion avec les neurones environnants. Des cellules microgliales (microglie), macrophages résidents du SNC, sont présentes dans les régions périvasculaires. L'ensemble constitué par un capillaire cérébral et les cellules qui lui sont associées (péricytes, astrocytes, neurones, microglie) constitue « l'unité neuro-vasculaire ».

Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées. Elles empêchent « physiquement » le passage des molécules entre les cellules (voie paracellulaire) en constituant un obstacle à leur diffusion. Sur le plan moléculaire, ces jonctions sont notamment constituées de la claudine 5, de ZO-1 (Zonula Occludens 1) et JAM-1 (Junctional Adhesion Molecule 1) (Haseloff RF et al, 2015). La membrane basale de l'endothélium mesure 30 à 40 nm d'épaisseur. Elle est riche en collagène IV et englobe les péricytes. Ces derniers participent au maintien de l'intégrité structurale du capillaire et ont un rôle de modulation du débit sanguin cérébral par leur action sur le diamètre de la lumière vasculaire (Ballabh P et al, 2004 ; Serlin Y et al, 2015). Les astrocytes assurent des interactions complexes avec l'endothélium des capillaires cérébraux et participent ainsi au maintien de la BHE.

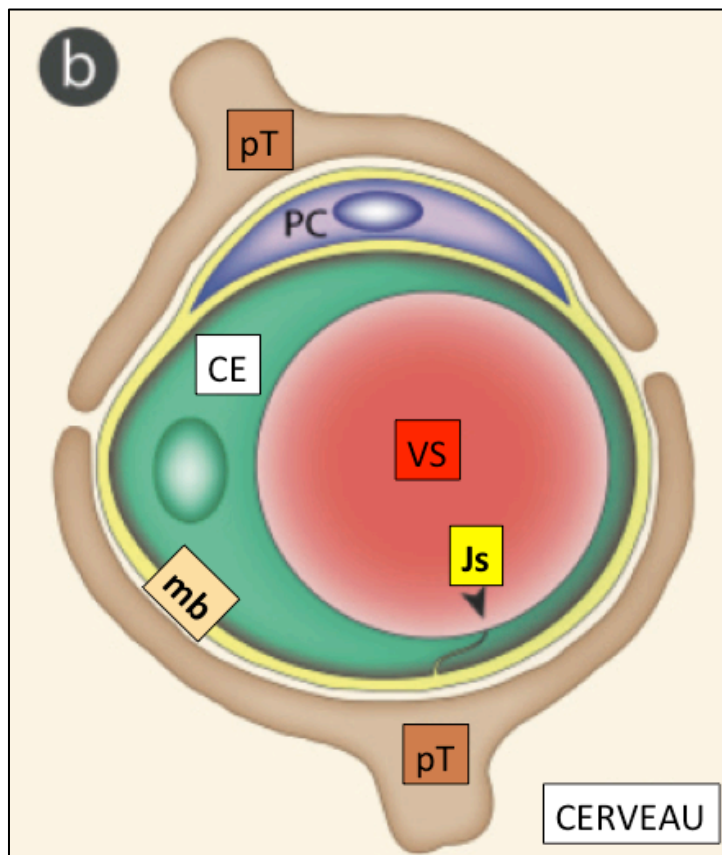


Figure 3. Détails de la barrière hémato-encéphalique

(modifiée d'après Saunders NR et al, 2016)

Elle se situe entre la lumière des capillaires cérébraux (VS) et le parenchyme cérébral (cerveau). Les cellules endothéliales (CE) sont unies entre elles sur leur versant luminal par des jonctions serrées (Js) qui forment une barrière physique empêchant le passage paracellulaire des molécules entre le sang et le parenchyme cérébral. Elles sont bordées par une membrane basale (mb) qui englobe des péricytes (PC). Les pieds astrocytaires terminaux (pT) sont étroitement associés aux capillaires cérébraux.

2) Transports à travers la barrière hémato-encéphalique

Les facteurs déterminants pour la pénétration d'une molécule dans le SNC sont sa liposolubilité et son poids moléculaire (Saunders NR et al, 1999). De manière générale, les molécules liposolubles et les molécules de bas poids moléculaire pénètrent plus facilement la BHE. Le passage des peptides et protéines, molécules hydrophiles et fréquemment de haut poids moléculaire, à travers la BHE est donc très limité (Serlin Y et al, 2015). Néanmoins, un grand nombre de molécules lipophiles, notamment des médicaments, ont un passage limité dans le tissu nerveux. Ceci peut être expliqué par la présence de transporteurs d'efflux permettant le reflux de certaines molécules vers le sang (famille des transporteurs ABC). Les acides aminés, les nucléosides et le glucose pénètrent le tissu nerveux par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques (Serlin Y et al, 2015). Des macromolécules comme l'insuline ou les LDL (lipoprotéines de basse densité) atteignent le SNC par un mécanisme de transcytose médiée par récepteurs. Le passage par mécanisme de transcytose absorbative est plus rare et implique la fixation de molécules cationiques dans une vésicule bordée d'un glycocalyx chargé négativement (Hervé F et al, 2008). Ce type de transport peut concerner les lectines. La présence de jonctions serrées intercellulaires limite drastiquement la voie de transport paracellulaire/intercellulaire (entre les cellules). La modulation locale de ces jonctions serrées pourrait de façon très marginale autoriser un passage paracellulaire partiel pour des agents hydrosolubles.

IV) La barrière sang-LCR

1) Barrière sang-LCR « interne » : les plexus choroïdes

Dans son acception la plus étendue, le terme « barrière sang-LCR » fait référence à la barrière sang-LCR « interne », c'est-à-dire les plexus choroïdes (Fig.4).

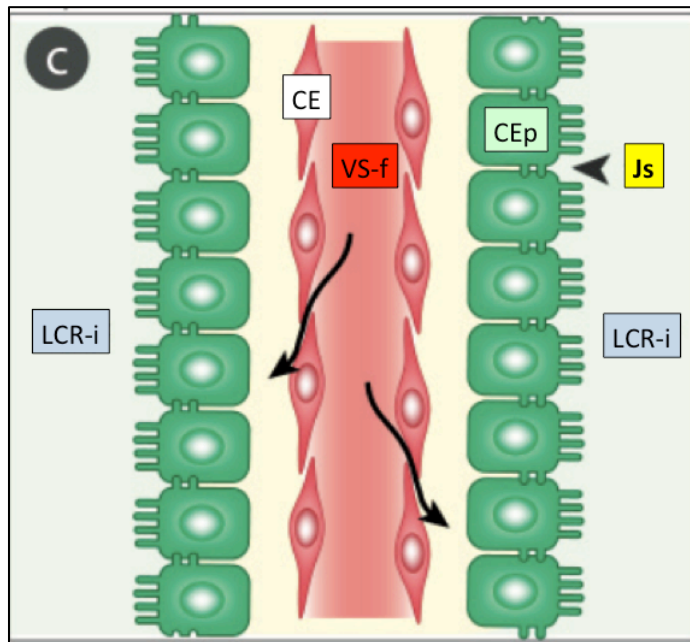


Figure 4. Barrière sang-LCR « interne » au niveau des plexus choroïdes (modifiée d'après Saunders NR et al, 2016)

Elle se situe entre les capillaires des plexus choroïdes et le LCR des ventricules (LCR « interne » ou LCR-i). Les capillaires des plexus choroïdes sont fenêtrés (VS-f) et sont donc par définition permmissifs pour les échanges (flèches). Les cellules épithéliales choroïdiennes (CEp) sont unies entre elles, à leur pôle apical, par un système de jonctions serrées interdisant le passage libre de molécules (Js). CE : cellule endothéliale.

Les plexus choroïdes sont des structures papillaires situés dans chaque cavité ventriculaire : les ventricules latéraux, le 3^{ème} ventricule et le 4^{ème} ventricule. Ils sont responsables de la sécrétion du LCR (Wolburg et Paulus, 2010). Chaque papille est revêtue d'un épithélium de cellules choroïdiennes surmontant un axe mésenchymateux lâche vascularisé par des capillaires fenêtrés. Contrairement aux capillaires continus de la BHE, ces capillaires permettent le passage libre des macromolécules dans l'espace interstitiel de l'axe mésenchymateux par l'intermédiaire de « pores » revêtus ou non d'un diaphragme. La fonction de barrière des plexus choroïdes ne se situe donc pas à ce niveau. Elle est « reportée » au niveau de l'épithélium choroïdien qui se distingue de l'épendyme adjacent par la présence de jonctions serrées intercellulaires formant une

barrière moléculaire entre le sang et le LCR et par un pôle apical riche en microvillosités mais pauvre en cils (Wolburg H et Paulus W, 2010).

Les cellules épithéliales choroïdiennes ont un rôle important dans la production du LCR (Damkier HH et al, 2013). De manière schématique, les flux des ions Na^+ , HCO_3^- et Cl^- et le flux d'eau se dirigent du sang vers le LCR (sécrétion) alors que le flux de K^+ se dirige du LCR vers le sang (absorption). Comme dans d'autres épithéliums sécrétoires, les transports transcellulaires des ions Na^+ et Cl^- au niveau des cellules épithéliales choroïdiennes permettent de générer un gradient osmotique qui va entraîner la sécrétion d'eau par le plexus choroïde. L'anhydrase carbonique est une enzyme catalysant la transformation de l'eau et du CO_2 en HCO_3^- et H^+ . Le rôle de cette enzyme dans la production du LCR a été souligné par l'effet bénéfique de l'acétazolamide (DIAMOX), une molécule inhibitrice de l'anhydrase carbonique de type II, sur les signes d'hypertension intracrânienne des patients atteints d'hydrocéphalie. L'aquaporine de type 1 est située sur la membrane apicale des cellules épithéliales choroïdiennes. Les ATPases Na^+/K^+ sont des pompes énergie-dépendantes localisées au pôle apical des cellules choroïdiennes. Elles assurent la sécrétion du Na^+ dans le LCR et l'absorption du K^+ vers le sang. La concentration de K^+ dans le LCR est finement régulée et résulte du rapport entre des mouvements de sécrétion et d'absorption. Le flux sécrétoire de K^+ vers le LCR se ferait en partie par la voie paracellulaire par l'intermédiaire de la claudine 2. L'absorption serait principalement médiée par l'ATPase Na^+/K^+ apicale. Le K^+ absorbé dans la cellule serait en grande partie recyclé au niveau de la lumière apicale par le moyen de canaux potassiques. Une partie seulement traverserait la membrane basolatérale par un canal, le KCC3A. La sécrétion d'eau se réalise par voie transcellulaire par l'intermédiaire de l'aquaporine 1 apicale suivant le gradient osmotique.

2) La barrière sang-LCR « externe » : le revêtement arachnoïdien

Les méninges sont formées de 3 couches principales : la pie-mère, l'arachnoïde et la dure-mère (d'interne en externe). La dure-mère est aussi appelée « pachyméninge ». L'ensemble pie-mère et arachnoïde est aussi appelé « leptoméninge ». La face interne de la dure-mère, formée de cellules bordantes (cellules bordantes duremériennes CBD, voir Fig.5), est tapissée d'une couche de cellules arachnoïdiennes reliées les unes aux autres par des jonctions serrées (Brøchner et al, 2015). C'est cette couche de cellules, appelées cellules de la barrière arachnoïdienne (CBA, voir Fig.5), qui assure une fonction de barrière physique entre le sang des capillaires fenêtrés de la dure-mère et le LCR des espaces sous-arachnoïdiens (ou LCR « externe »). La claudine 11 serait un constituant important des jonctions serrées de la barrière arachnoïdienne et serait présente déjà précocement durant le développement (Brøchner et al, 2015).

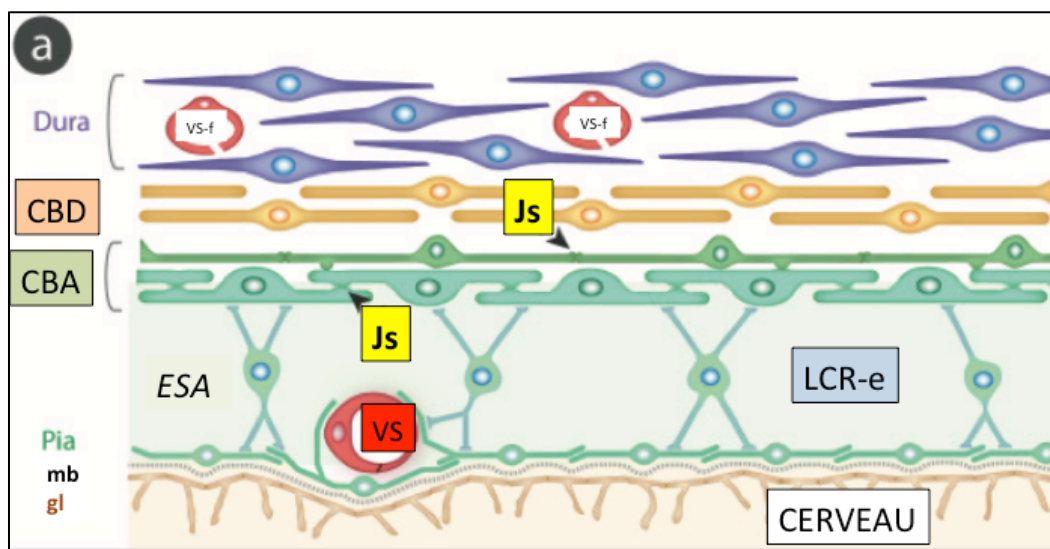


Figure 5. Barrière sang-LCR externe ou barrière arachnoïdienne/méningée (modifiée d'après Saunders NR et al, 2016)

Cette barrière est complexe et formée par la couche externe de l'arachnoïde située en dessous de la couche bordante duremérienne (CBD). Cette couche externe est formée de cellules liées entre elles par des jonctions serrées, les cellules de la barrière arachnoïdienne (CBA). Elles forment une barrière physique entre le LCR de l'espace sous-arachnoïdien (ESA) ou LCR-externe (LCR-e) et les vaisseaux fenêtrés (VS-f) de la dure-mère (Dura).

La glie limitans (gl) constitue une barrière entre le parenchyme cérébral et le LCR-e. Elle est formée de pieds astrocytaires reposant sur une membrane basale (mb).

V) Interface parenchyme cérébral-LCR

1) Interface parenchyme cérébral-LCR « interne » : le revêtement épendymaire

L'épendyme est un revêtement situé à l'interface entre le parenchyme cérébral et le système ventriculaire rempli de LCR (LCR « interne »). Il dérive du neuroépithélium de la zone ventriculaire (Jiménez AJ et al, 2014 ; Lehman NL, 2008a). Chez le fœtus, l'épendyme en voie de développement étant intriqué avec le neuroépithélium, le terme « neuro-épendyme » sera utilisé.

Une barrière LCR-cerveau est présente précocement à ce niveau au cours du développement (Whish S et al, 2015) (Fig.6). Elle interdit initialement le passage de molécules de petite taille (286 Da) puis autorise progressivement le passage de molécules de plus grande taille. Chez l'adulte, cette barrière n'existe plus et il n'y a donc plus de restriction de passage à ce niveau. Cette restriction de diffusion au stade fœtal peut-être expliquée par la présence transitoire de jonctions spécifiques nommées jonctions « strap » ou jonctions « en bretelles ». Ces jonctions diffèrent des jonctions serrées classiques « en ceinture » et seraient constituées de différentes molécules comprenant des caténines, des cadhérines et la claudine 5 (Whish S et al, 2015).

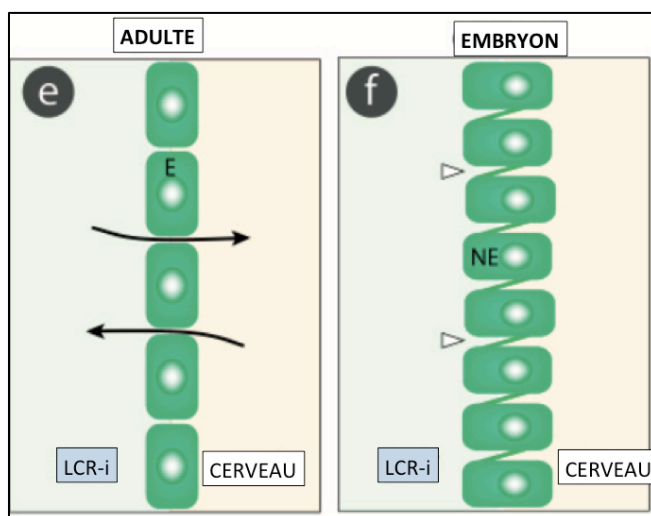


Figure 6. Barrière épendymaire

(modifiée d'après Saunders NR et al, 2016)

Une véritable barrière épendymaire n'est présente que durant la période de développement. Elle constitue une barrière entre le LCR du système ventriculaire ou LCR « interne » (LCR-i) et le parenchyme cérébral (cerveau). Les cellules neuro-épendymaires sont reliées entre elles par un système particulier de jonctions « en bretelles » (« strap junctions »).

2) Interface parenchyme cérébral-LCR « externe » : la glie limitans

La glie limitans est une couche gliale située à l'interface entre le parenchyme cérébral et le LCR des espaces sous-arachnoïdiens et citernes (LCR « externe ») (Sofroniew MV, 2015). Elle est formée par l'apposition de pieds terminaux astrocytaires reposant sur la membrane basale externe du parenchyme cérébral et est en contact étroit avec la pie-mère (Fig.5).

VI) Particularités des organes circumventriculaires

1) Définition et généralités

Les organes circumventriculaires (OCV) (circumventriculaires pour « autour des ventricules ») peuvent se définir comme des structures médianes bordant les parois des 3^{ème} et 4^{ème} ventricules (Fig.7). Ce sont des organes neurohémaux, c'est-à-dire des structures mettant en relation le tissu nerveux d'une part (neuro-) et le sang d'autre part (-hémal). La liste la plus exhaustive des OCV regroupe : 1) la glande pinéale, 2) l'organe sous-fornical (OSF), 3) l'organe vasculaire de la lame terminale (OVLT), 4) l'éminence médiane, 5) la neurohypophyse, 6) l'organe sous-commissural (OSC), 7) l'area postrema et 8) les plexus choroïdes (Duvernoy HM et Risold PY, 2007 ; Joly JS et al, 2007). La présence de la glande pinéale, de l'OSC et des plexus choroïdes dans la famille des OCV est discutée.

L'OCV « standard » ne présente pas de BHE, ce qui permet la libre circulation de signaux variés entre le sang et le tissu nerveux. Une de leurs principales fonctions est ainsi d'assurer la transduction de signaux entre le sang, les neurones et le LCR.

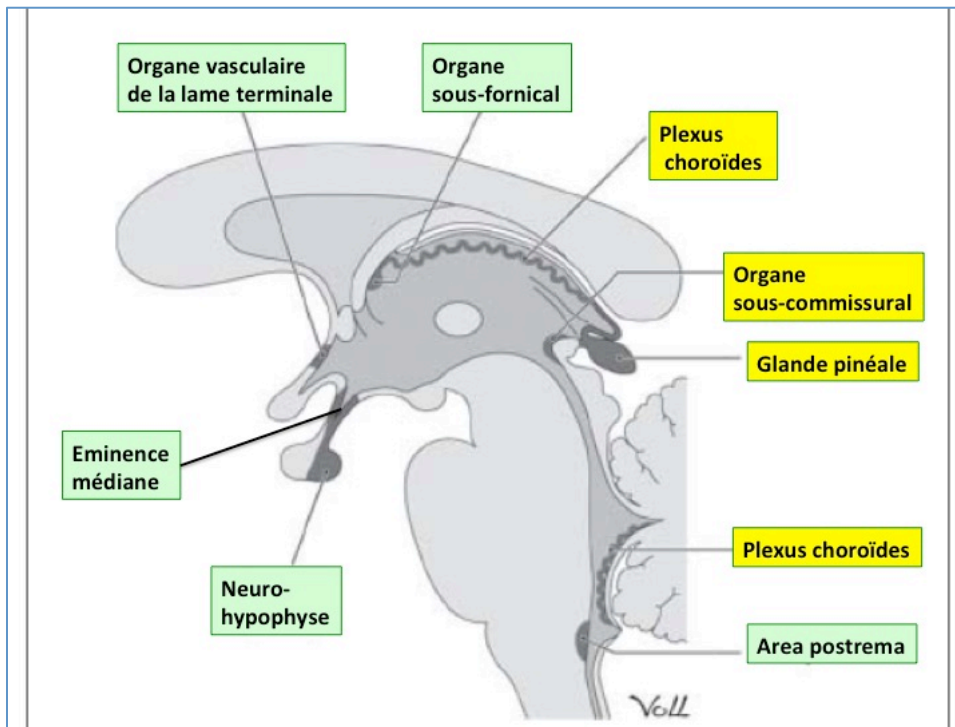


Figure 7. Organes circumventriculaires (OCV). Coupe anatomique sagittale centrée sur les 3^{ème} et 4^{ème} ventricules. Les organes apparaissant en jaune sont ceux pour qui l'appartenance au groupe des OCV est discutée (modifié d'après Voll ; Neupsykey.com)

La fonction et l'organisation anatomique des OCV sont paradoxalement très variées ce qui peut faire questionner la pertinence de les regrouper dans une même famille. Néanmoins, les OCV présentent aussi des caractéristiques communes fondamentales pouvant justifier de les considérer comme des structures apparentées. L'organisation de base d'un OCV comprend tout d'abord une interface ventriculaire bordée d'épendymocytes (Fig.8). Ces derniers, parfois appelés « tanocytes » (cellules allongées en grec) diffèrent en général des épendymocytes habituels par la présence de jonctions serrées. Sous cette bordure épendymaire, l'OCV est constitué d'un tissu nerveux de composition variable et qui peut comprendre une population neuronale

importante. Dans la plupart des OCV, le réseau de cellules gliales, notamment les astrocytes, situé autour des capillaires, est plus lâche. Cela se traduit sur le plan morphologique par des espaces périvasculaires larges. Les cellules endothéliales constituant les capillaires des OCV ne présentent pas de jonctions serrées et sont par conséquent « fenêtrés ».

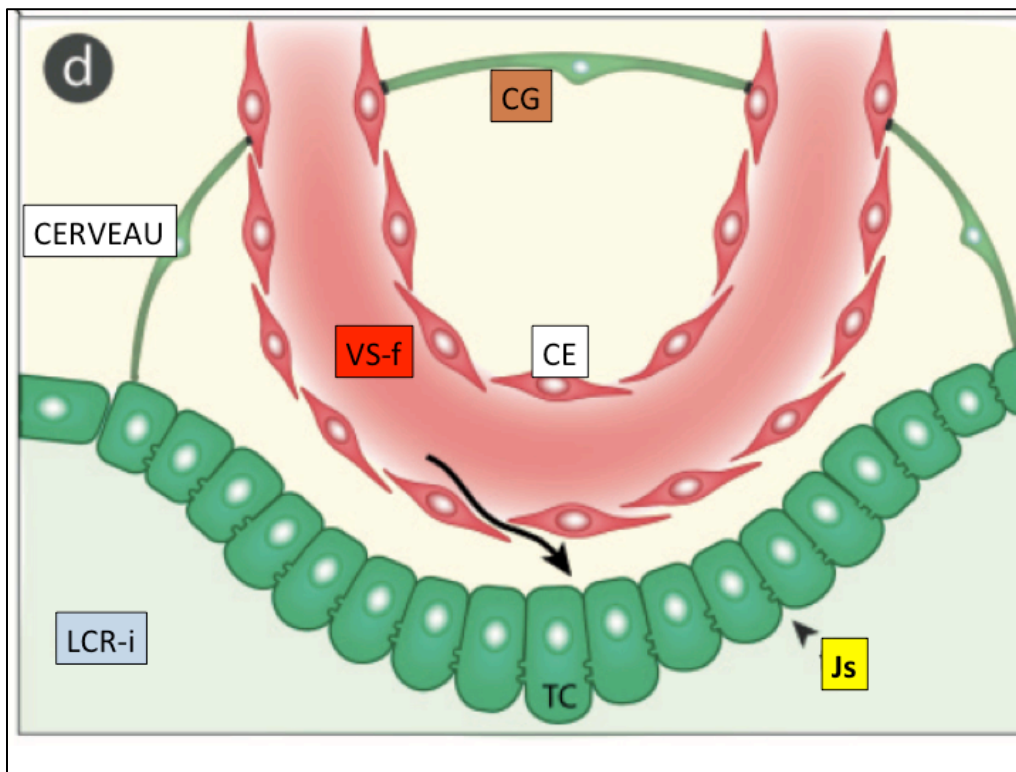


Figure 8. Organisation schématique d'un organe circumventriculaire « standard ». (modifiée d'après Saunders NR et al, 2016)

L'OCV est séparé de la lumière ventriculaire et de son contenu, le LCR (LCR-i), par une couche d'épendymocytes spécialisés ou tanocytes (TC), reliés par des jonctions serrées (Js). Il est constitué d'un tissu nerveux de composition variable (cellules neuronales, cellules gliales) et est vascularisé par un réseau très développé de capillaires fenêtrés (VS-f). CE : cellule endothéliale. L'OCV est séparé du tissu nerveux environnant par un réseau glial (CG).

Ces caractéristiques facilitent les échanges entre le compartiment sanguin et le tissu nerveux. Ils présentent ainsi des propriétés inhabituelles pour le SNC car constituent des « brèches » ou « fenêtres » au sein de la BHE (Tableau 1).

| Constituants | BHE | OCV |
|---|-------------------------|------------------------------------|
| Localisation | Système nerveux central | Ligne médiane Périventriculaire |
| Capillaires | Continus | Fenêtrés |
| Jonctions serrées au niveau des capillaires | OUI | NON |
| Espaces périvasculaires | Etroits | Larges |

Tableau 1. Différences principales entre un organe circumventriculaire (OCV) standard et la barrière hémato-encéphalique (BHE).

Le classement de la glande pinéale, de l'OSC et des plexus choroïdes au sein des OCV demeure controversé. En effet, l'OSC ne présente pas les capillaires fenêtrés caractéristiques des OCV. Les plexus choroïdes, eux, comprennent des capillaires fenêtrés mais ne sont pas constitués de tissu nerveux. Quant à la glande pinéale, c'est un organe endocrine. Elle sécrète dans la circulation sanguine et dans le LCR une hormone, la mélatonine.

2) Classification fonctionnelle des organes circumventriculaires

De nombreux auteurs ont tenté de séparer les OCV selon leurs principales fonctions. Deux familles principales peuvent être distinguées : les OCV sensitifs et les OCV sécrétoires (Kaur C et Ling EA, 2017 ; Miyata S, 2015). L'OVLT, l'OSF et l'area postrema sont classés dans le groupe des OCV sensitifs. La neurohypophyse, l'éminence médiane et la glande pinéale sont classés dans le groupe des OCV sécrétoires. L'OSC reste à part.

a) Les OCV sensitifs

Les OCV sensitifs sont constitués de neurones qui « monitorent » les signaux en provenance du sang ou du LCR et qui transmettent ces informations à d'autres régions du SNC où elles seront intégrées.

Les OCV sensitifs jouent un rôle dans la régulation de l'équilibre hydro-sodé de l'organisme, notamment par détection du niveau de sodium, de l'osmolarité et de l'angiotensine II (Tableau 2).

b) Les OCV sécrétoires

Les OCV sécrétoires libèrent dans la circulation sanguine des substances actives, notamment des hormones synthétisées par des cellules nerveuses (Tableau 2). Les axones terminaux situés dans la neurohypophyse libèrent l'ocytocine, neuropeptide impliqué dans la lactation, et la vasopressine ou hormone anti-diurétique. Les axones terminaux d'origine hypothalamique libèrent dans l'éminence médiane les facteurs de libération (Releasing Factors) des hormones antéhypophysaires.

| OCV | Localisation ventriculaire | Capillaires | Revêtement épendymaire (interface avec le LCR) | Principales fonctions |
|--|----------------------------|--------------|--|--|
| Neurohypophyse | V3 | Fenêtrés | | Stockage de la vasopressine et de l'ocytocine |
| Eminence médiane | V3 | Fenêtrés | Tanocytes | Reproduction, lactation, croissance, stress |
| Organe vasculaire de la lame terminale | V3 | Fenêtrés | | Régulation de l'homéostasie hydrique |
| Organe sous-fornical | V3 | Fenêtrés | | Régulation de la charge hydro-sodée |
| Organe sous-commissural | V3 | NON-fenêtrés | Ependymocytes spécialisés | Sécrétion de la fibre de Reissner |
| Glande pinéale | V3 | Fenêtrés | | Endocrine (mélatonine) |
| Area postrema | V4 | Fenêtrés | | Régulation de fonctions végétatives et automatiques (réflexe de vomissement) |
| Plexus choroïdes | VL, V3 ET V4 | Fenêtrés | Cellules choroïdiennes | Sécrétion du LCR |

Tableau 2. Organes circumventriculaires

3) Cas particulier de l'organe sous-commissural

L'OSC est une structure épendymaire ancienne et conservée dans l'embranchement des vertébrés. Il est situé dans le 3^{ème} ventricule à l'entrée de l'aqueduc de Sylvius, entre le récessus pinéal et le récessus mésocoelique (Rodríguez EM et al, 1998). Il est constitué de cellules épendymaires spécialisées recouvrant les surfaces antérieure et inférieure de la commissure postérieure (Fig.9).

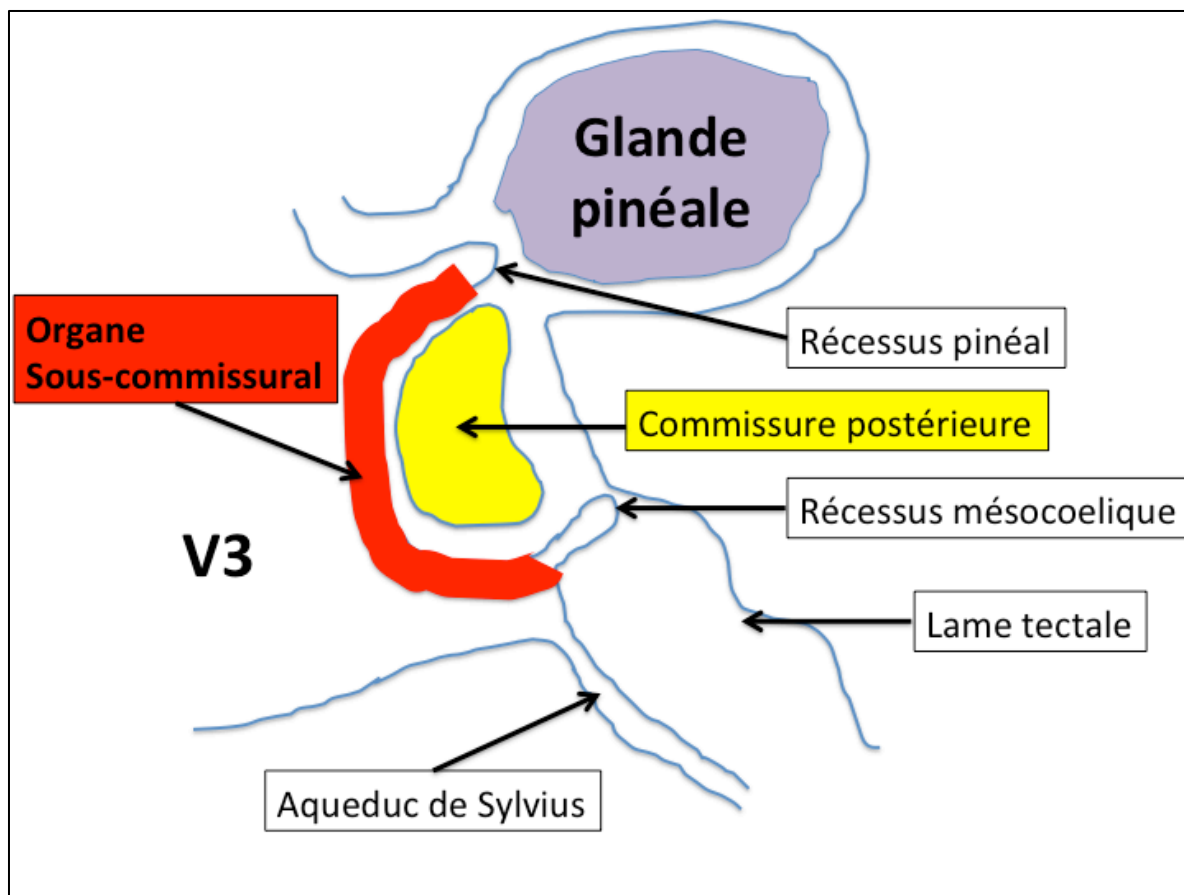


Figure 9. Position anatomique de l'organe sous-commissural (V3 : 3^{ème} ventricule)

Chez la plupart des vertébrés, les cellules épendymaires de l'OSC ont pour rôle de sécréter une glycoprotéine de haut poids moléculaire qui va s'agréger dans le LCR pour former une structure filamentaire : la fibre de Reissner. Cette fibre croît caudalement et comble l'aqueduc de Sylvius, le 4^{ème} ventricule et le canal épendymaire de la moëlle épinière. Elle aurait notamment pour rôle de faciliter l'écoulement du LCR à travers l'aqueduc de Sylvius. Les fonctions générales de l'OSC demeurent mal définies. L'OSC a été impliqué dans l'équilibre hydro-électrolytique, l'osmorégulation, la détoxification du LCR, la mécanoréception ou la morphogénèse de la colonne vertébrale et de la moëlle épinière (Rodríguez EM et al, 1998). Malgré son inclusion dans les OCV, les capillaires de l'OSC ne sont pas fenêtrés et présentent des jonctions serrées. La BHE reste donc fonctionnelle à ce niveau ce qui distingue cette structures des autres OCV. Il existe

également une deuxième barrière entre le LCR et l'OSC matérialisée par des jonctions serrées entre les cellules épendymaires. On peut ainsi dire que l'OSC est une structure unique parmi les OCV car enchâssée entre 2 barrières : une BHE au niveau des capillaires non-fenêtrés et une barrière LCR-tissu nerveux au niveau des cellules épendymaires. L'intérêt de cette « double barrière » n'est actuellement pas bien compris.

L'épendymocyte de l'OSC chez le rat se caractérise sur le plan ultrastructural par une zonation des différents organites (Rodríguez EM et al, 1998) :

- un noyau en position basale, souvent indenté, avec une euchromatine abondante,
- des citernes larges et dilatées de réticulum endoplasmique granuleux (REG) en position périnucléaire, contenant un matériel filamentaire,
- un appareil de Golgi en position centrale,
- un pôle apical qui contient de nombreuses mitochondries, quelques cils et des granules sécrétoires.

En microscopie électronique, les capillaires vascularisant l'OSC se caractérisent par des espaces périvasculaires larges. Ces espaces sont en général associés avec une absence de BHE, caractéristique des OCV. Mais contrairement aux autres OCV, ces espaces coexistent avec un endothélium scellé par des jonctions serrées dans l'OSC. Cette caractéristique explique pourquoi l'inclusion de l'OSC dans la famille des OCV reste très discutable car la BHE apparaît fonctionnelle à ce niveau. Les épendymocytes de l'OSC sont aussi liés entre eux par des jonctions serrées, créant une barrière à l'interface avec le LCR. En microscopie électronique, le développement des jonctions serrées diffère suivant les espèces : très développées chez la gerbille, moins développées chez le rat (Rodríguez EM, 1998). A l'extérieur de l'OSC, les épendymocytes ne présentent pas de jonctions serrées mais sont reliés par des jonctions adhérentes.

L'OSC chez l'homme, chez les primates anthropomorphes comme le chimpanzé et chez les chauve-souris, présente certaines caractéristiques (Rodríguez EM et al, 2001 ; Castañeyra-Perdomo A et al, 2004). Il atteint son plein développement durant la période embryonnaire et régresse à la naissance, ne persistant qu'à l'état vestigial chez l'adulte.

a) Aspect de l'OSC chez l'embryon et le fœtus humain

Chez le fœtus humain, l'OSC apparaît à partir de 8 semaines d'aménorrhée (SA) (Castañeyra-Perdomo A et al, 2004). Il se présente comme une couche de cellules épendymaires pseudostratifiées. Chez le jeune fœtus, ces cellules sont cylindriques et de grande taille. L'OSC atteint son plein développement à environ 15 SA. Elles présentent des aspects sécrétoires mais sans fibre de Reissner mise en évidence. Chez le fœtus plus âgé (à partir de 17 SA), la taille des épendymocytes de l'OSC diminue.

b) Aspect de l'OSC chez le nouveau-né

Chez le nouveau-né, la couche épendymaire de l'OSC reste continue mais la taille des cellules la constituant est plus variable, de cuboïde basse à cylindrique haute. Les prolongements épendymaires en profondeur sont moins bien définis.

c) Aspect de l'OSC chez l'enfant

Chez l'enfant plus âgé, l'OSC ne persiste que sous forme d'îlots de cellules épendymaires spécialisées. Les prolongements cellulaires basaux ne sont plus identifiables. La zone hypendymaire de la commissure postérieure est formée d'astrocytes.

d) Aspect de l'OSC chez l'adulte

L'OSC est présent sous forme de rares îlots dont les cellules ont perdu leur aspect caractéristique de « grand épendymocyte sécrétoire ».

Sur le plan ultrastructural, l'OSC chez un fœtus humain de 3 mois présentent les caractéristiques suivantes (Rodríguez EM et al, 2001). L'apex contient des microvillosités, des vésicules de pinocytose et de rares cils. Des mitochondries et des citernes de REG sont aussi observées. Les cellules épendymaires sont liées entre elles par des complexes jonctionnels comprenant des jonctions serrées et des jonctions adhérentes. Le cytoplasme contient des mitochondries, un appareil de Golgi, des vésicules de taille variable et des citernes de REG dont certaines sont dilatées et remplies d'un matériel floconneux.

L'ensemble des analyses ultrastructurales, biochimiques, histochimiques ou immunohistochimiques n'a pas mis en évidence de sécrétion d'une fibre de Reissner par l'OSC humain.

VII) Les barrières du SNC au cours du développement

1) Généralités

Les interfaces sang-cerveau et sang-LCR ont traditionnellement été considérées comme absentes, peu développées ou lâches chez l'embryon, le fœtus ou le nouveau-né (Saunders NR et al, 2012). Pour certains auteurs, la présence du placenta rendait superflue la nécessité d'une barrière protégeant l'encéphale fœtal d'éventuelles « agressions » extérieures. De plus, la présence d'une telle barrière pouvait sembler absurde si l'on prenait en compte la forte demande métabolique nécessaire au SNC pour

se former et donc la nécessité qu'un maximum de substances nutritives puissent y accéder librement.

L'hypothèse d'une immaturité des interfaces sang-cerveau dans l'encéphale en développement a été initialement appuyée par diverses expérimentations utilisant des injections de colorants (revue par Saunders NR et al, 2012). Ces expérimentations consistaient à injecter un colorant dans le sang d'un animal et d'analyser ensuite sa répartition. Chez l'adulte, l'injection dans le sang d'un colorant comme le bleu Trypan colorait l'ensemble de l'organisme sauf le système nerveux central. Ce résultat était en faveur de la présence d'une barrière sang-cerveau chez l'adulte. Le même type d'expérimentation répété chez des animaux jeunes et immatures montraient une diffusion du colorant dans le système nerveux ce qui suggérait une interface sang-cerveau absente ou immature. Une revue de ces premières expériences de perméabilité par Norman R. Saunders pointe des défauts méthodologiques rendant les résultats de ces études et leur interprétation discutables.

Plusieurs éléments peuvent expliquer ces résultats :

- 1) L'injection de trop grands volumes de colorant peut altérer mécaniquement la paroi des capillaires cérébraux et provoquer ainsi sa fuite dans le tissu nerveux.
- 2) Multiplier les injections de colorant peut aussi contribuer à altérer le lit vasculaire du cerveau immature.
- 3) L'utilisation de colorant trop fortement concentré peut entraîner des lésions toxiques sur le réseau capillaire cérébral et ainsi expliquer la diffusion du colorant dans le tissu nerveux.
- 4) Les conditions physiologiques (tissu *postmortem* : diffusion du colorant)

Dans ces conditions, l'observation d'une plus forte coloration dans l'encéphale immature peut être expliquée par une fragilité des vaisseaux. Néanmoins, fragilité vasculaire n'est pas synonyme d'immaturité ou d'un caractère intrinsèquement « fuyard » de la barrière à un stade précoce de développement.

2) Barrière hémato-encéphalique au cours du développement

La BHE est composée de 4 éléments principaux : les cellules endothéliales, les péricytes, la membrane basale et les pieds astrocytaires (Saunders NR et al, 2012 ; Hagan N and Ben-Zvi A, 2015).

Des jonctions serrées bien formées entre les cellules endothéliales sont individualisables précocement au cours du développement de la vascularisation cérébrale (Møllgård K et Saunders NR, 1986 ; Bauer HC et al, 1993). Des études de perméabilité ont également montré que ces jonctions étaient fonctionnelles, assurant une fonction de barrière pour les petites molécules (Ek CJ et al, 2006). La claudine 5 est identifiée comme constituant de ces jonctions serrées chez les mammifères dès la pénétration des vaisseaux sanguins dans le parenchyme cérébral (Ek CJ et al, 2006).

Dans une étude portant sur le télencéphale de fœtus humains entre 12 et 18 SA, une expression de la claudine 5 a été identifiée au niveau des vaisseaux et capillaires cérébraux dès 12 SA (Virgintino D et al, 2004). L'immunopositivité passe de cytoplasmique diffuse à jonctionnelle ponctuée à 14 SA.

L'importance des astrocytes dans l'établissement de la BHE au cours du développement et notamment dans l'induction des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales est souvent soulignée (Abbott NJ, 2002). Un facteur essentiel, souvent éludé, est que l'astrocyte est absent du parenchyme cérébral lors de la formation de la vascularisation

cérébrale (Saunders NR et al, 2012). La gliogenèse commence en effet dans la deuxième partie de la grossesse chez l'homme. Les astrocytes ne peuvent donc pas contribuer au phénotype de barrière dans la première partie du développement encéphalique.

3) Barrière sang-LCR

Les cellules épithéliales des plexus choroïdes constituent la barrière sang-LCR et produisent le LCR (Liddelow SA, 2015 ; Dziegielewska KM et al, 2001). Chez l'adulte, cette barrière est caractérisée par des jonctions serrées établies entre les cellules choroïdiennes. Ces jonctions serrées sont identifiées et fonctionnellement matures dans les stades les plus précoces du développement des plexus choroïdes (Møllgård K et Saunders NR, 1986 ; Ek CJ et al, 2003 ; Johansson PA et al, 2006 ; Johansson PA et al, 2008). L'aquaporine 1 qui joue un rôle important dans la sécrétion du LCR est exprimée dès le début de la différenciation des plexus choroïdes chez les mammifères (Johansson et al, 2005).

Sur le plan morphologique, la maturation des cellules choroïdiennes des ventricules latéraux se fait suivant 4 étapes chez l'homme (Dziegielewska KM et al, 2001), d'un épithélium pseudostratifié sans villosités apicales à un épithélium cubique au pôle apical riche en villosités. Dans les stades II et III, le cytoplasme des cellules choroïdiennes est riche en glycogène.

Le plexus choroïde se développe en différents points le long de l'axe dorsal du tube neural. Après la fermeture du tube neural, les plexus choroïdes du 4^{ème} ventricule sont les premiers à se former, suivis des plexus choroïdes des ventricules latéraux puis des plexus du 3^{ème} ventricule (Lun MP et al, 2015). L'engagement des cellules embryonnaires dans la lignée choroïdienne apparaît précocement avant même que les

plexus choroïdes ne soient macroscopiquement identifiables. Les cellules épithéliales choroïdiennes proviennent du neuro-ectoderme. Les plexus choroïdes du 4^{ème} ventricule sont issus du rhombencéphale et plus précisément de la lèvre rhombique inférieure et de l'épithélium transitoire du toit (Lun MP et al, 2015). Les plexus choroïdes des ventricules latéraux se développent à partir de la paroi médiale de chaque vésicule télencéphalique (Lun MP et al, 2015). De nombreuses molécules et facteurs de transcription participent à l'élaboration des plexus choroïdes (Liddelow SA, 2015). La sécrétion de BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), au niveau de la ligne médiane dorsale notamment, est nécessaire à leur formation.

PARTIE 2 : Barrière physique moléculaire: les jonctions serrées

I) Introduction : les différents types de systèmes jonctionnels cellulaires

Les jonctions jouent un rôle fondamental dans la physiologie des tissus. Leurs fonctions sont très variées. Un de leurs rôles principaux est de relier les cellules les unes aux autres et à leur microenvironnement afin d'aboutir à un tout fonctionnel cohérent. Cinq types principaux de jonctions sont individualisables (Fig.10) : quatre jonctions intercellulaires (1 à 4) et une jonction entre la cellule et la matrice extracellulaire (5) (Giepmans B et van Ijzendoorn SC, 2009).

1° les jonctions serrées (ou *zonula occludens*)

2° les jonctions adhérentes (ou *zonula adherens*)

3° les desmosomes

4° les jonctions communicantes (« gap junctions »)

5° les hémidesmosomes

Dans notre travail doctoral, nous nous sommes intéressés aux jonctions serrées.

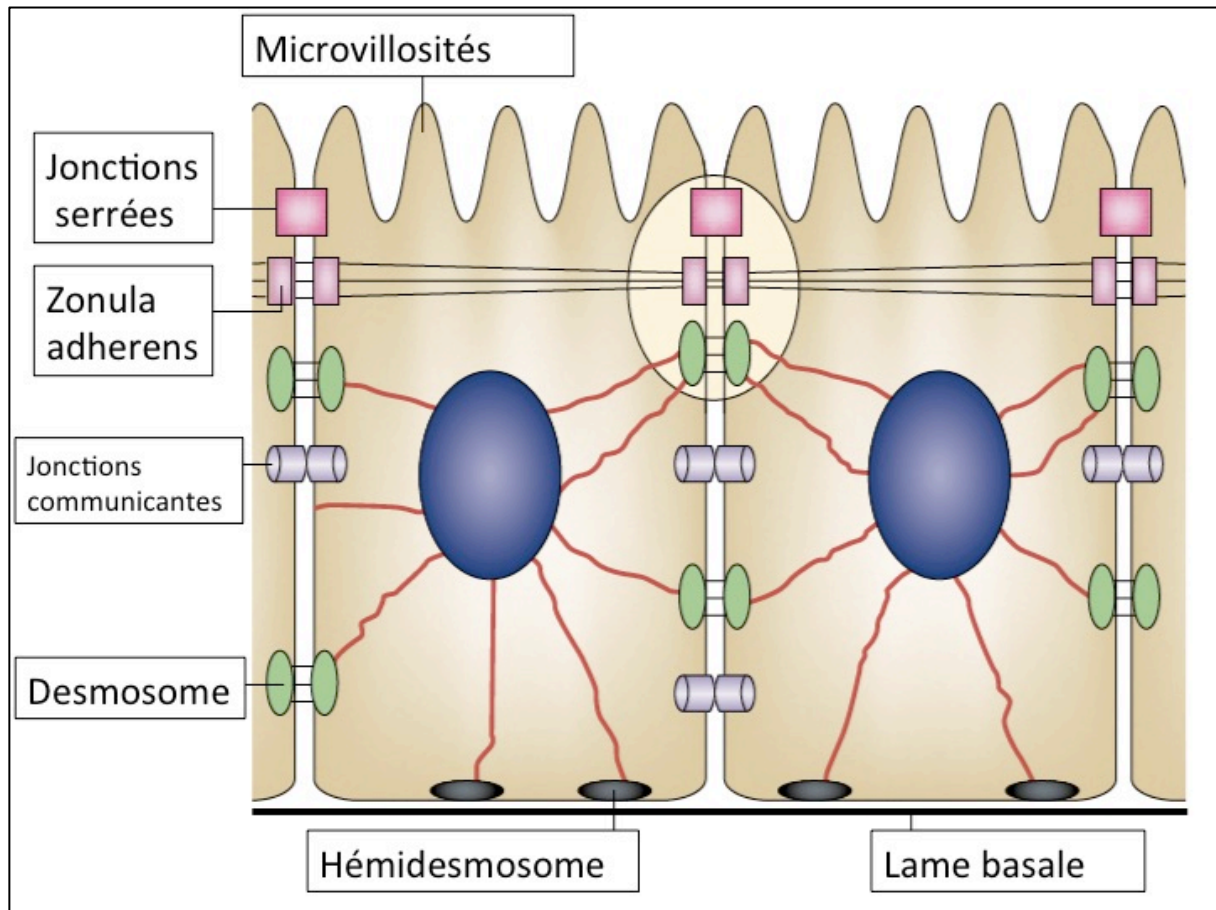


Figure 10. Les 5 principaux types de jonctions au niveau des cellules intestinales (modifié d'après Tsukita S et al, 2001)

II) Généralités sur les jonctions serrées

1) Fonctions et aspect général des jonctions serrées

La jonction serrée, ou *zonula occludens*, est un ensemble moléculaire complexe d'adhésion entre deux cellules épithéliales ou deux cellules endothéliales (Steed E et al, 2010). Elle joue un rôle prépondérant dans la formation d'une barrière entre deux compartiments distincts et assure une régulation du passage de solutés voire de cellules entre ces deux milieux (passage paracellulaire). Dans les cellules épithéliales, leur localisation apicale participe à la polarisation cellulaire et permet la séparation d'un

domaine membranaire apical et d'un domaine membranaire baso-latéral en plus de la formation d'une barrière paracellulaire (Fig.11).

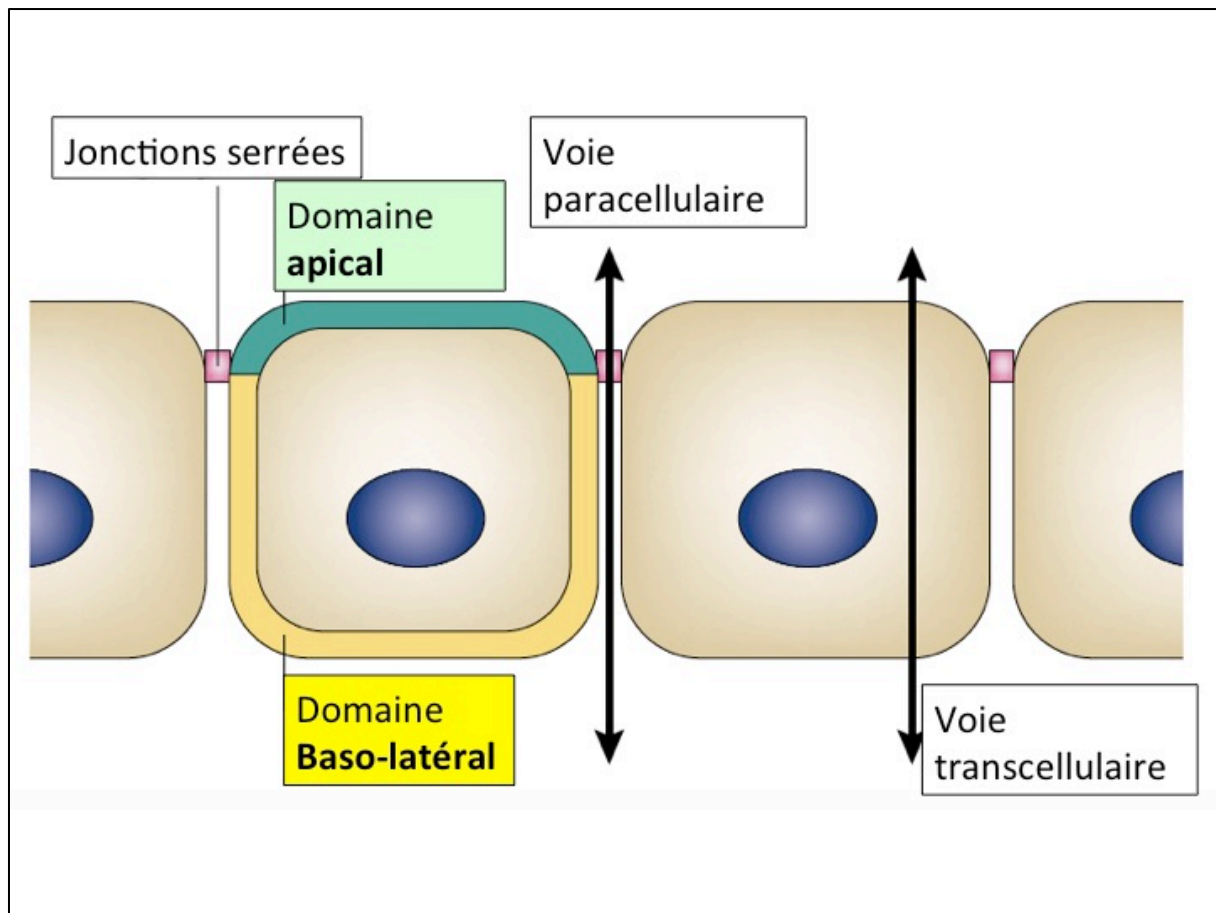


Figure 11. Polarisation de la cellule grâce aux jonctions serrées : délimitation d'un compartiment apical (en vert) et d'un compartiment baso-latéral (en jaune) fonctionnellement différents. Les jonctions serrées constituent un obstacle sur la voie paracellulaire (modifié d'après Tsukita S et al, 2001).

La jonction serrée apparaît histologiquement en coloration standard comme une « barre terminale », c'est-à-dire une condensation apicale intercellulaire que l'on peut notamment bien distinguer dans l'épithélium intestinal (Fig.12).

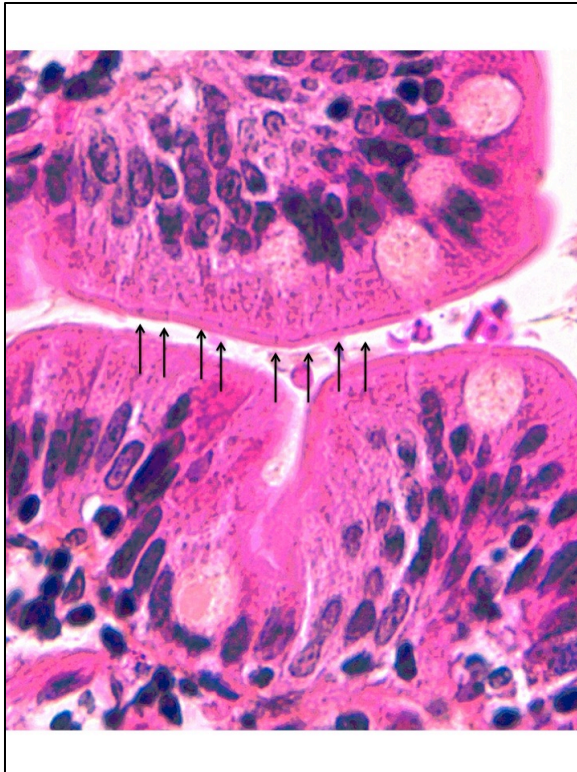


Figure 12. Barre terminale (épithélium intestinal humain, coloration HPS, grossissement original x 400). Renforcement éosinophile apico-latéral entre chaque cellule (flèches) correspondant aux jonctions serrées (les couleurs de la photo ont été artificiellement contrastées afin de rehausser la structure en question et faciliter sa visualisation).

En microscopie électronique, la jonction serrée forme une zone de fusion membranaire électron-dense entre 2 cellules opposées (Fig.13) (Haseloff RF et al, 2015). L'espace intercellulaire est à ce niveau oblitéré. En cryofracture, elle apparaît formée d'un réseau anastomosé de bandes et de sillons intramembranaires. Les sillons sont l'image en négatif de bandes controlatérales (Tsukita S et al, 2001).

L'image classique de la jonction serrée est celle d'une structure solide et stable dans le temps et l'espace. Il s'agit en fait d'une structure plutôt dynamique qui doit se modifier, se remodeler et s'adapter au cours de différents évènements physiologiques (développement) ou pathologiques (Steed E et al, 2010).

Image soumise soumise à copyright

Figure 13. Morphologie en microscopie électronique de différents types de jonctions dans l'épithélium intestinal du hamster. La jonction serrée (ou *zonula occludens*) se présente sous forme d'une fusion des faces externes des membranes plasmiques à l'origine d'une bande electron-dense (D'après Fawcett DW, *The Cell: An Atlas of Fine Structure*, WB Saunders, Philadelphia, 1966, p. 367).

2) Propriétés physiques des jonctions serrées

Les épithéliums avec des jonctions serrées peuvent maintenir un gradient électrochimique élevé, généré par les transports actifs transcellulaires. La résistance électrique transépithéliale (RET) est une valeur physique qui permet d'apprécier la fonction de barrière d'un épithélium à différents flux ioniques. Elle permet de distinguer par exemple des épithéliums « lâches » caractérisés par une faible résistance électrique comme le tube contourné proximal rénal chez les mammifères ($6 \Omega \cdot \text{cm}^2$) des épithéliums « serrés » caractérisés par une très forte résistance électrique comme la muqueuse vésicale de grenouille ($300\,000 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (Anderson JM et al, 2009).

3) Constitution moléculaire des jonctions serrées

Sur le plan moléculaire, la jonction serrée est formée de deux types de protéines : des protéines *principales* et des protéines *accessoires* (Fig.14) (Förster C, 2008).

Les protéines principales de la jonction serrée sont membranaires : on distingue celles à 4 domaines transmembranaires (occludine et claudines par exemple) et celles à un domaine transmembranaire (molécule d'adhésion jonctionnelle ou JAM pour Junctional Adhesion Molecule).

Les protéines *accessoires* sont cytosoliques et forment la zone de la plaque membranaire. Elles permettent l'ancrage au cytosquelette d'actine intracellulaire. Les représentantes principales de ce groupe de protéines sont les protéines Zonula occludens (ZO) : ZO-1, ZO-2 et ZO-3.

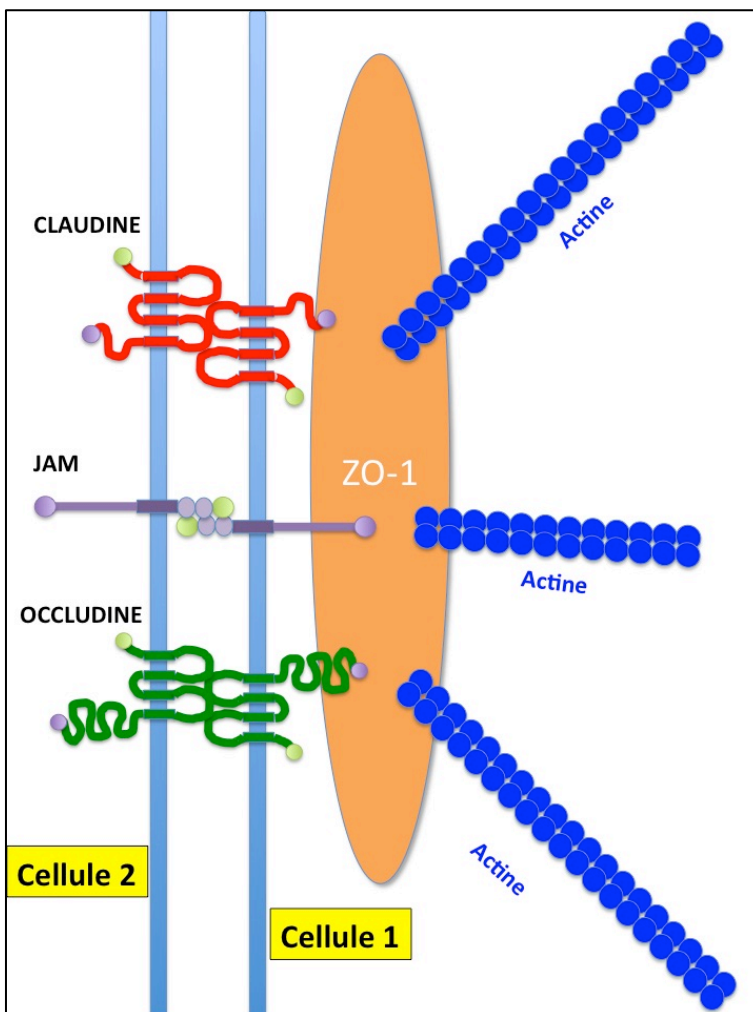


Figure 14. Jonction serrée : composition moléculaire schématique.

La jonction serrée est formée de 3 types de protéines transmembranaires : l'occludine, les claudines et JAM (Junctional Adhesion Molecule). Chaque protéine est reliée à une molécule adaptatrice (ici ZO-1) qui permet de faire le lien avec les filaments d'actine du cytosquelette.

III) Les claudines :

1) Les claudines : structure et fonctions

Les principales protéines constitutives de la jonction serrée sont les claudines (Förster C et al, 2008). Le nom « claudine » provient du latin « claudere » qui signifie « fermer, clore, sceller » (Anderson JM et al, 2009). Les claudines sont des protéines d'environ 20-27 kDa. Les bandes de claudines forment la charpente de la jonction serrée alors que l'occludine qui s'associe à ces structures aurait plutôt un rôle régulateur. L'occludine n'est pas suffisante par elle-même pour générer des jonctions serrées. Ainsi, les claudines sont responsables de l'aspect caractéristique de la jonction serrée en bandes, bien visible sur les images de cryofracture en microscopie électronique. Les claudines constituent une famille de protéines à 4 domaines transmembranaires comptant actuellement environ 24 membres (Lal-Nag M et Morin PJ, 2009). Elles comprennent deux boucles extracellulaires BEC 1 et BEC2 (Fig.15).

Il est possible de diviser les claudines en 3 familles principales selon leurs fonctions (Schulzke JD et al, 2012) :

- un groupe de claudines dont le rôle est d'assurer une barrière physique à la diffusion paracellulaire (claudines de scellement) comme les claudines 1, 3, 5 et 11,
- un groupe de claudines formant des pores, autorisant un passage paracellulaire d'eau et de certains ions, comme les claudines 2, 10, 15 et 17,
- et un groupe de claudines aux propriétés variables ou encore inconnues comme la claudine 6.

Les boucles extracellulaires des claudines jouent un rôle important dans le resserrement de l'espace intercellulaire et la perméabilité paracellulaire aux ions. La première boucle extracellulaire (BEC1) est déterminante dans la sélectivité ionique de la voie de transport paracellulaire (Angelow S et al, 2008). Par exemple, la quantité en acides aminés chargés négativement et leur position au sein de BEC1 déterminent la formation d'un pore aux cations au niveau de la jonction (Krause G et al, 2008). Elle assurerait également des interactions avec le virus de l'hépatite C (Evans MJ et al, 2007). La fonction de la deuxième boucle extracellulaire (BEC2) est moins bien caractérisée. Elle semble jouer un rôle dans la formation des bandes jonctionnelles (Angelow S et al, 2008). Sa structure est de type hélice-coude-hélice. Dans certaines claudines, BEC2 constitue aussi un récepteur à l'entérotoxine de *Clostridium Perfringens*, bactérie impliquée dans certaines toxi-infections alimentaires (Fujita K et al, 2000).

Ainsi ces boucles définissent pour chaque claudine ses caractéristiques de « perméabilité ». Par exemple, la claudine 1 a essentiellement une fonction de barrière imperméable alors que la claudine 2 a une fonction de pore en augmentant la perméabilité des cations.

La région C-terminale des claudines est la plus hétérogène : c'est probablement elle qui détermine la spécificité tissulaire des différentes claudines. Elle contient une zone de liaison au domaine PDZ permettant une interaction directe avec les protéines ZO-1, ZO-2 et ZO-3. Elle comprend également un signal d'adressage de la protéine au complexe jonctionnel et participe à la stabilité de la protéine.

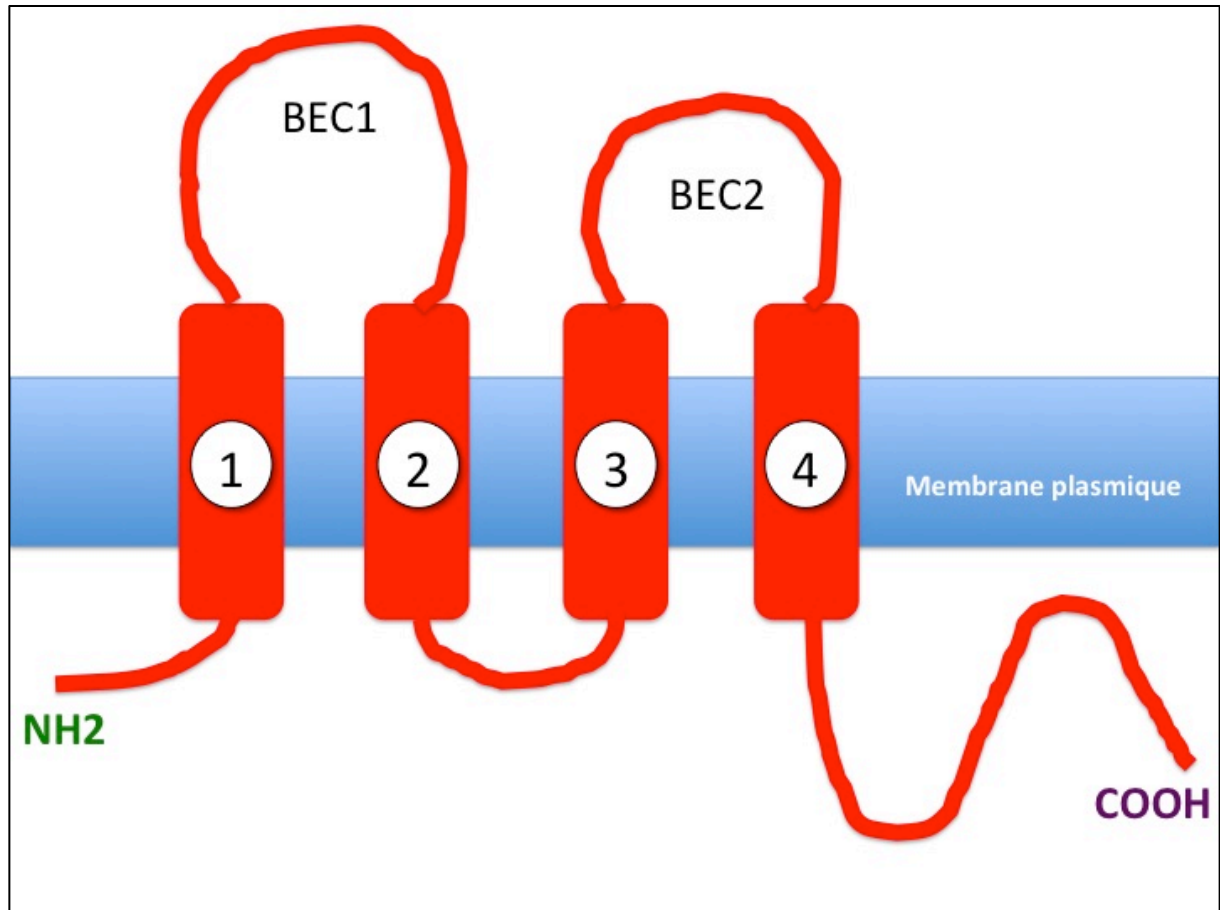


Figure 15. Structure moléculaire schématique des claudines. La claudine standard comprend 4 domaines transmembranaires (1 à 4), 2 boucles extracellulaires, une grande (BEC1) et une plus petite (BEC2), une extrémité N-terminale et une extrémité C-terminale.

2) Interactions entre claudines :

Une claudine pourra interagir avec une autre claudine située en face d'elle sur une cellule adjacente ou à côté d'elle sur la même cellule. Il s'agira d'interaction « trans » ou « cis » respectivement. Ces interactions pourront être homophiliques, si elles concernent le même type de claudine, ou hétérophiliques, si elles concernent des claudines de type différent (Krause G et al, 2008).

Les ceintures formées par les interactions intercellulaires des claudines peuvent être continues (claudine 1) ou discontinues (claudine 2, claudine 5). Ces différents

agencements spatiaux dépendent probablement de différences dans la cis-oligomérisation.

3) Distribution des claudines dans les tissus

L'expression des claudines varie suivant le tissu étudié (Krause G et al, 2008). La combinaison variable des claudines peut expliquer des capacités différentes de diffusion des solutés d'un tissu à l'autre. A l'intérieur d'un même tissu, l'expression variable des claudines suivant le secteur anatomique peut permettre une spécialisation fonctionnelle régionale au sein du tissu. Ainsi l'expression des claudines au sein du néphron est hautement sectorisée (Angelow S et al, 2008). Par exemple, la claudine 2 est exprimée spécifiquement dans le tube contourné proximal et la branche descendante fine de l'anse de Henlé où elle joue un rôle important dans la réabsorption du Na⁺ de par ses propriétés de pore cationique. La claudine 5, elle, est caractéristique de la cellule endothéliale (Morita K et al, 1999b).

IV) Barrière hémato-encéphalique et claudines : ce qui est connu

Les jonctions serrées sont des composants fondamentaux de la BHE. Elles se situent entre les cellules endothéliales et contribuent ainsi à assurer une barrière physique entre le sang et le tissu nerveux.

La claudine 5 est la claudine la plus exprimée dans le système nerveux central humain (Hewitt KJ et al, 2006). Elle est un composant majeur de la jonction serrée entre cellules endothéliales au niveau des capillaires cérébraux de la BHE chez la souris (Morita K et al, 1999b) et chez l'homme (Liebner S et al, 2000 ; Wolburg H et al, 2003). Elle est

exprimée très précocement au cours du développement (Morita K et al, 1999b). La claudine 3 a aussi été mise en évidence par immunofluorescence dans les jonctions serrées entre les cellules endothéliales de la BHE chez la souris et chez l'homme (Wolburg H et al, 2003). La présence de claudine 1 a été décrite au niveau des jonctions serrées de la microvascularisation cérébrale (Liebner S et al, 2000). Cependant, il est secondairement apparu que l'anticorps anti-claudine 1 utilisé croisait avec la claudine 3 (Wolburg H et al, 2003). Consécutivement, la présence de la claudine 1 n'a pas été confirmée dans les capillaires cérébraux chez la souris (Pfeiffer F et al, 2011) et chez l'homme (Wolburg H et al, 2003 ; Ballabh P et al, 2005 ; Weksler BB et al, 2005). Néanmoins, il faut noter de rares études soulignant le rôle de la claudine 1 dans l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC) au niveau de la BHE (Fletcher NF et al, 2012). Une explication avancée pour ces discordances serait la très faible expression de la claudine 1 au niveau de la BHE, empêchant une détection correcte mais permettant l'infection par le VHC (Haseloff RF et al, 2015). Enfin, l'expression de la claudine 12 a été identifiée au niveau des capillaires cérébraux de la souris (Nitta T et al, 2003).

V) Barrière sang-LCR et claudines : ce qui est connu

Comme précédemment décrit, la barrière sang-LCR est représentée par les plexus choroïdes. Contrairement à la BHE, la composante « physique » de cette barrière ne se situe pas au niveau des capillaires mais au niveau de l'épithélium choroïdien. Les cellules épithéliales choroïdiennes, scellées entre elles par des jonctions serrées, forment une barrière entre le sang et le LCR. Ces jonctions serrées sont composées de différents types de claudines (voir Tableau 3).

Des études effectuées sur les plexus choroïdes de rongeurs adultes (souris, rat) ont montré que ces jonctions serrées étaient constituées sur le plan moléculaire de la claudine 1, de la claudine 2 et de la claudine 11 (Lippoldt A et al, 2000; Wolburg H et al, 2001). La claudine 5 a été identifiée au niveau des cellules endothéliales des capillaires choroïdiens. Dans une étude chez le rat, elle était détectée par immunofluorescence au niveau des cellules choroïdiennes mais cette expression était faible et cytoplasmique sans localisation au niveau des systèmes jonctionnels (Lippoldt A et al, 2000). Dans ce cadre, la spécificité de ce marquage était discutable. Dans cette même étude, l'épendyme n'exprimait pas la claudine 2. Une faible expression cytoplasmique de la claudine 1 dans les épendymocytes apparaissait non-spécifique de manière comparable à la détection de la claudine 5 dans les cellules choroïdiennes. Dans une étude réalisée chez le fœtus humain (24-40 SA), la claudine 1 était exprimée dans l'épithélium choroïdien et la claudine 5 dans les vaisseaux de la BHE (Anstrom JA et al, 2007). Il n'y avait pas d'expression de la claudine 1 dans les capillaires choroïdiens.

Une étude réalisée sur des lignées cellulaires immortalisées et sur une lignée de carcinome des plexus choroïdes donnait des résultats d'interprétation difficile (Szmydynger-Chodobska J et al, 2007). L'utilisation de lignées cellulaires ne semble pas être la méthode optimale pour caractériser la composition moléculaire des jonctions serrées d'un tissu précis.

| Article | Espèce | Techniques | Claudines | Localisation/Cellule | Résultats |
|------------------------------------|--|--------------------|----------------------------------|--|--|
| Lippoldt A et al, 2000 | Rat adulte | IF | CLDN1 CLDN2 CLDN5 | Plexus choroïdes (Ventricule latéral) CC Cap Ep CC Cap Ep CC Cap Ep | +++ + cyto +++ - ? cyto +++ - |
| Wolburg H et al, 2001 | Souris adulte | IF | CLDN1 CLDN2 CLDN11 | Plexus choroïdes | + + + |
| Anstrom JA et al, 2007 | Fœtus humain | IF | CLDN1 | Plexus choroïdes CC Cap | + - |
| Szmydynger-Chodobska J et al, 2007 | Lignées cellulaires Plexus choroïde de rat Z310 TR-CSFB3 Carcinome des plexus choroïdes humain CPC-2 | RT-PCR WB IF | CLDN1 CLDN2 CLDN11 | Z310 TR-CSFB3 CPC-2 Z310 TR-CSFB3 CPC-2 Z310 TR-CSFB3 CPC-2 | RT-PCR-, WB-, IF- RT-PCR+, WB-, IF+ RT-PCR+, WB+ IF+ RT-PCR-, WB-, IF- RT-PCR+, WB-, IF- RT-PCR+, WB-, IF- RT-PCR- RT-PCR- RT-PCR- |

Tableau 3. Barrière sang-LCR et claudines. Abréviations : CLDN (claudine), WB (Western Blot), IF (Immunofluorescence), RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction), expression cytoplasmique (cyto), CC (cellules épithéliales choroïdiennes), Cap (capillaire choroïdien), Ep (épendyme)

Le tableau 4 résume la composition en claudines de la BHE et de la barrière sang-LCR.

| Barrière hémato-encéphalique | Barrière sang-LCR |
|---|---|
| Cellules endothéliales des capillaires cérébraux | Cellules épithéliales des plexus choroïdes |
| CLDN5+++ | CLDN1 |
| CLDN3 | CLDN2 |
| CLDN12 | CLDN11 |

Tableau 4. Composition moléculaire en claudines (CLDN) des 2 principales interfaces du SNC.

PARTIE III: JONCTIONS SERRÉES ET PATHOLOGIE

L'étude des jonctions serrées au niveau des interfaces sang-cerveau peut trouver des applications dans des domaines très variés tels que la neuropathologie tumorale et la neurologie périnatale.

I) Tumeurs périventriculaires du SNC : origine cellulaire et difficultés diagnostiques

1) Définition

Il est possible de définir une tumeur périventriculaire comme un néoplasme se développant à partir de la paroi ventriculaire et dont la croissance peut se faire vers la cavité ventriculaire ou vers le parenchyme cérébral.

Ainsi, les épendymomes (tumeurs se développant à partir des épendymocytes), les tumeurs des plexus choroïdes (tumeurs se développant à partir des cellules choroïdiennes des plexus choroïdes), les neurocytomes centraux et les tumeur papillaires de la région pinéale peuvent être considérés comme faisant partie des tumeurs périventriculaires.

Les épendymomes se développent principalement dans les cavités ventriculaires. Sur le plan morphologique, ils se caractérisent par des éléments architecturaux particuliers rappelant des « rosaces » parmi lesquels (Wippold FJ 2nd et Perry A, 2006) :

- la « vraie » rosette : agencement radiaire des cellules tumorales autour d'une lumière centrale.

- la pseudo-rosette périvasculaire : agencement radiaire des cellules tumorales et de leurs prolongements autour d'une lumière vasculaire. C'est une pseudo-rosette car son centre est un vaisseau et non une lumière véritable.

2) L'exemple de la tumeur papillaire de la région pinéale

La tumeur papillaire de la région pinéale (TPRP) est une tumeur périventriculaire rare de l'adulte, décrite pour la première fois en 2003 par Jovet et collègues (Jovet et al, 2003). Elle atteint principalement les adultes jeunes dans leur 3^{ème} décennie (Fèvre-Montange M et al, 2015). L'âge médian est de 35 ans.

Sur le plan neuroradiologique, les TPRP se développent de manière stéréotypée à la partie postérieure du 3^{ème} ventricule, à l'entrée de l'aqueduc de Sylvius, au niveau de la commissure postérieure (Chang AH et al, 2008). En IRM (Imagerie par Résonance Magnétique), elles sont hyperintenses en séquence T1, prennent le contraste de manière modérée et présentent souvent une composante kystique (Fig.16).



Figure 16. IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) d'une tumeur papillaire de la région pinéale. Séquence T1 après injection de Gadolinium. Tumeur prenant le contraste, située à l'avant de la région pinéale, au niveau de la paroi postérieure du 3^{ème} ventricule.

Les symptômes liés à la TPRP ne sont pas spécifiques et sont principalement la conséquence d'une obstruction de l'aqueduc de Sylvius par la tumeur (Fauchon F et al, 2013). Cette obstruction entraîne une accumulation de LCR en amont à l'origine d'une hydrocéphalie triventriculaire et d'une augmentation de la tension intracrânienne. L'hypertension intracrânienne est responsable de céphalées, vomissements et éventuellement de troubles de la conscience dans les formes les plus sévères. La compression de la lame tectale peut expliquer des troubles oculomoteurs et notamment une paralysie de la verticalité du regard (syndrome de Parinaud).

Sur le plan microscopique, la TPRP se caractérise principalement par des formations papillaires revêtues de cellules cubo-cylindriques épithélioïdes (Fig.17A), alternant avec des plages plus solides (Fig.17B).

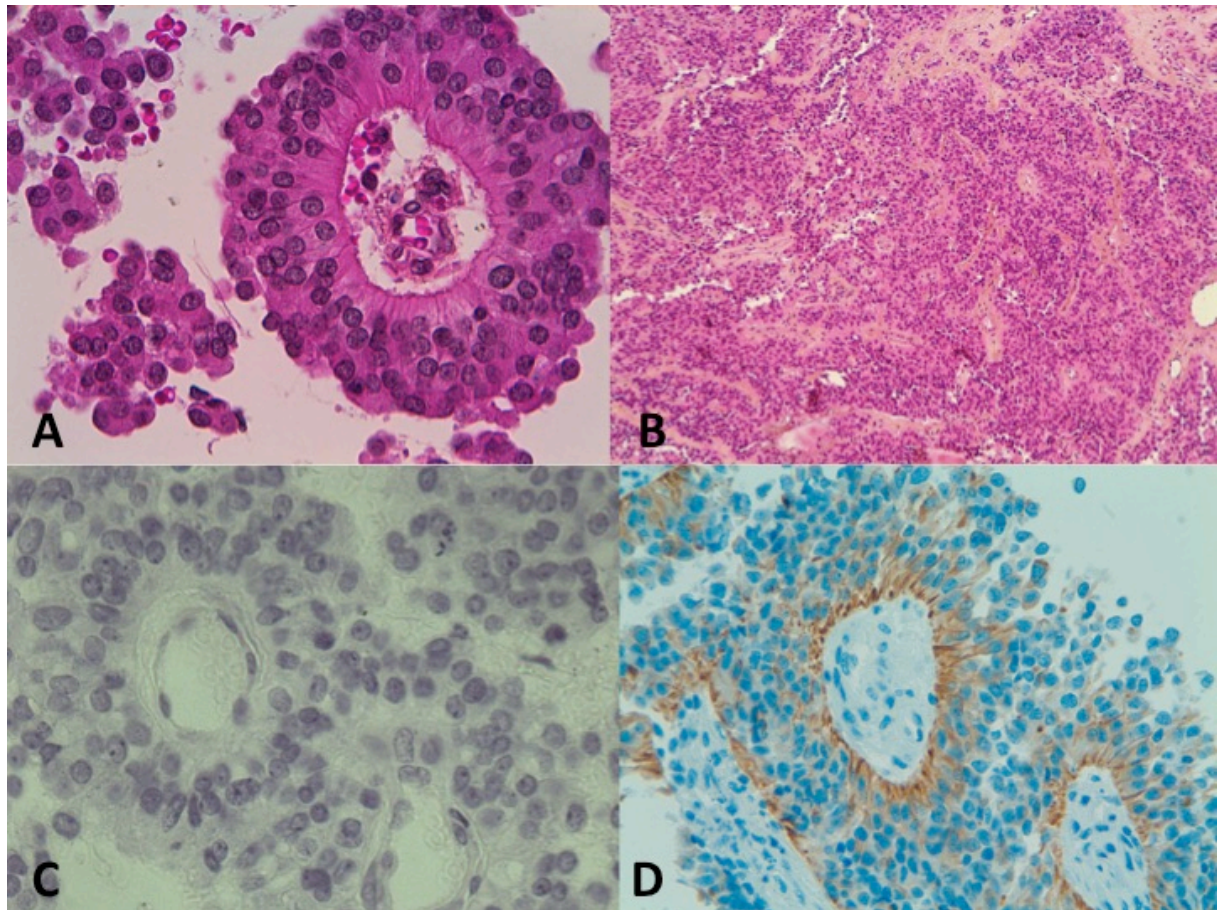


Figure 17. Histopathologie et profil immunohistochimique de la tumeur papillaire de la région pinéale (TPRP).

A- Formation de papilles dont l'axe vasculaire est revêtu de cellules cubo-cylindriques d'aspect épithélial, avec pseudo-stratification des noyaux (Coloration HPS (Hématoxyline-Phloxine-Safran), Grandissement original X 600).

B- Plages d'architecture solide où les formations papillaires ne sont pas individualisables. Cet aspect peut générer des difficultés diagnostiques (Coloration HPS, Grandissement original X 100).

C- Immunohistochimie anti-GFAP : négative (Grandissement original X 600).

D- Immunohistochimie anti-Cytokératine 18 : positivité dans des prolongements périvasculaires (Grandissement original X 400).

Sur le plan ultrastructural, la TPRP se caractérise par une alternance de cellules claires et sombres avec des caractéristiques épithéliales (Jouvet et al, 2003). Leur cytoplasme est abondant et riche en organites. Le noyau est habituellement basal, ovoïde ou indenté. Au pôle apical, les microvillosités sont nombreuses alors que les cils sont rares. Au pôle basal, la cellule forme des prolongements interdigités soulignés d'une membrane basale, contrairement aux épendymomes où la membrane basale est absente. Les

mitochondries sont nombreuses. La cellule est pourvue d'un réticulum endoplasmique granuleux bien développé qui comprend des citernes dilatées par un matériel sécrétoire. Des complexes jonctionnels tels que des jonctions serrées ou des *zonula adherens* sont notamment observés au pôle apical des cellules. De rares vésicules à cœur dense peuvent être rarement identifiées.

Le profil immunohistochimique des TPRP se distingue de celui des épendymomes et des tumeurs des plexus choroïdes (Tableau 5). La TPRP expriment des marqueurs épithéliaux comme la cytokératine 18 (Fig.17D), plus rarement l'EMA (Epithelial Membrane Antigen). La GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), identifiée classiquement dans les épendymomes, n'est habituellement pas retrouvée dans les TPRP (Fig.17C), hormis très focalement. La TPRP exprime intensément la NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule) ou CD56 mais est négative pour l'E-cadhérine. Le profil inverse (négatif pour NCAM, positif pour l'E-cadhérine) est plutôt caractéristique des tumeurs des plexus choroïdes.

| | Ependymome | Papillome des plexus choroïdes | TPRP |
|------------------------|------------|--------------------------------|----------|
| GFAP | POSITIF | NEGATIF | NEGATIF |
| EMA | POSITIF | NEGATIF | Variable |
| Cytokératine 18 | NEGATIF | POSITIF | POSITIF |
| CD56 | POSITIF | NEGATIF | POSITIF |
| E-Cadhérine | NEGATIF | POSITIF | NEGATIF |

Tableau 5. Différences immunohistochimiques générales entre l'épendymome, le papillome des plexus choroïdes et la tumeur papillaire de la région pinéale (TPRP).

3) Tumeur papillaire de la région pinéale et jonctions serrées

La localisation stéréotypée de la TPRP à la paroi postérieure du 3^{ème} ventricule, en avant de la région pinéale, et ses caractéristiques ultrastructurales démontrant une différenciation épendymaire, sécrétoire et neuroendocrine, ont soulevé l'hypothèse d'une origine à partir de l'OSC. Dans une étude analysant le transcriptome de l'OSC prélevé par microdissection laser chez le rat (Szathmari et al, 2013), une surexpression de la claudine 3 a été identifiée. L'expression de cette même protéine, mise en évidence par immunohistochimie, dans deux TPRP, peut suggérer selon les auteurs un lien entre OSC et TPRP.

II) Atteinte hypoxo-ischémique périnatale

1) Généralités

Un débit sanguin cérébral adéquat permet de délivrer au cerveau fœtal l'oxygène et le glucose nécessaire à son bon fonctionnement. Dans la période périnatale, certains évènements comme un hématome rétroplacentaire ou une torsion du cordon ombilical, peuvent altérer l'apport sanguin fœtal. Ceci entraîne secondairement une diminution du débit sanguin cérébral pouvant générer une atteinte hypoxo-ischémique du tissu nerveux (Douglas-Escobar M et Weiss MD, 2015). Par définition, l'hypoxie fait référence à la diminution de la quantité d'oxygène utilisable par les cellules. L'ischémie, elle, correspond à une souffrance tissulaire secondaire à un défaut de perfusion sanguine. Ces deux mécanismes sont le plus souvent intriqués en cas d'« asphyxie » périnatale, d'où le terme « encéphalopathie hypoxo-ischémique (EHI) » pour décrire leurs conséquences sur le système nerveux central.

L'EHI se manifeste chez le nouveau-né par des crises comitiales et par une association variable de troubles affectant la conscience, la fonction respiratoire, le tonus musculaire, les réflexes primaires (par exemple succion ou Moro) et l'alimentation. Sur le plan biologique, une acidose métabolique est typiquement mise en évidence sur les prélèvements sanguins fœtaux ou néonataux précoces. En IRM, une atteinte bilatérale et symétrique des noyaux gris centraux et des thalami associée à un retard de myélinisation du bras postérieur de la capsule interne est évocatrice (Douglas-Escobar M et Weiss MD, 2015).

Suivant l'âge gestationnel, la durée et la sévérité de l'agression hypoxo-ischémique, le tableau neuropathologique résultant varie grandement (Govaert P, 2009). Les lésions hypoxo-ischémiques du nouveau-né à terme affectent principalement la substance grise. Les lésions hypoxo-ischémiques de l'enfant prématuré affectent principalement la substance blanche.

Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans l'EHI sont multiples et intriqués. L'atteinte hypoxo-ischémique entraîne un défaut d'oxygénation et d'apport glucidique à la cellule qui passe en métabolisme anaérobie. En anaérobiose, la quantité d'ATP diminue et le lactate augmente. La carence en ATP altère le fonctionnement de différentes pompes ioniques aboutissant à l'accumulation intracellulaire d'eau et d'ions (œdème cytotoxique). S'y associent des mécanismes d'excitotoxicité et d'inflammation participant au final à la mort cellulaire par nécrose ou apoptose.

2) Excitotoxicité et encéphalopathie hypoxo-ischémique

Le glutamate est un acide aminé assurant un rôle de neurotransmetteur excitateur au niveau des synapses du SNC (Johnston MV, 2005). Le glutamate est reconnu à ce niveau par des récepteurs post-synaptiques parmi lesquels le récepteur NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) et le récepteur AMPA (Acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-isoazole-4-propionique). Ces récepteurs constituent des canaux ioniques. Une fois libéré dans la synapse, le glutamate est recyclé par l'intermédiaire de transporteurs astrocytaires. En cas d'atteinte hypoxo-ischémique, le glutamate s'accumule dans la fente synaptique en raison d'un dysfonctionnement des cellules astrocytaires et de leurs transporteurs. Le glutamate en excès active alors les récepteurs post-synaptiques NMDA et AMPA et aboutit à un influx massif de Ca^{2+} dans la cellule. Cet influx calcique est à l'origine d'une dysfonction mitochondriale entraînant une production de radicaux libres et une activation de caspases pro-apoptotiques (Johnston MV, 2005).

3) Lésions hypoxo-ischémiques de la substance blanche chez l'enfant prématuré

La substance blanche constitue la cible principale de l'atteinte hypoxo-ischémique du SNC chez l'enfant prématuré (Volpe JJ, 2009a ; Volpe JJ, 2009b ; Back SA, 2017). Les lésions peuvent être regroupées en atteinte « focale » et atteinte « diffuse ». Les atteintes focales sont regroupées sous le terme de « *leucomalacie périventriculaire* » (LPV) et correspondent à des foyers de nécrose distribués autour des parois des ventricules. Ces foyers nécrotiques suivent une topographie préférentielle : partie antérieure des cornes ventriculaires frontales, angles externes des ventricules latéraux et face externe des cornes occipitales dans la région des radiations optiques (Fig.18). Ils peuvent être macroscopiquement identifiables sous forme de cavités de plusieurs millimètres (LPV

« kystique ») mais sont généralement microscopiques et non-discernables en imagerie (LPV « non-kystique »).

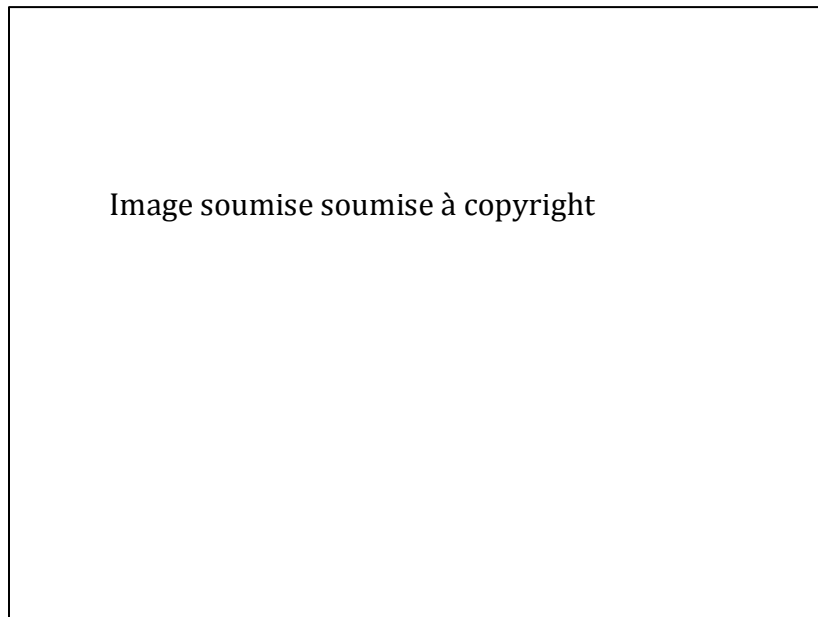


Figure 18. Distribution caractéristique des lésions de leucomalacie périventriculaire « kystique » (D'après Banker et Larroche, Arch Neurol, 1962 ; dans Kinney HC, Seminars in Pediatric neurology, 2009).

L'atteinte diffuse de la substance blanche (White Matter Diffuse Injury) est caractérisée par une astroglie diffuse accompagnée d'un infiltrat microglial et d'une diminution du nombre des pré-oligodendrocytes.

Les mécanismes impliqués dans l'atteinte hypoxo-ischémique de la substance blanche sont multiples et intriqués. Parmi ces mécanismes, on peut noter le stress oxydatif, la cascade excitotoxique liée aux récepteurs NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate) et certaines propriétés de la vascularisation cérébrale fœtale (Back SA, 2017).

Les pré-oligodendrocytes humains expriment des récepteurs AMPA dans une fenêtre temporelle située entre 23 et 33 SA. Contrairement aux neurones, les oligodendrocytes ne semblent pas exprimer de récepteurs NMDA. Cependant, l'injection directe d'un agoniste des récepteurs NMDA, l'iboténate, provoque des lésions de la substance

blanche comparables à la leucomalacie. Ces lésions seraient provoquées par une activation de la microglie par l'iboténate à l'origine d'une sécrétion de radicaux libres et de cytokines inflammatoires (Tahraoui SL et al, 2001).

4) Agents neuroprotecteurs

Pour lutter contre les lésions de l'EHI, différentes stratégies neuroprotectives peuvent être mises en place (Dixon BJ et al, 2015):

- hypothermie
- inhibiteurs des récepteurs au glutamate
- sulfate de magnésium (bloqueur des récepteurs NMDA)
- sang de cordon ombilical riche en cellules souches hématopoïétiques et facteurs neurotrophiques.

4) Lésions hémorragiques chez l'enfant prématuré

L'éminence ganglionnaire correspond à un renflement de la zone sous-ventriculaire, située au niveau du sillon thalamo-strié et bombant dans la cavité des ventricules latéraux. L'éminence ganglionnaire constitue une réserve de précurseurs neuronaux et gliaux qui va progressivement se tarir au cours du développement. Cette structure est typiquement le siège d'hémorragies chez l'enfant prématuré, suggérant une fragilité intrinsèque (Ballabh P et al, 2010). L'hémorragie de la zone germinative (ou matrice germinale) peut se compliquer d'une hémorragie intraventriculaire puis d'une extension dans le parenchyme cérébral. La localisation préférentielle des hémorragies dans la zone germinative a été expliquée par différents mécanismes : densité vasculaire élevée, fragilité vasculaire intrinsèque, haut débit sanguin cérébral sans autorégulation et

présence d'un angle aigu entre la veine terminale et la veine cérébrale interne au niveau de l'éminence ganglionnaire, renforçant la fragilité vasculaire.

5) Intérêt de l'étude des jonctions serrées dans les atteintes hypoxo-ischémiques et hémorragiques périnatales

Les agressions hypoxo-ischémiques du SNC sont à l'origine d'une perturbation de la BHE (Mark KS et Davis TP, 2002). Dans ce contexte pathologique, l'organisation des jonctions serrées, participant fortement au maintien de l'intégrité de la barrière, est perturbée et l'on observe notamment des anomalies de distribution de l'occludine et de ZO-2.

Parmi les hypothèses pouvant expliquer la propension de l'éminence ganglionnaire à saigner, l'immatunité du système jonctionnel de la vascularisation a été proposée (Ballabh P et al, 2005). L'étude de différentes protéines de jonctions serrées incluant la claudine 5, l'occludine et JAM-1 n'a pas montré de différence particulière au niveau de la vascularisation de l'éminence ganglionnaire par rapport à la vascularisation du cortex ou de la substance blanche dans des encéphales de fœtus et enfants prématurés. Ce résultat suggère que la vulnérabilité de cette zone aux accidents hémorragiques n'est pas expliquée par une immaturité moléculaire de la BHE en terme de jonctions serrées. D'autres « acteurs », tels que la membrane basale ou le manchon péricytaire, pourraient être impliqués dans ce phénomène.

PARTIE IV : BARRIERE ENZYMATIQUE: ENZYMES DE DETOXIFICATION

I) Généralités sur les mécanismes enzymatiques de détoxification des xénobiotiques :

Les xénobiotiques sont par définition des molécules étrangères à l'organisme c'est-à-dire non produites par celui-ci. On compte parmi ces substances les médicaments, les toxiques (caféine, alcool), les polluants, les composés issus de l'industrie chimique (solvants, pesticides) et certains composants alimentaires. Certains xénobiotiques ont un potentiel cancérigène.

Le principe de base du métabolisme des xénobiotiques est de convertir une molécule lipophile, non-polaire, non-excrétable en un produit polaire, hydrosoluble, excrétable dans la bile ou les urines (Declèves X et al, 2014).

On distingue 2 types principaux de réaction :

- 1) Les **réactions de Phase I** (Fig.19) ou fonctionnalisation correspondent à l'adjonction ou l'exposition d'un groupement fonctionnel au xénobiotique (exemples : groupements hydroxyle -OH, thiol -SH, amine -NH₂, carboxyle -COOH). La famille enzymatique du cytochrome P450 est le groupe principal responsable de ce type de réaction. Cette catégorie d'enzymes est fixée aux membranes cellulaires, essentiellement le réticulum endoplasmique.
- 2) Les **réactions de Phase II** (Fig.19) correspondent à la conjugaison d'une biomolécule polaire, hydrosoluble au xénobiotique. Pour que cette conjugaison puisse se réaliser, la présence ou l'ajout au préalable d'un groupement

fonctionnel sur la molécule à détoxifier est indispensable. Les transférases sont les enzymes impliquées dans les réactions de Phase II (Glutathion-S-transferases, UDP-glucuronosyl-transférase, Sulfo-transférases).

A ces deux phases principales, on peut ajouter une phase III d'export qui correspond à l'excrétion du xenobiotique de la cellule par un transporteur, notamment de la famille ABC (Fig.19).

L'organe principal impliqué dans la biotransformation des xénobiotiques est le foie et ses cellules : les hépatocytes.

Dans de rares cas, la biotransformation du xénobiotique par le système enzymatique peut être à l'origine de la formation d'un composé intermédiaire réactif. Ce dernier peut ensuite interagir avec les différentes molécules de son environnement et ainsi altérer le fonctionnement cellulaire. Parmi ces composés réactifs, on compte des molécules électrophiles et des radicaux libres qui sont impliqués dans les processus de cancérogenèse. Des systèmes anti-oxydants comme les enzymes superoxyde dismutase, glutathion peroxydase ou catalase peuvent alors inactiver ces produits (Fig.19).

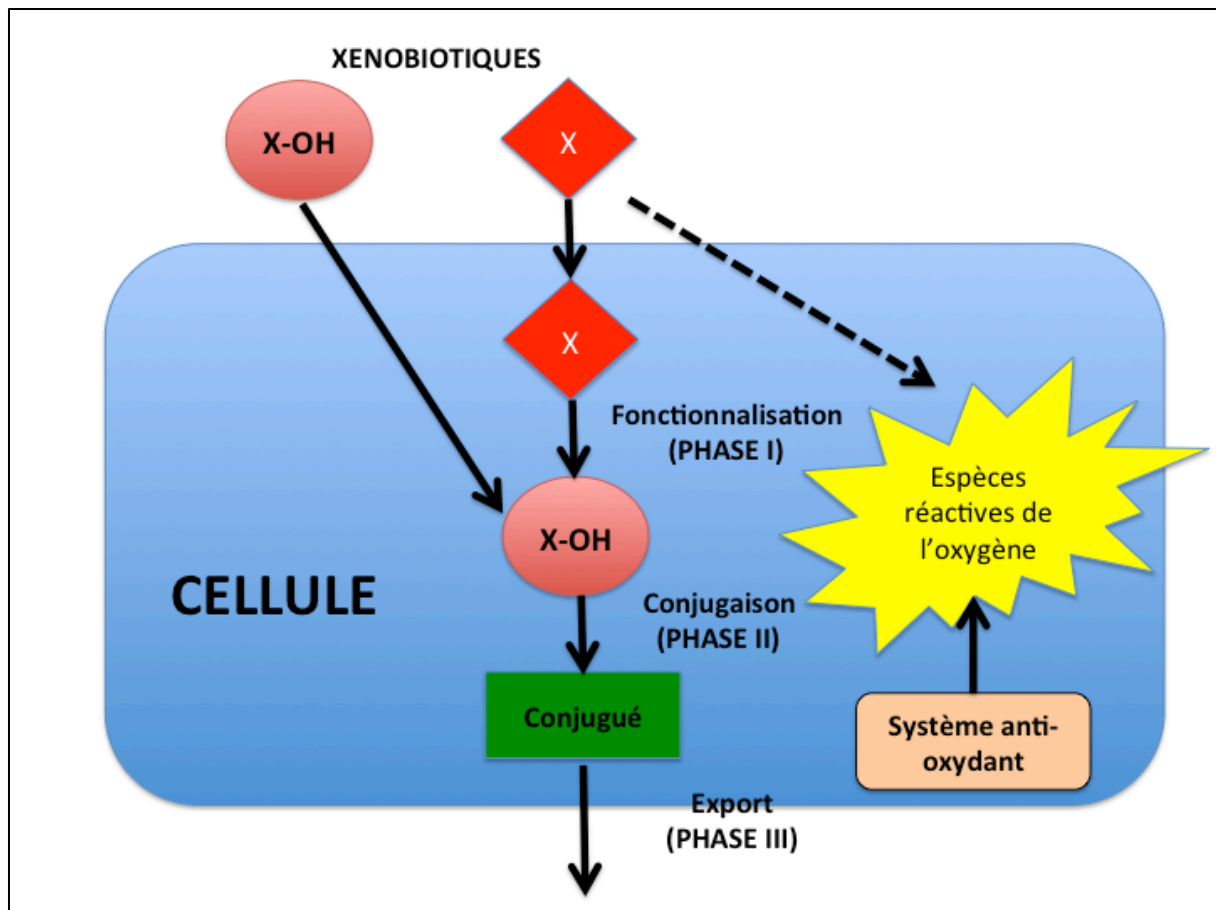


Figure 19. Métabolisme des xénobiotiques (molécule X)

II) Enzymes de détoxification et interfaces sang-cerveau

Au niveau systémique et notamment hépatique, les enzymes de phase I ont pour rôle de rendre le xénobiotique plus polaire donc plus hydrosoluble afin d'en faciliter l'excrétion. La présence de ces enzymes au niveau de la BHE pose donc question car l'encéphale n'a pas un rôle excrétoire. Il est possible d'envisager alors que ces enzymes ont plutôt un rôle neuroprotecteur en inactivant des composés pharmacologiquement actifs ou des éléments toxiques (Declèves X et al, 2014).

a) Au niveau de la barrière hémato-encéphalique

Phase I

La famille du cytochrome P450 regroupe de nombreuses enzymes qui catalysent des réactions oxydatives de phase I (Declèves X et al, 2014). Elles sont principalement exprimées dans le foie où leur rôle dans le métabolisme des médicaments est essentiel. Contrairement au foie où les deux formes les plus abondantes sont le CYP3A4 et le CYP2C8/9, les deux isoformes les plus représentées au niveau des microvaisseaux cérébraux sont CYP1B1 et CYP2U1 (Dauchy S et al, 2008 ; Shawahna R et al, 2011). CYP2U1 ne semble pas présenter de rôle majeur dans la détoxification médicamenteuse mais pourrait participer au métabolisme de substances endogènes comme l'acide arachidonique. CYPB1, lui, participe au métabolisme de certains xénobiotiques mais son action est mieux connue dans le métabolisme de l'acide arachidonique et de certaines hormones comme l'œstradiol.

L'époxyde hydrolase est une enzyme de détoxification inactivant habituellement les époxydes carcinogènes. Une analyse plus détaillée de cette enzyme au niveau de la BHE est incluse dans la section II de cette partie.

Phase II

Parmi les enzymes de phase II, les glutathion-S-transférases (GST) sont des enzymes cytosoliques impliquées dans le métabolisme des médicaments et les phénomènes de détoxification. Le glutathion est un tripeptide formé par l'association de l'acide glutamique, de la cystéine et de la glycine. Plusieurs isoformes de GST (alpha, mu et pi) ont été identifiées dans l'encéphale chez l'homme (Listowsky I et al, 1998). Au niveau de la BHE, la GST pi1 est une des formes prépondérantes (Shawahna R et al, 2011). Les

données sur les UDP-glucuronosyl-transférases (UGT) sont discordantes. Dans une étude, une activité de glucuronoconjugaison pour des molécules à structure « plane » a été identifiée dans les microvaisseaux cérébraux du rat (Gherzi-Egea et al, 1994). Par contre, dans une étude transcriptomique chez l'homme, aucune expression de différents isoformes d'UGT n'a été détectée au niveau des microcapillaires cérébraux (Shawahna R et al, 2011).

Concernant les enzymes de sulfoconjugaison, un faible niveau d'expression du gène *SULTA1* a été observé dans les capillaires cérébraux humains (Shawahna R et al, 2011).

b) Au niveau de la barrière sang-LCR (plexus choroïdes)

Phase I

Des activités enzymatiques dépendantes des CYP ont été identifiées dans le plexus choroïde isolé de rat à des niveaux néanmoins inférieurs au foie (Gherzi-Egea et al, 1994). Une étude a montré une expression de CYP1A1 au niveau des plexus choroïdes de rat mais seulement après induction par un carcinogène et seulement au niveau des vaisseaux choroïdiens (Morse DC et al, 1998).

L'époxyde hydrolase a été identifiée à des taux très élevés au niveau des plexus choroïdes. Une analyse plus détaillée de l'époxyde hydrolase au niveau des plexus choroïdes est incluse dans la section II de cette partie.

Phase II

Chez le rat, l'activité des isoenzymes UGT dans le tissu choroïdien est forte atteignant les activités mesurées dans le foie (Gherzi-Egea J et al, 1994 ; Strazielle N et Gherzi-Egea J, 1999). Cette activité est identifiée dans l'épithélium choroïdien et est inductible par des

hydrocarbures aromatiques polycycliques exogènes comme le benzo[a]pyrène (cancérogène issu de la combustion incomplète du tabac notamment).

L'identification par immunohistochimie des 3 classes principales de GST, alpha, mu et pi, impliquées dans les processus de détoxification a été rapportée dans les plexus choroïdes des rongeurs (Philbert MA et al, 1995). Chez l'homme, la GST pi a été détectée dans les plexus choroïdes du cerveau adulte et fœtal dès 12 SA (Carder PJ et al, 1990). La GST alpha n'a été identifiée que dans le cerveau adulte et seulement dans de rares cellules choroïdiennes. L'ensemble de ces données suggère un rôle important des mécanismes de détoxification liés aux GST à l'interface sang-LCR (plexus choroïdes).

Des niveaux élevés de sulfoconjugaison par SULTA1 ont été mis en évidence dans les plexus choroïdes du fœtus humain (Richard K et al, 2001).

c) Système anti-oxydant

Le système anti-oxydant regroupe plusieurs enzymes dont le rôle est d'inactiver les espèces réactives de l'oxygène. Ces composés réactifs dérivés de l'oxygène comprennent notamment l'anion superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , ou le radical hydroxyle $\cdot OH$ et participent au stress oxydatif (Migdal C et Serres M, 2011). Les enzymes impliquées dans l'inactivation de ces composés réactifs sont les glutathion peroxydases, la superoxyde dismutase et la catalase. Les plexus choroïdes semblent posséder une machinerie anti-oxydante puissante pour combattre les espèces réactives de l'oxygène tels que le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène présente une liaison instable O-O. Sa toxicité est en majeure partie liée à sa capacité de générer un radical hydroxyle $\cdot OH$ en présence de cations métalliques comme le fer Fe^{2+} ou le cuivre Cu^{2+} . Le radical hydroxyle peut réagir avec les nucléotides de l'ADN au niveau des doubles liaisons. La glutathion peroxydase est une enzyme permettant la transformation

du peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en molécules d'eau selon la réaction suivante : $2GS$ (glutathion réduit) + H_2O_2 = $GS-SG$ (glutathion oxydé) + $2 H_2O$. La glutathion réductase est une enzyme permettant de réduire le glutathion oxydé par consommation de NADPH permettant ainsi de maintenir le cycle d'oxydoréduction du glutathion. En plus d'être un cofacteur des GST (enzyme de phase II) et un cofacteur de la glutathion peroxydase, le glutathion réduit est aussi un anti-oxydant intracellulaire majeur. Des activités anti-oxydantes de la catalase, de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase ont été identifiées dans les plexus choroïdes de rat (Tayarani I et al, 1989). L'activité de la glutathion peroxydase était de 10 à 14 fois supérieure dans les plexus choroïdes comparée aux capillaires cérébraux, au tissu cérébral et au cervelet (Tayarani I et al, 1989).

III) Exemple des époxyde hydrolases

a) Généralités

Les époxydes hydrolases (EH) sont des enzymes considérées comme des agents de détoxification. Elles catalysent l'hydrolyse du cycle oxirane des époxydes pour le transformer en groupe dihydrodiol par adjonction d'une molécule d'eau (Decker M et al, 2009). Des molécules d'époxyde peuvent être générées dans l'organisme comme réactifs intermédiaires lors de la prise en charge métabolique de xénobiotiques (phase I de fonctionnalisation, voir Fig.19). L'époxyde possède une réactivité électrophile conférée par sa configuration cyclique et la polarisation des liaisons CO. Cette électrophilie est à l'origine de son potentiel génotoxique. L'hydrolyse des époxydes catalysée par les EH est en général vue comme une bioinactivation, mais dans certains cas elle peut être à

l'origine de la formation de composés cancérigènes comme le montre l'exemple du benzo[a]pyrène. Dans ce cas, l'époxyde hydrolase dans sa forme microsomale participe à une chaîne de réaction enzymatique aboutissant à la production de benzo[a]pyrène-diol-époxyde, un produit cancérigène se liant aux molécules d'ADN pour former des adduits (Decker M et al, 2009).

Il existe deux types principaux d'EH :

- l'époxyde hydrolase soluble (EHs ou EPHX2)
- l'époxyde hydrolase microsomale (EHm ou EPHX1)

L'EHs est une enzyme cytosolique dont le rôle dans la régulation circulatoire cérébrovasculaire a été largement étudié (Zhang W et al, 2013). Ce rôle physiologique est principalement médié par l'action des EH sur les acides époxyéicosatriénoïques (AEE). Ces derniers sont catalysés en acides dihydroéicosatriénoïques (ADE) par les EH. Les ADE sont considérés comme des molécules biologiquement moins actives que les AEE. La fonction des EH vis-à-vis des AEE est donc une inactivation. Or, les AEE ont une action vasodilatatrice, anti-inflammatoire, anti-thrombotique et proangiogénique ce qui explique l'intérêt d'inhiber les EH afin d'obtenir un effet neuroprotecteur (Larsen BT et al, 2006).

L'EHm est une enzyme liée aux membranes cellulaires, principalement le réticulum endoplasmique. Bien que l'EHm soit capable de métaboliser les AEE, c'est l'EHs qui est l'acteur principal de leur métabolisme. Le rôle principal de l'EHm est d'inactiver les époxydes exogènes ou les époxydes formés par le métabolisme oxydatif (Cytochrome P450) de certains xénobiotiques (polluant, médicament) protégeant ainsi l'organisme de leur pouvoir cancérigène (Decker M et al, 2009).

b) Les époxydes hydrolases au niveau des interfaces sang-cerveau

i) Chez le rongeur

- Dans le cerveau de souris :

Par immunohistochimie, l'EHS est principalement détectée dans la glie astrocytaire (Marowsky A et al, 2009) du cerveau de souris et notamment dans les pieds astrocytaires au contact des vaisseaux. Seuls certains neurones du noyau amygdalien expriment l'EHS.

Par immunohistochimie, l'EHm est identifiée, elle, dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses artériolaires et certains astrocytes (Marowsky A et al, 2009). Certaines populations neuronales sont particulièrement immunoréactives : hippocampe, striatum, noyau amygdalien central, substance noire et couche granuleuse du cervelet. L'expression la plus forte d'EHm est détectée dans les cellules épithéliales du plexus choroïde.

- Dans le cerveau de rat :

Une activité enzymatique de EHm supérieure au tissu cérébral en entier a été mise en évidence dans des homogénats de microvaisseaux isolés de rat (Gherzi-Egea J et al, 1988). Une activité importante de EHm évaluée par spectrofluorimétrie a été mise en évidence au niveau des interfaces sang-LCR, représentées par les plexus choroïdes. Dans cette étude, cette activité était aussi importante que celle évaluée dans le foie (Gherzi-Egea J et al, 1994). Ces données sont en accord avec le rôle de « barrière » enzymatique des plexus choroïdes mais aussi de leur action potentielle en tant que véritable système de détoxification cérébrale.

ii) Chez l'homme

Par immunohistochimie, l'EHS est identifiée dans les oligodendrocytes, les corps neuronaux et quelques rares astrocytes dans le cortex cérébral (Sura P et al, 2008). Dans la substance blanche, les oligodendrocytes sont positifs. Une expression est aussi observée principalement au pourtour des cellules gliales au niveau du putamen et du globus pallidus. Une expression comparable associée cette fois-ci à une forte immunoréactivité dans les neurones est identifiée dans l'hippocampe, le thalamus et la substance noire. Les cellules gliales positives sont généralement GFAP-négatives et donc supposées être des oligodendrocytes. Il existe une expression marquée dans les cellules épithéliales des plexus choroïdes, dans les vaisseaux méningés, dans les neurones de la moëlle épinière, dans les cellules acidophiles et chromophobes de l'hypophyse et dans les neurones du pont et du bulbe. Dans le cervelet, une faible réactivité dans la couche des grains et dans les cellules gliales de la couche moléculaire est observée. Dans cette étude, l'expression de l'EHS est confirmée par Western Blot (cortex cérébral et thalamus). L'activité enzymatique est évaluée à 1,7 à 2,1 nmol/min/mg de prot, sans différence significative entre les différentes régions cérébrales explorées mais très sensiblement différente de l'activité hépatique (16,2 nmol/min/mg de prot).

L'existence d'une activité enzymatique de l'EHS dans différentes régions du cerveau humain (néocortex, hippocampe, noyau lenticulaire et cervelet) a été mise en évidence par spectrofluorimétrie en utilisant le benzo[a]pyrène comme substrat (Gherzi-Egea J et al, 1993) (environ 300 pmol/min/mg de protéine contre 30 pour le rat). Une forte activité de l'EHS a aussi été identifiée au niveau des plexus choroïdes (Gherzi-Egea et al, 1994).

La présence de l'ARNm de l'Ehm, détectée par RT-PCR, a été mise en évidence dans l'encéphale humain dans différentes régions (cortex frontal, cortex occipital, pont, noyau rouge et cervelet). L'immunodétection de l'Ehm confirme ces résultats et localise l'expression de l'Ehm dans la plupart des neurones et une partie des astrocytes (Farin FM et Omiecinski CJ, 1993).

Il existe donc une variabilité inter-espèces dans l'expression de l'Ehm et de l'Ehs. Néanmoins dans toutes les études, la présence de l'Ehm dans les plexus choroïdes à l'âge adulte est une constante.

IV) Enzymes de détoxification et interfaces sang-cerveau au cours du développement

Les données sur les capacités de détoxification de l'interface sang-LCR (plexus choroïdes) au cours du développement sont minimes. On peut noter, comme décrit précédemment une expression différentielle des GST alpha et pi et une forte activité de SULTA1 dans les plexus choroïdes chez l'homme au cours du développement (Carder PJ et al, 1990 ; Richard K et al, 2001). Une activité GST a été mise en évidence dans les plexus choroïdes de rat avec une activité plus importante chez le rat nouveau-né comparée au rat adulte (Gherzi Egea et al, 2006). Il existe également une forte activité GST dans les plexus choroïdes du fœtus humain (Gherzi Egea et al, 2006).

Concernant la BHE, une expression de GST pi a été identifiée dans l'endothélium vasculaire du cerveau fœtal humain (Carder PJ et al, 1990).

OBJECTIFS

Objectifs généraux :

Notre travail de thèse a pour objectifs généraux :

- 1) l'analyse des interfaces entre le sang et le système nerveux central au cours du développement
- 2) explorer les applications qu'il est possible d'en tirer en pathologie.

Cette analyse s'est concentrée sur deux des propriétés de ces interfaces :

- la propriété de « barrière physique » sous-tendue par la présence de jonctions serrées
- la propriété de « barrière enzymatique » à travers l'étude de différentes enzymes de détoxification.

Notre travail s'est particulièrement centré sur l'étude des jonctions serrées et sur un groupe de molécules constitutives de ces jonctions : **les claudines** au niveau de différentes interfaces :

- la barrière sang-LCR : les plexus choroïdes
- un exemple d'organe circumventriculaire : l'organe sous-commissural
- la barrière hémato-encéphalique

ETUDE 1 : Analyse de l'expression des claudines au niveau de la barrière sang-LCR au cours du développement chez le rat et chez l'homme

Introduction :

Longtemps considérée comme une structure lâche et perméable chez le fœtus, la barrière sang-LCR (plexus choroïdes) présente des jonctions serrées très tôt dans le développement. La structure moléculaire et la dynamique de ces jonctions au cours du développement ne sont cependant pas clairement déterminées chez le modèle murin et sont largement inconnues chez l'homme.

Questions :

Quel est le degré d'immaturation de l'interface sang-LCR (plexus choroïdes) chez le rat et chez l'homme au cours du développement ?

Existe-il un système de jonctions serrées précocement mis en place au cours du développement chez le rat et chez l'homme ?

La composition moléculaire des jonctions serrées au niveau de l'interface sang-LCR est-elle statique ou au contraire dynamique ?

Objectifs :

- 1) Définir la composition de l'interface sang-LCR (plexus choroïdes) en claudines (protéines de jonctions serrées) chez le rat au cours du développement.
- 2) Définir la composition de l'interface sang-LCR (plexus choroïdes) en claudines (protéines de jonctions serrées) chez l'homme au cours du développement.

Article correspondant :

Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier.

Kratzer I, **Vasiljevic A**, Rey C, Fevre-Montange M, Saunders N, Strazielle N, Gherzi-Egea JF (2012) Histochemistry and cell biology 138:861-879.

ETUDE 2 : Analyse des modifications de la barrière hémato-encéphalique et de la barrière sang-LCR dans un modèle d'excitotoxicité néonatale

Introduction :

L'injection intracérébrale d'iboténate constitue un modèle d'atteinte excitotoxique du SNC qui peut mimer les encéphalopathies hypoxo-ischémiques néonatales. Dans ces atteintes, les modifications de la BHE et de la barrière sang-LCR sont mal déterminées. Le rôle neuroprotecteur de la mélatonine, hormone anti-oxydante dont la forme endogène est sécrétée par la glande pinéale, sur ces lésions n'est pas connu.

Questions:

Quelles sont les lésions induites par l'iboténate chez le rat nouveau-né ?

Quelles sont les perturbations de la BHE et de l'interface sang-LCR (plexus choroïdes) dans ce modèle notamment quant à l'intégrité des jonctions serrées ?

La mélatonine, hormone anti-oxydante, a-t-elle un effet protecteur ?

Objectifs :

- 1) Définir les lésions induites par une drogue excitotoxique chez le raton.
- 2) Définir les perturbations de la BHE et de la barrière sang-LCR par l'étude des claudines (claudine 5 et claudine 2 respectivement).

Article correspondant :**Melatonin reduces excitotoxic blood-brain barrier breakdown in neonatal rats.**

Moretti R, Zanin A, Pansiot J, Spiri D, Manganozzi L, Kratzer I, Favero G, **Vasiljevic A**, Rinaldi VE, Pic I, Massano D, D'Agostino I, Baburamani A, La Rocca MA, Rodella LF, Rezzani R, Ek J, Strazielle N, Ghersi-Egea JF, Gressens P, Titomanlio L. *Neuroscience* 2015 ; 311:382-397.

ETUDE 3 : Analyse de l'expression des claudines dans l'organe sous-commissural chez l'homme. Evaluation de leur intérêt dans le diagnostic des tumeurs périventriculaires**Introduction :**

En tant qu'OCV, l'organe sous-commissural (OSC) présente un profil de barrière inhabituel au sein du SNC, notamment caractérisé par une couche d'épendymocytes spécialisés reliés par des jonctions serrées. D'analyse limitée chez l'homme de par sa régression à l'âge adulte, l'OSC serait à l'origine d'une tumeur périventriculaire, la tumeur papillaire de la région pinéale.

Questions :

Quelle est la composition moléculaire (claudines) de l'OSC chez le fœtus humain ?

Les tumeurs périventriculaires expriment-elles des claudines ?

Est-ce que leur composition différentielle en claudines peut être une aide dans leur diagnostic ?

Objectifs :

- 1) Définir la composition en claudines d'un OCV, l'OSC, chez le fœtus humain.
- 2) Evaluer l'utilité des claudines comme marqueur diagnostique de différentes tumeurs périventriculaires chez l'homme.

Article correspondant :

Histopathologic and ultrastructural features and claudin expression in papillary tumors of the pineal region : a multicenter analysis.

Fèvre-Montange M*, **Vasiljevic A***, Bergemer-Fouquet AM, Bernier M, Champier J, Chrétien F, Figarella-Branger D, Kemeny JL, Lechapt-Zalcman E, Michalak S, Miquel C, Mokhtari K, Pommepuy I, Quintin-Roué I, Rousseau A, Saint-Pierre G, Salon C, Uro-Coste E, Varlet P, Kratzer I, Ghersi-Egea JF, Jouvét A. Am J Surg Pathol 2012 ; 36: 916-928

* : co-premiers auteurs

ETUDE 4 : Analyse de l'expression d'enzymes de détoxification dans l'encéphale foetal humain

Introduction :

En plus des jonctions serrées, les mécanismes de neuroprotection du SNC comprennent des transporteurs d'efflux et des enzymes de détoxification. L'expression de ces enzymes au cours du développement cérébral chez l'homme est mal connue.

Questions :

Des enzymes de détoxification comme l'époxyde hydrolase sont exprimées dans les plexus choroïdes chez l'adulte. Ces enzymes sont-elles exprimées au cours du développement ?

Objectifs :

- 1) Analyser par immunohistochimie l'expression de différentes enzymes de détoxification chez le fœtus humain à 22 SA.
- 2) Evaluer l'intensité de l'immunomarquage et sa localisation dans le SNC (neuro-épendyme, cortex, plexus choroïdes, zone sous-ventriculaire, capillaires).

MATERIEL ET METHODES

| | Rat | Humain | Histologie | ME | IHC | IF | WB | RT-PCR |
|---------|-----|--------|------------|----|-----|----|----|--------|
| ETUDE 1 | X | X | X | | X | X | X | X |
| ETUDE 2 | | X | X | | X | | | |
| ETUDE 3 | X | | X | X | X | | | X |

Tableau 6. Techniques suivant les études

Abréviations : immunofluorescence (IF) ; immunohistochimie (IHC) ; microscopie électronique (ME) ; PCR avec transcription inverse (RT-PCR) ; Western blot (WB).

1) Prélèvements d'origine humaine

a) Plexus choroïdes fœtaux humains

Les prélèvements de tissu nerveux fœtal humain proviennent d'examen foetopathologiques réalisés au Centre de Pathologie et Neuropathologie Est de Lyon (Tableau 7). L'accord pour la réalisation de l'examen autopsique ainsi que la conservation de matériel à but scientifique ont été préalablement signés par les parents selon les lois en vigueur en France. Les encéphales fœtaux ont été fixés au formol zinc de 3 à 67 jours (voir tableau). Les âges des fœtus autopsiés s'échelonnent de 10 à 41 semaines d'aménorrhée. Des prélèvements provenant de l'encéphale d'un enfant de 2 ans et demi ont également été analysés.

| Cas | Semaines d'aménorrhée | Contexte clinique | Durée de fixation (jours) |
|-----|---------------------------------|---|---------------------------|
| 1 | 10 | Fausse couche spontanée | 3 |
| 2 | 12 | Malformations des membres | 3 |
| 3 | 12 | Fausse couche spontanée | 7 |
| 4 | 18 | Rupture spontanée des membranes | 13 |
| 5 | 20 | Grossesse gemellaire Rupture spontanée des membranes | 43 |
| 6 | 22 | Chorioamnionite aiguë | 40 |
| 7 | 22-23 | Grossesse gemellaire Fausse couche tardive | 35 |
| 8 | 23 | Chorioamnionite aiguë | 67 |
| 9 | 24 | Chorioamnionite aiguë | 8 |
| 10 | 30-31 | Prematurité, hypoplasia pulmonaire, hypoxie réfractaire | 58 |
| 11 | 40 | Mort postpartum, MIN | 54 |
| 12 | 41 | Mort postpartum, MIN | 17 |
| 13 | 2 mois et 17 jours (post-natal) | MIN | 38 |

Tableau 7. Matériel fœtal humain. Abréviations : MIN : mort inopinée du nourrisson

b) Tumeurs périventriculaires

Les prélèvements tumoraux ont été collectés à partir des archives du Centre de Pathologie et Neuropathologie Est (CHU de Lyon). Ils consistent en 4 papillomes des plexus choroïdes (2 typiques et 2 atypiques) et 4 épendymomes (3 épendymomes de grade II de l’OMS comprenant 2 tumeurs de la moëlle épinière et une tumeur de la fosse cérébrale postérieure, et un épendymome de grade III de l’OMS développé dans le 4^{ème} ventricule). Ont été également analysés 14 cas de tumeurs papillaires de la région pinéale. Les prélèvements ont été fixés au formol zinc ou en AFA (alcool, formaldéhyde, acide acétique).

2) Animaux et prélèvements d’origine animale

Les soins et les expérimentations effectués sur les animaux ont été réalisés conformément au décret français 87-848 du 19 Octobre 1987 et à la directive européenne 2010/63/EU.

a) Animaux utilisés

- Pour l’étude de la barrière sang-LCR au cours du développement :

Des rats Sprague-Dawley (mâles de 250g, femelles gestantes et femelles avec portée) ont été obtenus des laboratoires Janvier (Le Genest Saint Isle, France). Tous les animaux ont été soumis à un environnement similaire : cages standards, accès libre à l’eau et à la nourriture et cycle jour/nuit 12h/12h.

- Pour l'étude des lésions excitotoxiques :

Des rats femelles Sprague-Dawley avec une portée de 4 jours (10 ratons par portée) ont été obtenus des laboratoires Charles River (St Germain-sur-l'Arbresle, France). Les rats ont été placés dans un environnement contrôlé pour la lumière et la température avec accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*.

b) Génération des lésions excitotoxiques

Les lésions excitotoxiques ont été réalisées chez des ratons P5 par une injection intracérébrale d'iboténate dilué dans du PBS à la concentration de 5mg/mL (Tocris 0285, Bristol, Royaume-Uni). L'iboténate était injecté dans le parenchyme cérébral néopallial à l'aide d'une aiguille de 25 Gauges et d'une seringue Hamilton de 50 μ L (Massay, France) montée sur un microdoseur calibré fixé à un bras rigide. L'aiguille a été insérée dans le parenchyme cérébral de la région fronto-pariétale droite selon les coordonnées suivantes : à 2 mm de profondeur à partir de la surface du scalp ; à 2,5 mm de la ligne médiane dans le plan médio-latéral ; à 4 mm en avant du bregma dans le plan rostro-caudal. Deux bolus de 1 μ L correspondant à 5 μ g d'iboténate chacun ont été injectés. Cette dose est connue pour être associée à une atteinte cérébrale constante chez les souris P5 dans une étude. Deux groupes Sham (placebo) ont été inclus dans l'étude avec, pour l'un, insertion de l'aiguille seule et pour l'autre, injection de PBS seul. La mélatonine (5 mg/kg) a été diluée dans une solution de PBS 1X-DMSO 5% puis injectée par voie intrapéritonéale. Les ratons témoins n'ont reçu qu'une injection intrapéritonéale de PBS 1X-DMSO 5%. Toutes les injections intrapéritonéales ont été réalisées 10 minutes après les injections d'iboténate. Les prélèvements destinés à l'étude des ARNs ont été manipulés en conditions RNase-free. Les prélèvements

destinés à l'étude de l'expression génique et des Western blot ont été congelés en azote liquide et conservés à -80°C. Pour les analyses immunohistochimiques, les encéphales prélevés du stade E19 au stade adulte ont été congelés à -50°C dans l'isopentane, enrobés dans du Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe, Pays-Bas) et conservés à -80°C.

c) Prélèvements tissulaires

- Pour l'étude de la barrière sang-LCR au cours du développement :

Les animaux ont été euthanasiés par décapitation après anesthésie par isoflurane. Pour chaque animal, l'encéphale a été rapidement extrait de la boîte crânienne et immergé dans un tampon Krebs-Ringer à 4°C (135 NaCl ; 4 KCl ; 2,2 CaCl₂ ; 1,2 MgCl₂ ; 6 NaHCO₃ ; 10 HEPES, 5 Glucose, unités : mM/pH=7,4). Les deux plexus choroïdes des ventricules latéraux et les plexus choroïdes du 4^{ème} ventricule ont été disséqués individuellement chez des animaux à P2, P9 et adultes à 4°C sous un microscope stéréoscopique. Les embryons de rats à E19 ont été extraits de la mère un par un, la mère étant anesthésiée par isoflurane et placée sur une plaque chauffante pendant la procédure. L'extraction de l'encéphale et la dissection des plexus choroïdes ont ensuite été réalisées chez les animaux à E19. Les plexus choroïdes provenant de 2 à 5 animaux selon le stade de développement, ont été regroupés. Après la dissection des plexus choroïdes, le cortex cérébral était échantillonné à tous les stades de développement. Les fragments de cortex étaient débarrassés des méninges visibles à leur surface sous contrôle microscopique. Les tissus ainsi isolés ont été utilisés pour les études de protéines (homogénats), pour l'extraction de l'ARN et pour la préparation des microvaisseaux. Les microvaisseaux corticaux ont été isolés et leur pureté vérifiée selon les protocoles préalablement établis (Gazzin S et al, 2008).

- Pour l'étude des lésions excitotoxiques :

Des animaux des deux sexes provenant de chaque groupe (groupe iboténate seul et groupe iboténate + mélatonine) ont été sacrifiés par décapitation à différents temps (13 animaux au total). Les encéphales ont été disséqués et fixés dans le RCL2, un fixateur sans formaldéhyde (RCL2, Alphelys, Plaisir, France) puis inclus en paraffine. Des sections coronales de 4 µm d'épaisseur ont été coupées dans la région d'intérêt sur un microtome Leica.

3) Analyse histologique standard

Les prélèvements fixés ont été déshydratés dans des bains d'alcool de concentration croissante puis baignés dans un solvant organique (méthylcyclohexane) avant d'être inclus en paraffine. A partir des blocs de paraffine, des sections de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées avec un microtome Leica. Ces sections ont été ensuite déparaffinées puis réhydratées avant d'être colorées en HPS (Hématoxyline-Phloxine-Safran).

4) Microscopie électronique

Dans 9 cas de TPRP, un fragment tumoral a été fixé dans du TRUMP (fixateur incluant du glutaraldéhyde) puis déshydraté dans des bains d'éthanol de concentration croissante. Le fragment a été ensuite inclus dans de la résine EPOXY. Des sections semifines (1 µm) ont été réalisées avec un microtome puis colorées au bleu de Toluidine. Les régions d'intérêt ont été sélectionnées puis des coupes ultrafines (90 Å) réalisées. Ces sections ont été colorées par de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb puis examinées avec un microscope électronique à transmission Jeol JEM 1400.

5) Analyse par immunofluorescence

Des sections de 10 μm d'épaisseur ont été obtenues sur lames de verre à partir des encéphales de rat enrobés dans le Tissue-Tek. Les lames ont été ensuite séchées à l'air libre en température ambiante puis utilisées pour les techniques d'immunofluorescence ou conservées à -20°C pour un usage ultérieur. Les sections ont été fixées dans un mélange d'acétone/méthanol (volumes équivalents) pendant 90 secondes à -20°C . Une saturation des sites antigéniques non-spécifiques a été réalisée pendant 1 heure avec une solution de PBS ($\text{pH}=7,4$) contenant 0,2% de BSA, 0,2% de Triton X-100 et 10% de sérum normal de chèvre. Les sections ont ensuite été incubées durant la nuit à 4°C en présence des différents anticorps primaires dans une solution de PBS contenant 1% de BSA, 0,3% de Triton et 1% de sérum normal de chèvre. Les anticorps primaires ont été dilués et utilisés à une concentration finale de $0,625 \mu\text{g}/\text{mL}$ pour les claudines 1, 2 et 3. Les anticorps, monoclonal anti-CLDN5 et polyclonal anti-CLDN5, ont été utilisés à des concentrations respectives de $1,25 \mu\text{g}/\text{mL}$ et $0,625 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Dans certains cas, un double-immunomarquage a été réalisé avec un anticorps anti-claudine polyclonal et l'anticorps monoclonal anti-RECA-1, ce dernier étant utilisé avec une concentration finale de $2,5 \mu\text{g}/\text{mL}$. Cinq lavages d'une durée totale de 10 minutes ont été réalisés avec une solution de PBS contenant 1% de BSA et 0,3% de Triton. Les sections ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires suivants (Invitrogen) pendant une heure à une concentration finale de $2 \mu\text{g}/\text{mL}$:

- anticorps de chèvre anti-souris conjugué avec un fluorochrome Alexa Fluor® 488 (vert) (A-10667)
- anticorps de chèvre anti-souris conjugué avec un fluorochrome Alexa Fluor® 555 (rouge) (A-21424)

- anticorps de chèvre anti-lapin conjugué avec un fluorochrome Alexa Fluor® 555 (rouge) (A-21428)

Le DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole) a été utilisé comme colorant fluorescent des noyaux dans une solution de PBS à une concentration de 0,1 µg/mL.

Les sections sont lavées 4 fois dans une solution de PBS contenant 1% de BSA et 0,3% de Triton et rincées une fois avec du PBS. Des contrôles négatifs ont été réalisés en supprimant l'anticorps primaire. Les lames sont montées avec le milieu Fluoroprep (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) et analysées avec un microscope à fluorescence Zeiss équipé d'une caméra digitale utilisant l'interface AxioVs40 V 4.7.2.0. Pour assurer la comparabilité des prélèvements, les images ont été prises avec un temps d'exposition similaire.

6) Analyse immunohistochimique

Les analyses immunohistochimiques ont été réalisées sur un automate BenchMark XT (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ, USA) en utilisant les anticorps primaires aux concentrations mentionnées dans le tableau 8 et un système de révélation basé sur la DAB (3,3'-diaminobenzidine). La contre-coloration des coupes est réalisée avec de l'Hématoxyline.

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants (Tableau 8) :

| Anticorps primaires | Clone | Concentration | Fournisseur |
|----------------------------|------------------|----------------------|--------------------|
| Cytokératine 18 | DC10 | 1 : 50 | Dako |
| Pancytokératine KL1 | KL1 | 1 : 50 | Beckman Coulter |
| Pancytokératine AE1-AE3 | AE1-AE3 | 1 : 100 | Dako |
| Cytokératine 7 | OV-TL 12/30 | 1 : 400 | Dako |
| Cytokératine 20 | KS 20.8 | 1 : 50 | Dako |
| NCAM | 1B6 | 1 : 125 | Novocastra |
| Neurofilaments | 2F11 | 1 : 100 | Dako |
| Synaptophysine | SP11 | Prédilué | Ventana |
| Chromogranine A | DAK-A3 | 1 : 100 | Dako |
| E-cadhérine | 4A2C7 | 1 : 200 | Zymed |
| EMA | E29 | 1 : 10 | Dako |
| GFAP | 6F2 | 1 : 200 | Dako |
| Vimentine | V9 | 1 : 300 | Dako |
| Protéine S100 | Polyclonal lapin | 1 : 800 | Dako |
| Ki-67 | MIB1 | 1 : 50 | Dako |
| EPHX1 (EHm) | Polyclonal lapin | 1 : 1000 | Abcam |
| GST mu1/2 | EPR1936(2) | 1 : 1500 | Abcam |
| GST mu5 | Polyclonal lapin | 1 : 200 | MyBioSource |
| GPx1 | Polyclonal lapin | 1 : 1000 | Abcam |
| GR | Polyclonal lapin | 1 : 1000 | GeneTex |
| Claudine 1 | Jay.8 | Zymed | 1 : 100 |
| Claudine 2 | MH44 | Zymed | 1 : 100 |
| Claudine 3 | Z23.JM | Zymed | 1 : 100 |
| Claudine 5 | 4C3C2 | Zymed | 1 : 100 |
| Claudine 11 | Polyclonal lapin | Acris | 1 : 200 |

Tableau 8. Anticorps primaires utilisés dans les différentes études

7) Western Blot

L'ensemble de cette étude a été réalisé par I.Kratzer. Les plexus choroïdes et les fragments corticaux ont été homogénéisés dans un tampon de lyse (9803 ; Cell Signaling, Boston, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique) contenant 1 mM de Fluorure de phénylméthylsulfonyle (Sigma, Saint Louis, Missouri, Etats-Unis d'Amérique). L'homogénéisation a été réalisée par 10-15 allers-retours dans un homogénéisateur verre-verre de type Potter. Les concentrations ont été déterminées par la méthode de Peterson (1977) en utilisant l'albumine de sérum bovin pour réaliser la courbe standard.

Les protéines ont été séparées sur des gels Bis-Tris Criterion™ XT (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis d'Amérique) dans un tampon MOPS (Bio-Rad) pendant 10 minutes sous une tension de 10 V, puis pendant 2 heures sous une tension de 120 V. Le transfert est réalisé sur une membrane de nitrocellulose Whatman Protran (NBA085C, Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, Etats-Unis d'Amérique) dans un tampon Tris-glycine (Euromedex, Souffelweyersheim, France) contenant 20% de méthanol pendant 50 minutes. L'efficacité du transfert est vérifiée par une coloration de Rouge-Ponceau. La membrane a été coupée longitudinalement pour séparer l'actine des claudines dont le poids moléculaire est plus bas. Les membranes ont été ensuite immergées dans une solution de saturation (5% de lait écrémé, 0,1% de Tween 20 dans une solution de TBS Tris-buffered saline) à température ambiante pendant 1 heure. Les anticorps primaires anti-claudines ont été dilués dans la solution de saturation avec une concentration de 1 µg/mL. L'anticorps polyclonal de lapin anti-actine a été utilisé à une concentration finale de 0,533 ou 0,267 µg/mL selon la quantité de protéines déposées. Les membranes ont été incubées durant la nuit à 4°C puis lavées 3 fois pendant 10 minutes à température

ambiante dans une solution de TBS contenant 0,1% de Tween-20 (TBST). Les anticorps secondaires conjugués à la peroxydase de raifort étaient les suivants (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, Maryland, Etats-Unis d'Amérique) :

- anticorps de chèvre anti-lapin (111-035-045) (concentration finale = 0,04 µg/mL)
- anticorps de chèvre anti-souris (115-036-003) (concentration finale= 0,08 µg/mL)

Après 2 lavages dans une solution de TBST et un dernier lavage dans une solution de TBS, des substrats chimioluminescents de la peroxydase du raifort ont été utilisés (Immobilon Western, Millipore, Molsheim, France pour les claudines et Pierce ECL, Perbio Science, Brebières, France pour l'actine). Les membranes ont finalement été exposées à des films autoradiographiques (Biomax, Kodak, Rochester, Etat de New York, Etats-Unis d'Amérique).

8) RT-PCR quantitative

L'ensemble de cette étude a été réalisé par I.Kratzer. L'ARN total a été isolé à partir de 4 lots de plexus choroïdes des ventricules latéraux, de plexus choroïdes du 4^{ème} ventricule et de fragments corticaux provenant de rats à E19, P2, P9 et adultes. L'extraction a été réalisée à l'aide du Micro kit RNeasy® (Qiagen, Valencia, Californie, Etats-Unis d'Amérique) incluant un traitement par désoxyribonucléase. Pour comparaison, l'ARN de 2 lots de microvaisseaux isolés d'un rat P9 et adulte a été extrait. L'ARN total a été quantifié par un spectrophotomètre NanoDrop 2000c (ThermoScientific, Baltimore, Maryland, Etats-Unis d'Amérique) et sa qualité évaluée sur un Bioanalyser Agilent 2100

(Agilent Technologies, Palo Alto, Californie, Etats-Unis d'Amérique). 1 µg d'ARN a été prélevé pour analyse. Il est associé à 25 pg d'ARN bactérien AraB provenant d'E.Coli, utilisé comme standard externe (GE Healthcare Bio-Sciences, Fribourg, Allemagne). Ce contrôle externe bactérien a été choisi car les gènes de ménage traditionnellement utilisés dans les analyses de RT-PCR (GAPD, HPRT1) sont variables suivant les tissus et les stades de développement. La phase de transcription inverse de l'ARN en ADN codant (ADNc) est effectuée grâce au Supermix iScript (Bio-Rad, Hercules, Californie, Etats-Unis d'Amérique). La RT-PCR quantitative a été réalisée sur un LightCycler® 1,5 (Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne). Toutes les amorces ont été construites en utilisant Primer-BLAST (NCBI) et sélectionnées afin de générer des amplicons d'une longueur de 100 à 200 pb.

La variabilité potentielle liée aux différences d'efficacité de la transcription inverse entre les différents échantillons était corrigée par normalisation des données à l'expression de l'AraB. Pour tenter d'établir un classement approximatif de l'expression génique des claudines parmi les différents échantillons, le niveau d'expression de tous les gènes étudiés a été déterminé dans un échantillon arbitrairement choisi (plexus choroïdes des ventricules latéraux chez un rat P2 (n°3)) en tenant compte de l'efficacité d'amplification de chaque gène. Les valeurs obtenues sont ensuite exprimées comme un pourcentage de la valeur pour la claudine 1 après correction pour la variation de la taille de l'amplicon. Pour chaque gène cible, les niveaux d'expression de chaque échantillon ont été finalement exprimés relativement à la valeur de l'échantillon de référence.

La significativité des différences d'expression génique entre les tissus et entre les stades de développement a été évalué pour chaque gène par un test ANOVA unidirectionnel suivi d'un test de comparaison multiple de Turkey. La significativité de la différence d'expression génique entre les plexus choroïdes des ventricules latéraux et du 4^{ème}

ventricule pour un stade de développement a été évalué par un test t de Student apparié et bilatéral.

Résultats Etude 1

ETUDE 1 : Analyse de l'expression des claudines au niveau de la barrière sang-LCR au cours du développement chez le rat et chez l'homme

Introduction :

Longtemps considérée comme une structure lâche et perméable chez le fœtus, la barrière sang-LCR (plexus choroïdes) présente des jonctions serrées très tôt dans le développement. La structure moléculaire et la dynamique de ces jonctions au cours du développement ne sont cependant pas clairement déterminées chez le modèle murin et sont largement inconnues chez l'homme.

Questions :

Quel est le degré d'immaturation de l'interface sang-LCR (plexus choroïdes) chez le rat et chez l'homme au cours du développement ?

Existe-il un système de jonctions serrées précocement mis en place au cours du développement chez le rat et chez l'homme ?

La composition moléculaire des jonctions serrées au niveau de l'interface sang-LCR est-elle statique ou au contraire dynamique ?

Objectifs :

- 1) Définir la composition de l'interface sang-LCR (plexus choroïdes) en claudines (protéines de jonctions serrées) chez le rat au cours du développement.
- 2) Définir la composition de l'interface sang-LCR (plexus choroïdes) en claudines (protéines de jonctions serrées) chez l'homme au cours du développement.

Article correspondant :

Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier.

Kratzer I, **Vasiljevic A**, Rey C, Fevre-Montange M, Saunders N, Strazielle N, Gherzi-Egea JF (2012) Histochemistry and cell biology 138:861-879.

Résultats ETUDE I

1) Introduction

L'objet de cette étude était de caractériser la composition moléculaire des jonctions serrées au niveau des interfaces sang-cerveau au cours du développement en se concentrant particulièrement sur la barrière sang-LCR.

Une première étape de cette étude, réalisée par I.Kratzer, a été de déterminer par RT-PCR quantitative le niveau d'expression de différentes claudines (CLDN) dans les plexus choroïdes de rat (ventricules latéraux (VL) et 4^{ème} ventricule (V4)) à plusieurs stades de développement : E19, P2, P9 et adulte (Fig.20).

CLDN1, CLDN2 et CLDN3 étaient les claudines les plus exprimées au sein des plexus choroïdes. Comparées au cortex et aux capillaires, les taux d'expression de ces gènes étaient de 10 à 100 fois plus élevés dans les plexus choroïdes.

CLDN1 était exprimée dans les plexus choroïdes des VL et du V4 à tous les stades analysés. L'expression génique était globalement plus forte aux stades E19 et P2 qu'aux stades plus tardifs, P9 et adulte (Fig.20). Il n'y avait pas de différence significative entre les VL et le V4. Le niveau d'expression génique de CLDN2 augmentait significativement dans les plexus choroïdes du V4 au cours du développement, du stade E19 au stade adulte. Cette augmentation était moins nette pour les plexus choroïdes des VL où l'expression augmentait significativement entre E19 et P2, mais pas entre P2 et le stade adulte. Le profil d'expression de CLDN3 était superposable à celui observé pour CLDN1 avec une diminution plus prononcée du niveau d'expression entre le stade P2 et le stade adulte.

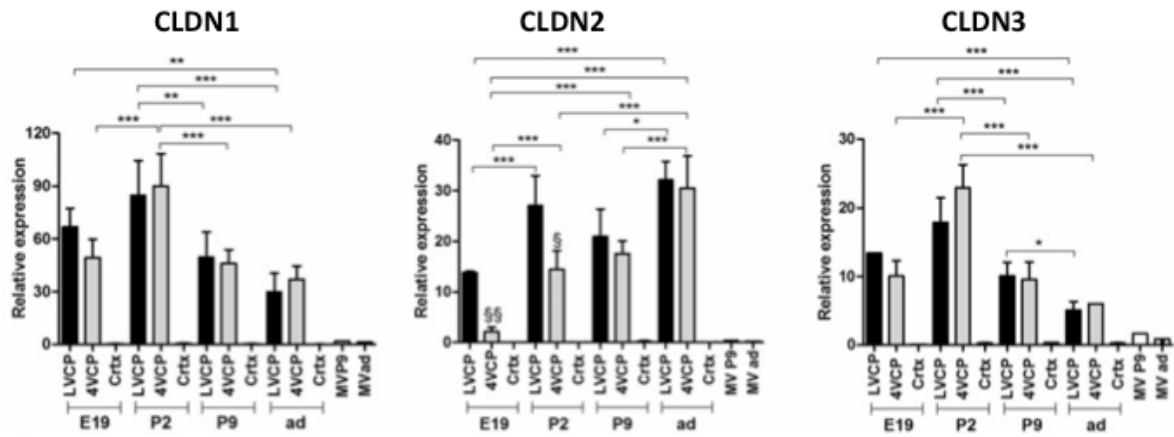


Figure 20. Profil d'expression génique de CLDN1, CLDN2 et CLDN3 au cours du développement dans les plexus choroïdes de rat.

Analyse du profil développemental de l'expression des gènes de différentes claudines (CLDN) au niveau des plexus choroïdes, du cortex cérébral et des microvaisseaux cérébraux chez le rat à 4 stades de développement (E19, P2, P9, adulte).

Les claudines présentant les niveaux d'expression les plus élevés tout au long du développement sont les claudines 1, 2 et 3.

Abréviations : LVCP : plexus choroïdes des ventricules latéraux ; 4VCP : plexus choroïdes du 4^{ème} ventricule ; Crtx : cortex ; MV : microvaisseaux cérébraux isolés.

Significativité statistique :

*, **, *** correspondent à $p < 0,05$; $0,01$; $0,001$ respectivement

§, §§ correspondent à $p < 0,05$; $0,01$ respectivement

CLDN 6 et 11 sont exprimées de manière significative mais à des taux moindres comparés à CLDN1, CLDN2 et CLDN3 (Fig.21). CLDN5 est spécifiquement enrichie dans les préparations de microvaisseaux. CLDN6 est exprimée principalement dans les stades de développement périnataux.

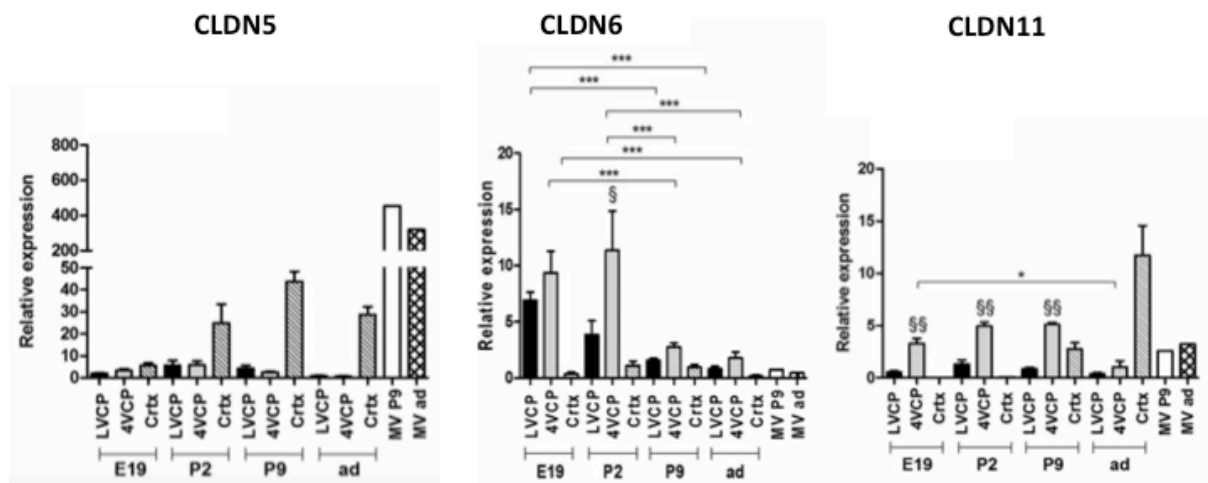


Figure 21. Profil d'expression génique de CLDN5, CLDN6 et CLDN11 au cours du développement dans les plexus choroïdes de rat.

Analyse du profil développemental de l'expression des gènes de différentes claudines (CLDN) au niveau des plexus choroïdes, du cortex cérébral et des microvaisseaux cérébraux chez le rat à 4 stades de développement (E19, P2, P9, adulte).

CLDN6 et CLDN11 sont exprimées de manière significative mais à des taux moindres comparés à CLDN1, CLDN2 et CLDN3. CLDN5 est spécifiquement enrichie dans les microvaisseaux.

Abréviations : LVCP : plexus choroïdes des ventricules latéraux ; 4VCP : plexus choroïdes du 4^{ème} ventricule ; Crtx : cortex ; MV : microvaisseaux cérébraux isolés.

Significativité statistique :

*, **, *** correspondent à $p < 0,05$; $0,01$; $0,001$ respectivement

§, §§ correspondent à $p < 0,05$; $0,01$ respectivement

Compte-tenu de ces résultats, nous avons décidé de concentrer notre analyse par immunohistochimie et immunofluorescence sur le profil développemental de CLDN1, CLDN2, CLDN3 et CLDN5.

2) Analyse morphologique des plexus choroïdes fœtaux humains en coloration standard HES

Après coloration standard HPS, la morphologie des plexus choroïdes fœtaux différait entre les ventricules latéraux et le 4^{ème} ventricule. Les plexus choroïdes des ventricules latéraux se caractérisaient par un axe lâche et d'aspect œdémateux, recouvert d'une rangée de cellules épithéliales, cuboïdes ou cylindriques, au cytoplasme clarifié à contours nets (Fig.22A et B). Dans le 4^{ème} ventricule, les plexus choroïdes étaient caractérisés par un axe plus fin recouvert de cellules cuboïdes ou cylindriques au cytoplasme éosinophile (Fig.22C et D).

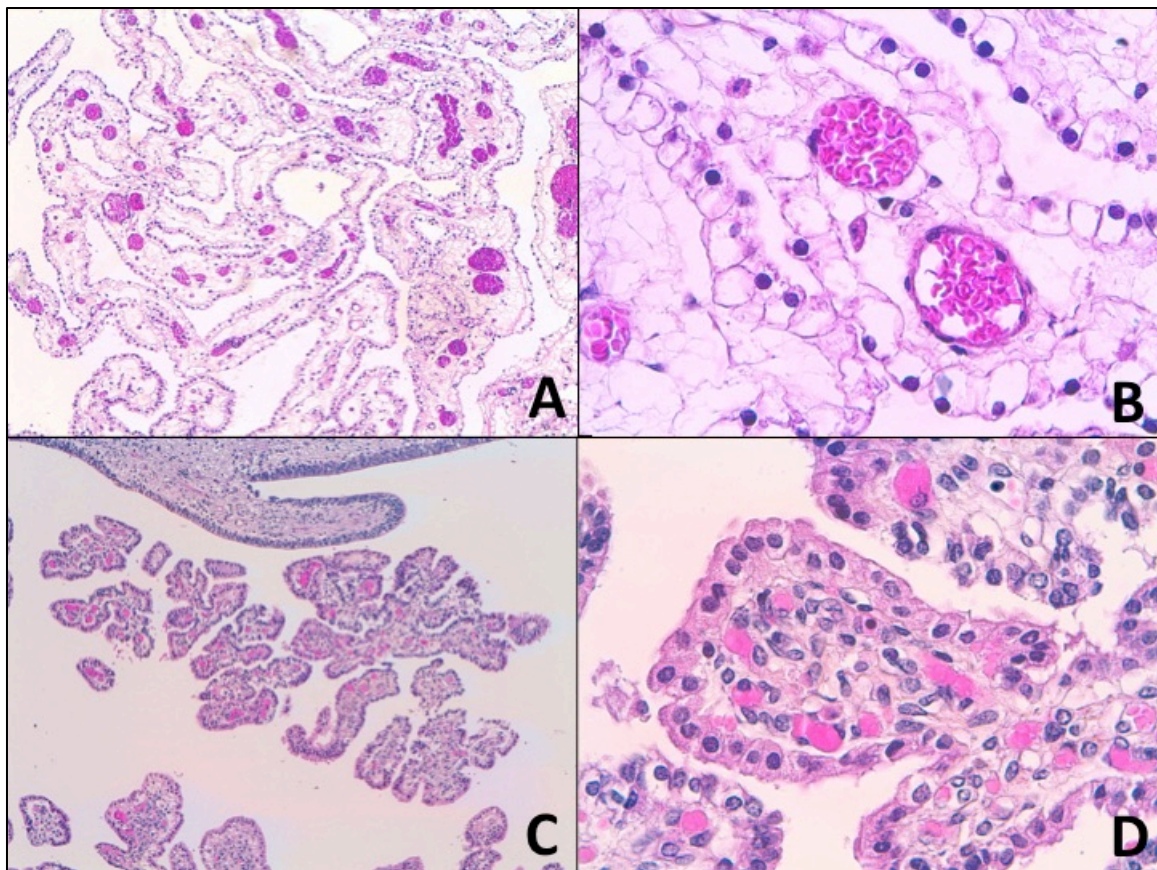


Figure 22. Aspect histologique des plexus choroïdes chez le fœtus humain (coloration HPS).

3) Expression des claudines 1, 2 et 3 dans les plexus choroïdes au cours du développement chez le rat et chez l'homme

a) CLAUDINE 1 (CLDN1)

Chez le rat :

L'expression protéique de CLDN1 était confirmée dans les plexus choroïdes par Western Blot à tous les stades analysés, sans variation durant le développement (Fig.23A). En immunohistochimie, CLDN1 était identifiée au niveau des jonctions intercellulaires des cellules épithéliales des plexus choroïdes (Fig.23B-D). L'expression ne différait pas entre les VL et le V4 ni au cours du développement. Il n'y avait pas d'expression au niveau des capillaires cérébraux et des capillaires choroïdiens (en vert dans la Fig.23).

Chez l'homme :

Une expression intercellulaire de CLDN1 à la jonction apico-latérale était observée au niveau de l'épithélium choroïdien des ventricules latéraux et du 4^{ème} ventricule dès 10 SA (Fig.24). Cette expression était maintenue au cours des différents stades de développement explorés avec une intensité constante.

Il n'y avait pas d'expression de CLDN1 au niveau du neuro-épendyme adjacent ainsi qu'au niveau des capillaires cérébraux ou des capillaires choroïdiens.

Les résultats immunohistochimiques sont résumés dans le tableau 9 page 108.

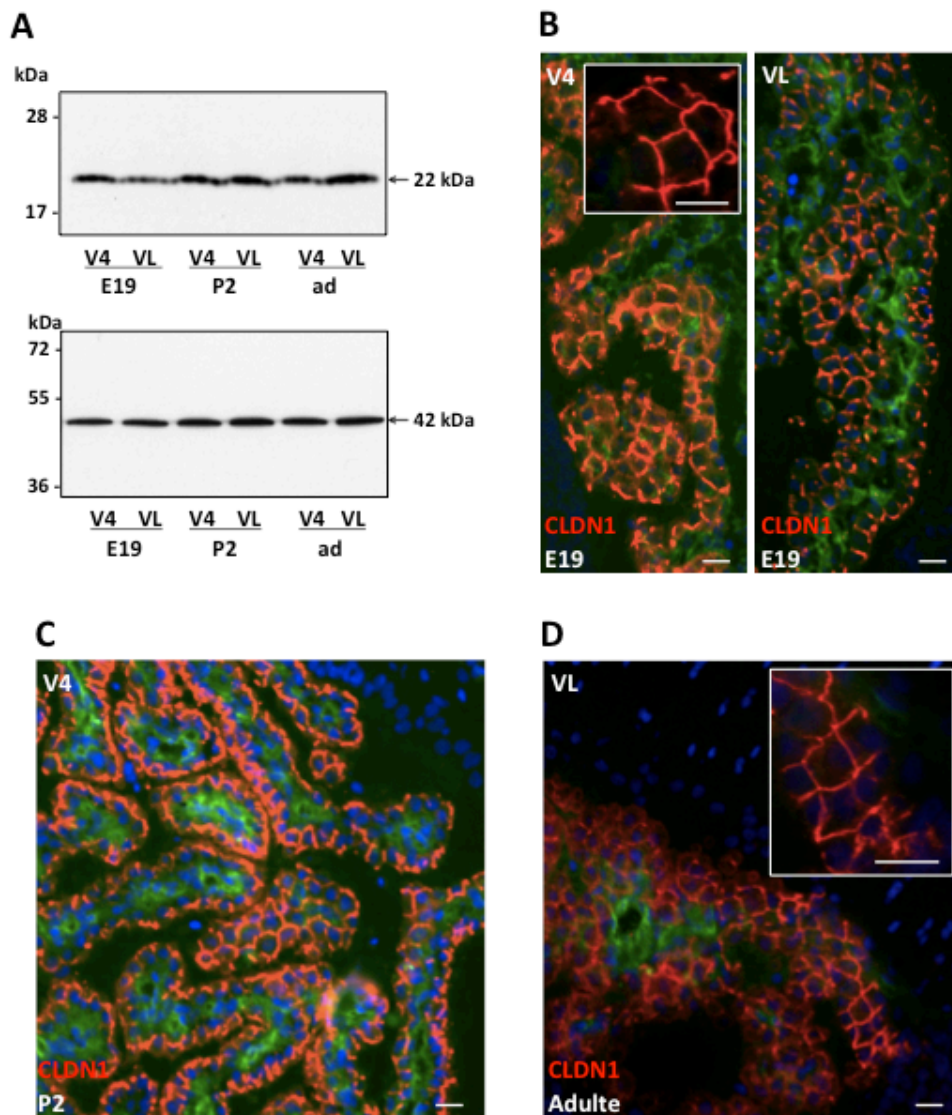


Figure 23. Analyse en Western Blot et distribution cellulaire de CLDN1 dans le plexus choroïde de rat au cours du développement.

A- Western Blot représentatif de plexus choroïdes disséqués de rat (ventricule latéral (VL) et 4^{ème} ventricule (V4)) au cours du développement à E19, P2 et chez l'adulte (2 μ g par colonne). L'expression de la protéine CLDN1 est stable durant le développement dans les deux types de plexus choroïdes (panel supérieur, bande de 22 kDa). L'actine, utilisée comme témoin de charge, est illustrée dans le panel inférieur (bande de 42 kDa).

A à D- Immunexpression de CLDN1 (en rouge) dans les plexus choroïdes de rat au cours du développement et chez l'adulte. Un signal de forte intensité est associé aux membranes des cellules épithéliales choroïdiennes dans les VL (B, image de droite) et le V4 (B, image de gauche) d'animaux E19. Un signal comparable est identifié aux stades de développement plus tardifs (C, V4 animal à P2 ; D, VL rat adulte). Les encarts en B et D soulignent la distribution caractéristique en « rayons de miel » des jonctions des cellules épithéliales choroïdiennes. Un double-immunomarquage avec l'anticorps anti-RECA-1 (en vert) permet l'identification des vaisseaux. Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux. Echelles : 20 μ m. E19 : embryon de 19 jours. P2 : nouveau-né de 2 jours.

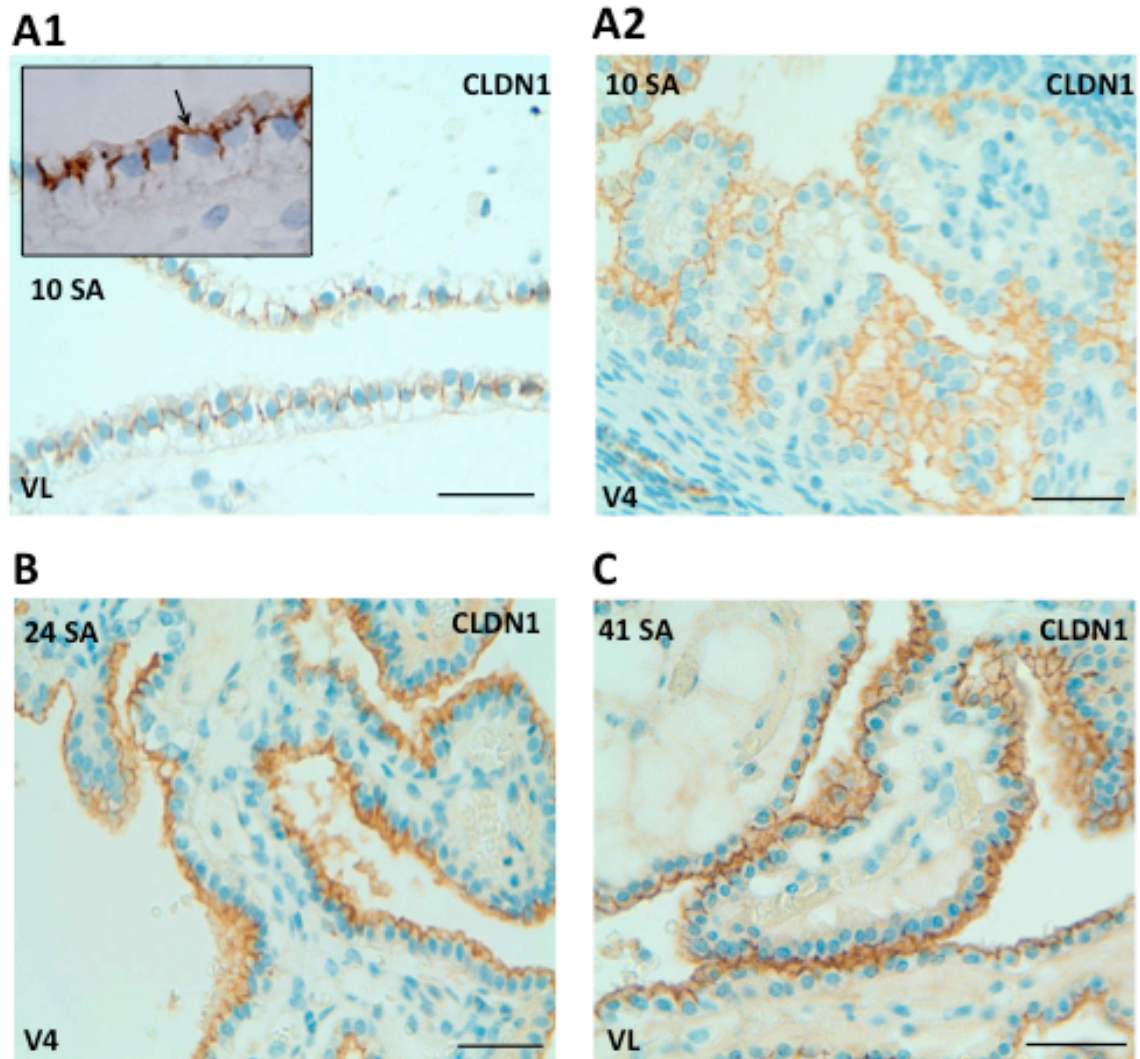


Figure 24. Expression immunohistochimique de CLDN1 dans les plexus choroïdes humains au cours du développement.

A- Encéphale fœtal humain à 10 SA. L'expression de CLDN1 est observée dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux (VL, A1) et du 4^{ème} ventricule (V4, A2). Cette expression est continue et localisée au pôle apical des cellules épithéliales au niveau des jonctions intercellulaires (flèche dans l'encart avec fort grossissement en A1).

B- Encéphale fœtal humain à 24 SA. CLDN1 est exprimée au niveau de toutes les jonctions épithéliales (voir exemple du V4).

C- Encéphale fœtal humain à 41 SA. Un immunomarquage distinct et continu de l'épithélium choroïdien est observé pour la claudine 1. Barre d'échelle : 50 μm.

b) CLAUDINE 2 (CLDN2)

Chez le rat :

L'augmentation de CLDN2 observée en RT-PCR était retrouvée en Western Blot où l'intensité de la bande augmentait entre E19 et le stade adulte au niveau des plexus choroïdes des VL (Fig.25A). Dans les plexus choroïdes du V4, CLDN2 était nettement identifiable à partir du stade P2 puis augmentait en intensité au stade adulte. En immunohistochimie, l'expression de CLDN2 était identifiée au niveau de toutes les jonctions intercellulaires des cellules épithéliales choroïdiennes dans les plexus choroïdes du VL (Fig25.B-E). Dans les plexus choroïdes du V4, l'expression était focale et discontinue (Fig25.B). Cette différence s'atténuait au stade P2 puis disparaissait au stade P9. Il n'y avait pas d'expression au niveau des capillaires cérébraux et des capillaires choroïdiens (Fig.25D et E).

Chez l'homme :

A 10 et 12 SA, une expression intercellulaire apico-latérale d'intensité faible de la CLDN2 était identifiée avec une distribution discontinue le long de l'épithélium choroïdien dans le V4 et le VL (Fig26.A). Aux stades de développement ultérieurs, le marquage devenait continu et plus intense (Fig26.B et C).

Il n'y avait pas d'expression de CLDN2 au niveau du neuro-épendyme adjacent ainsi qu'au niveau des capillaires cérébraux ou des capillaires choroïdiens.

Les résultats immunohistochimiques sont résumés dans le Tableau 9 page 108.

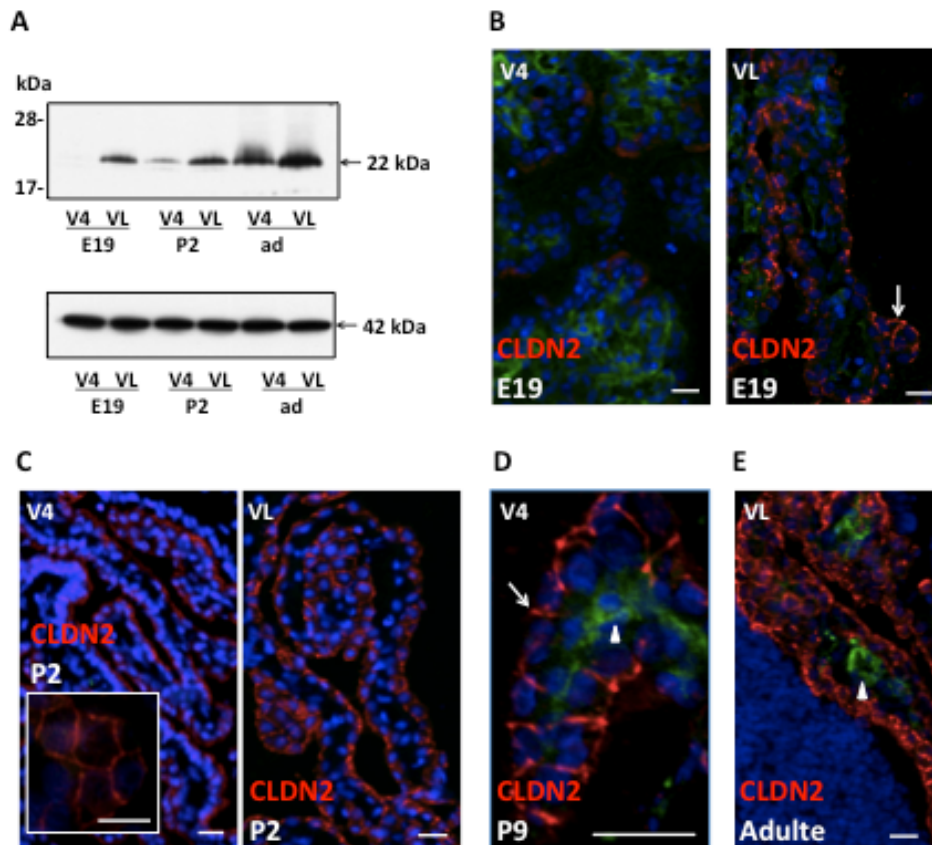


Figure 25. Expression différentielle de la CLDN2 dans les plexus choroïdes durant le développement cérébral chez le rat.

A- Western Blot représentatif de plexus choroïdes disséqués de rat (ventricule latéral (VL) et 4^{ème} ventricule (V4)) au cours du développement à E19, P2 et chez l'adulte (10 µg par colonne). L'expression de la protéine CLDN2 dans les plexus choroïdes augmente au cours du développement. Elle est significativement plus élevée dans les VL par rapport au V4 chez les animaux à E19 et P2 (panel supérieur, bande de 22 kDa). L'actine, utilisée comme témoin de charge, est illustrée dans le panel inférieur (bande de 42 kDa).

A à E- Immunofluorescence de CLDN2 (en rouge) dans l'encéphale de rat au cours du développement et chez l'adulte. Il existe une expression continue de CLDN2 au niveau de l'épithélium choroïdien des VL chez les animaux à E19 (flèche). L'immunopositivité dans le V4 est par contre faible et focale et de larges portions de l'épithélium restent négatives (B). Chez les animaux à P2 (C), l'immunopositivité est plus homogène dans le V4 et devient continue (encart), de manière similaire aux VL (image de droite). L'expression de CLDN2 est forte dans les deux types de plexus choroïdes à P9 (D, flèche) et chez le rat adulte (E).

Un double-immunomarquage avec l'anticorps anti-RECA-1 (B, D, E, en vert) permet l'identification des vaisseaux. Ces derniers ne sont pas marqués par l'anticorps anti-CLDN2 (D, E, têtes de flèche). Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux. Echelles : 20 µm.

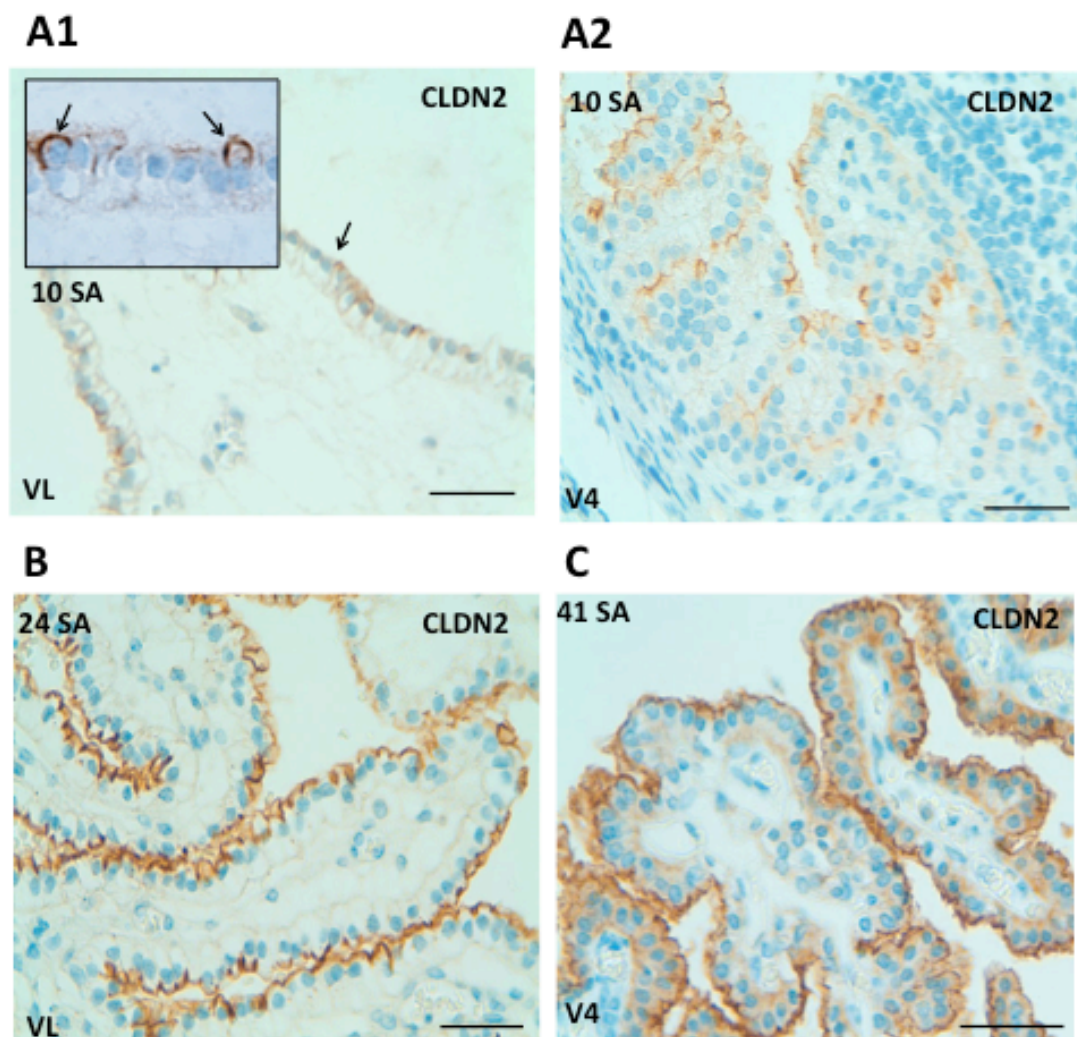


Figure 26. Expression immunohistochimique de CLDN2 dans les plexus choroïdes humains au cours du développement.

A- Encéphale fœtal humain à 10 SA. L'expression de CLDN2 est observée dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux (VL, A1) et du 4^{ème} ventricule (V4, A2). L'immunopositivité anti-CLDN2 présente une localisation apico-latérale mais sa distribution est focale et discontinue dans les VL et le V4. Au fort grossissement (voir encart pour le VL), le caractère discontinu est mieux identifié (flèches).

B- Encéphale fœtal humain à 24 SA. A ce stade de développement, l'immunomarquage apico-latéral pour CLDN2 est continu (voir exemple du VL).

C- Encéphale fœtal humain à 41 SA. Un immunomarquage distinct et continu de l'épithélium choroïdien est observé pour CLDN2. Barre d'échelle : 50 μm.

c) CLAUDINE 3 (CLDN3)

Chez le rat :

En Western Blot, CLDN3 était exprimée dans les plexus choroïdes à tous les stades analysés (Fig.27A). Il existait une diminution significative du niveau de protéines à l'âge adulte.

En immunohistochimie, CLDN3 était identifiée au niveau des jonctions intercellulaires des cellules épithéliales des plexus choroïdes des ventricules latéraux et du 4^{ème} ventricule (Fig.27B, C, E et G). L'expression chez le rat adulte était moins intense que celle observée au cours du développement. Il n'y avait pas d'expression au niveau des capillaires choroïdiens (Fig.27B et G) mais une expression, d'intensité plus faible que dans les cellules épithéliales choroïdiennes, était détectée au niveau des capillaires cérébraux (Fig.27D).

Chez l'homme :

Une expression intercellulaire apico-latérale, continue mais d'intensité faible, de CLDN3 était identifiée au niveau des épithéliums choroïdiens des ventricules latéraux et du 4^{ème} ventricule (Fig.28). L'intensité et le caractère continu de l'immunomarquage étaient constant à tous les stades de développement.

Il n'y avait pas d'expression de CLDN3 au niveau du neuro-épendyme adjacent ainsi qu'au niveau des capillaires cérébraux ou des capillaires choroïdiens.

Les résultats immunohistochimiques sont résumés dans le Tableau 9 page 108.

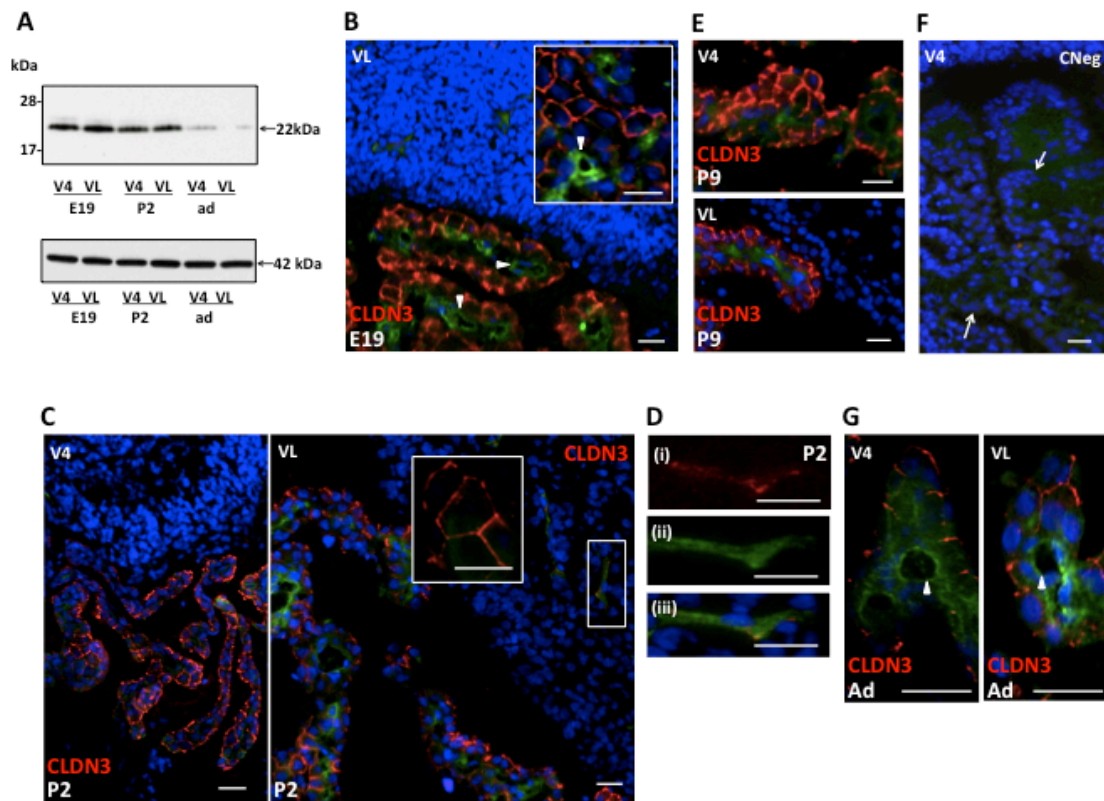


Figure 27. Western blot et distribution cellulaire de CLDN3 dans les plexus choroïdes et le parenchyme cérébral du rat au cours du développement.

A- Western Blot représentatif de plexus choroïdes disséqués de rat (ventricule latéral (VL) et 4^{ème} ventricule (V4)) au cours du développement à E19, P2 et chez l'adulte (10 µg par colonne). L'expression de la protéine CLDN3 diminue dans les deux types de plexus choroïdes au cours du développement (panel supérieur, bande de 22 kDa). L'actine, utilisée comme témoin de charge, est illustrée dans le panel inférieur (bande de 42 kDa).

A à G- Immunopositive de CLDN3 (en rouge) dans l'encéphale de rat au cours du développement et chez l'adulte. Un double-immunomarquage avec l'anticorps anti-RECA-1 (en vert) permet l'identification des vaisseaux choroïdiens (B, G, têtes de flèche) et dans le parenchyme cérébral (D). Le DAPI est utilisé pour marquer les noyaux. Durant la période périnatale, CLDN3 est exprimée au niveau des membranes des cellules de l'épithélium choroïdien (B, exemple dans le VL à E19 ; C, exemple dans le VL à P2). Les encarts en B et C soulignent la distribution caractéristique en « rayons de miel » des jonctions des cellules épithéliales choroïdiennes. La surface délimitée par le rectangle en C est représentée à plus fort grossissement en D. A ce niveau, un vaisseau du parenchyme cérébral exprime CLDN3 (i : CLDN3 (rouge) ; ii : RECA-1 (vert) ; iii : fusion). L'immunopositive pour CLDN3 est observée au niveau des jonctions épithéliales dans les plexus choroïdes de rat à P9 (E) et chez l'adulte (G). F : contrôle négatif (CNeg) sans anticorps primaire chez un animal à P9 (flèche : plexus choroïdes). Echelles : 20 µm.

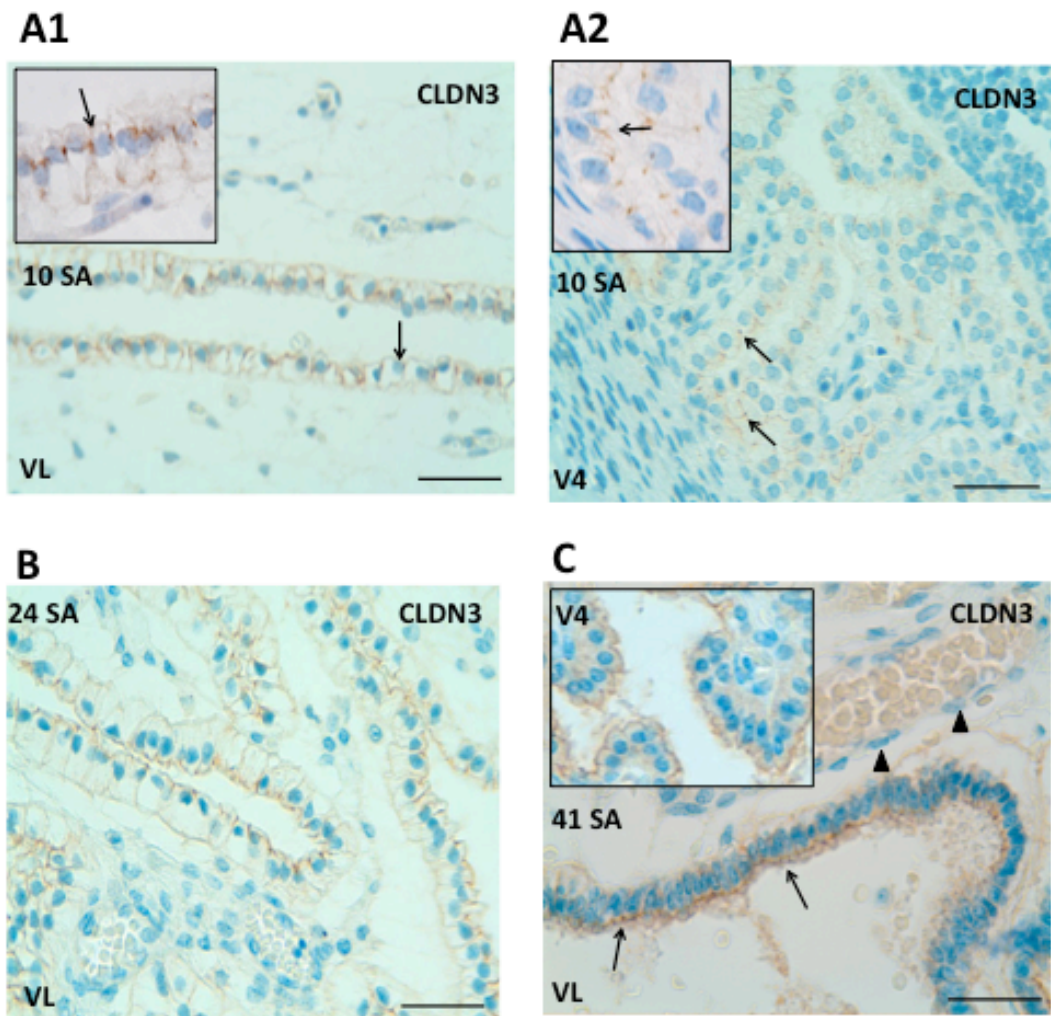


Figure 28. Expression immunohistochimique de CLDN3 dans les plexus choroïdes humains au cours du développement.

A- Encéphale fœtal humain à 10 SA. CLDN3 était aussi identifiée au niveau de l'épithélium choroïdien dans les deux sortes de plexus choroïdes (ventricule latéral ou VL (A1) et 4^{ème} ventricule ou V4 (A2)). L'encart illustre le caractère continu du marquage à la jonction apico-latérale des cellules (flèches).

B- Encéphale fœtal humain à 24 SA. L'expression de CLDN3 était de faible intensité mais continu dans les plexus choroïdes des VL.

C- Encéphale fœtal humain à 41 SA. Un immunomarquage distinct et continu de l'épithélium choroïdien est observé pour CLDN3. L'immunopositivité de CLDN3 n'est observée qu'au niveau de l'épithélium (flèches) mais pas dans les vaisseaux du stroma (têtes de flèche). Barre d'échelle : 50 μ m.

4) Expression d'autres claudines d'intérêt (CLDN5 et CLDN11) dans les plexus choroïdes au cours du développement chez le rat et chez l'homme

a) CLAUDINE 5 (CLDN5)

Chez le rat :

Comme attendu, CLDN5 était exprimée fortement dans les microvaisseaux du parenchyme cérébral (Fig.29). Une expression de CLDN5 était également identifiée dans les vaisseaux pénétrants des plexus choroïdes (Fig.29B et D). Une faible expression était observée dans quelques boucles vasculaires terminales au niveau des papilles choroïdiennes. Il n'y avait pas d'expression dans les cellules épithéliales choroïdiennes (Fig.29D).

Chez l'homme :

A tous les stades de développement étudiés, CLDN5 était exprimée dans les capillaires du parenchyme cérébral (Fig.30C). Contrairement à ce qui a été observé chez le rat et malgré l'utilisation du même anticorps monoclonal, une expression jonctionnelle apico-latérale et en « rayons de miel » de CLDN5 était observée au niveau des plexus choroïdes des ventricules latéraux (Fig.30A) et du 4^{ème} ventricule (Fig.30B et D). L'expression était continue et d'intensité comparable à tous les stades de développement. Les vaisseaux choroïdiens apparaissaient positifs, même les capillaires les plus distaux. Il n'y avait pas d'expression au niveau de la couche épendymaire.

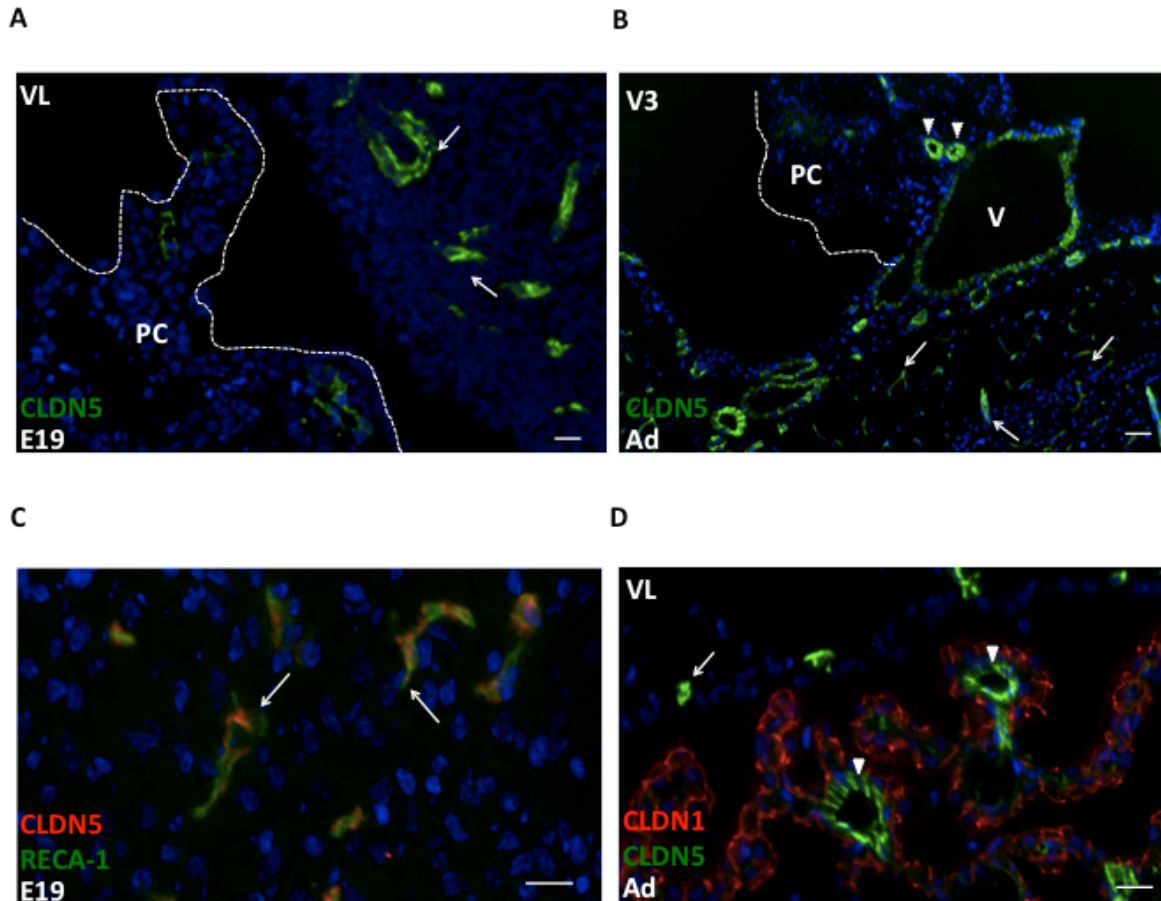


Figure 29. CLDN5 est exprimée dans les cellules endothéliales de l'encéphale en développement.

A à D : Immunopression de CLDN5 dans l'encéphale adulte et en développement. Les microvaisseaux cérébraux sont marqués (en vert) à E19 (A, flèches) ou chez les animaux adultes (B, D, flèches). Dans la figure C, l'anticorps polyclonal anti-CLDN5 a été utilisé pour montrer la colocalisation de la protéine de jonction serrée (en rouge) avec le marqueur endothélial RECA-1 (en vert) chez un animal P2. Dans toutes les sections de plexus choroïdes (PC), l'immunomarquage anti-CLDN5 a montré un signal positif au niveau des vaisseaux de grand calibre pénétrant dans le stroma choroïdien (B, D, têtes de flèches), mais pas au niveau de l'épithélium choroïdien, marqué en rouge par un anticorps anti-CLDN1 (D). A noter que les vaisseaux des citernes comme la veine de Galien sont aussi marqués par l'anticorps anti-CLDN5. Les noyaux des cellules ont été colorés par le DAPI.

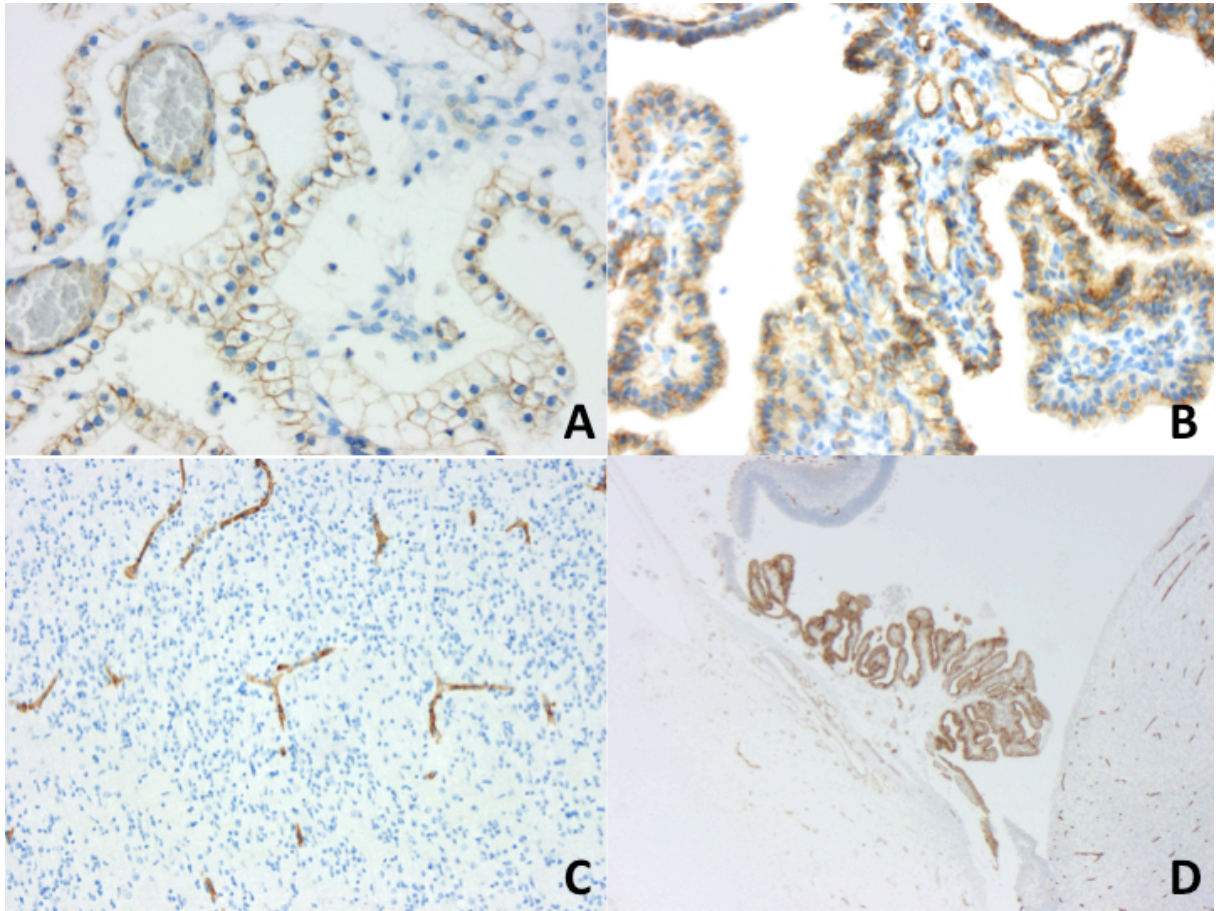


Figure 30. Expression immunohistochimique de CLDN5 dans les plexus choroïdes humains au cours du développement.

A- Encéphale foetal humain à 22 SA. CLDN5 est exprimée dans les vaisseaux choroïdiens et sans les cellules épithéliales choroïdiennes des plexus du ventricule latéral (grandissement x 200).

B- Encéphale foetal humain à 22 SA. CLDN5 est exprimée dans les vaisseaux choroïdiens et dans les cellules épithéliales choroïdiennes des plexus du 4^{ème} ventricule (V4) (grandissement x 200).

C- Encéphale foetal humain à 22 SA. CLDN5 est exprimée dans les capillaires du parenchyme cérébral (grandissement x 100).

D- Encéphale foetal humain à 12 SA. CLDN5 est exprimée dans les capillaires du parenchyme cérébral dans les plexus choroïdes du V4. Il n'y a pas d'expression au niveau du neuro-épendyme (grandissement x 100).

b) CLAUDINE 11 (CLDN11)

Seule une analyse immunohistochimique chez le fœtus humain à 22 SA a été réalisée. La seule immunopositivité identifiée à ce stade était dans les cellules stromales des plexus choroïdes (Fig.31). Il n'y avait pas d'expression dans les cellules choroïdiennes, les vaisseaux, le neuro-épendyme ou la zone intermédiaire (future substance blanche).

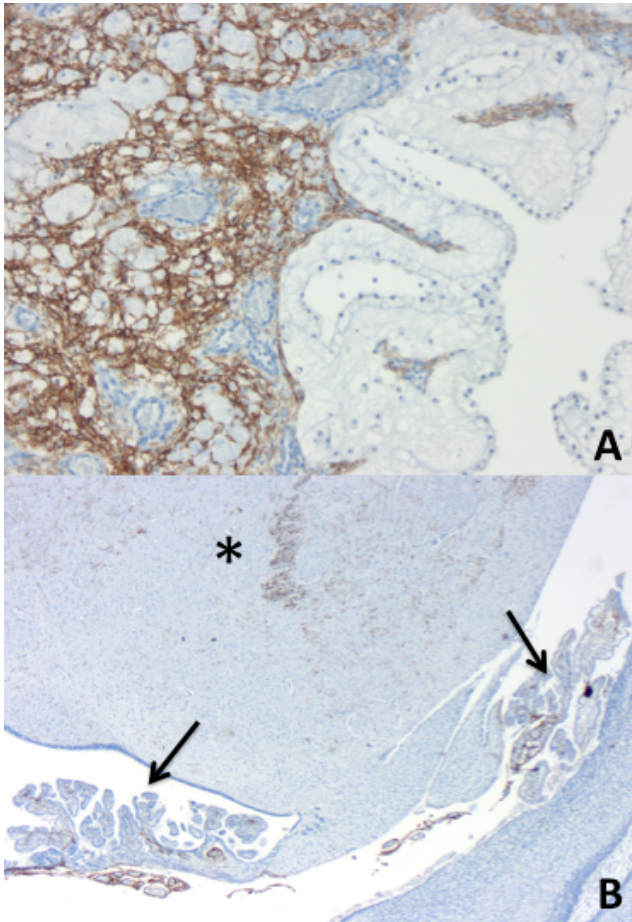


Figure 31. Immunoeexpression de CLDN11 dans le cerveau fœtal humain

A- Absence d'expression de CLDN11 dans l'épithélium du plexus choroïde du ventricule latéral. Le stroma est fortement positif (grossissement x 100).

B- Absence d'expression de CLDN11 dans l'épithélium des plexus du 4^{ème} ventricule (flèches). Le stroma est positif. Une positivité dans des faisceaux en voie de myélinisation est visible (*).

| Cas | SA | CLDN1 | | CLDN2 | | CLDN3 | |
|-----------------|------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | PC-VL | PC-V4 | PC-VL | PC-V4 | PC-VL | PC-V4 |
| 1 11EH04261 | 10 | +++ CA | +++ CA | ++ DA | ++ DA | +++ CA | + CA |
| 2 10EH07007 | 12 | +++ CA | +++ CA | ++ DA | ++ DA | + CA | + CA |
| 3 11EH08064 | 12 | +++ CA | +++ CA | ++ DA | ++ DA | ++ CA | ++ CA |
| 4 10EH11076 | 18 | ++ CA | +++ CA | ++ CA | +++ CA | + CA | + CA |
| 5 11EH08230 | 20 | +++ CA | +++ CA | +++ CA | +++ CA | + CA | + CA |
| 6 11EH08552 | 22 | +++ CA | +++ CA | +++ CA | ++ CA | +/- CA | +/- CA |
| 7 10EH09668 | 22-23 | +++ CA | ++ CA | +++ CA | +++ CA | + CA | + CA |
| 8 11EH00948 | 23 | +++ CA | ++ CA | +++ CA | +++ CA | +/- CA | +/- CA |
| 9 11EH00317 | 24 | +++ CA | +++ CA | +++ CA | +++ CA | ++ CA | ++ CA |
| 10 10EH09104 | 30-31 | ++ CA | ++ CA | +++ CA | +++ CA | 0 | 0 |
| 11 11EH06847 | 40 | +++ CA | +++ CA | +++ CA | +++ CA | + CA | +/- DA |
| 12 11EH09269 | 41 | +++ CA | +++ CA | +++ CA | +++ CA | + CA | + CA |
| 13 11EH03697 | 2 mois et 17 jours (post-natal) | +++ CA | ++ CA | +++ CA | +++ CA | + CA | + CA |

Tableau 9. Expression immunohistochimique de CLDN1, CLDN2 et CLDN3 dans les plexus choroïdes fœtaux au cours du développement.

Légende :

C : marquage continu

D : marquage discontinu

A : marquage apico-latérale

Marquage d'intensité faible (+), modérée (++) ou forte (+++)

PC : plexus choroïdes (épithélium choroïdien)

VL : ventricule latéral

V4 : 4^{ème} ventricule

SA : semaines d'aménorrhée

5) DISCUSSION

Plusieurs études ont permis de déterminer la composition moléculaire en claudines (CLDN) des plexus choroïdes chez le modèle murin à l'âge adulte (Lippoldt A et al, 2000; Wolburg H et al, 2001). D'après ces études, l'épithélium choroïdien exprime CLDN1, CLDN2 et CLDN11.

La composition moléculaire en claudines des plexus choroïdes chez l'homme n'est pas complètement déterminée. Les données au cours du développement chez l'homme et chez le rat sont inexistantes.

Nos résultats montrent que dans les plexus choroïdes, la proportion relative des claudines diffère au cours du développement chez le rat comme chez l'homme. Ceci suggère que les jonctions serrées assurent des fonctions régulées suivant les stades du développement. Nous confirmons la présence de CLDN1 et de CLDN2 chez le rat et mettons en évidence une expression de CLDN3. Ces claudines sont aussi présentes chez l'homme.

Dans les 2 types de plexus choroïdes, une augmentation de l'expression génique et protéique de CLDN2 a été observée chez le rat entre le stade embryonnaire E19 et les stades plus tardifs de développement. Au contraire, l'expression de CLDN3 diminuait entre les animaux au stade périnatal et les animaux adultes. Cette cinétique est retrouvée par immunohistochimie chez l'homme pour CLDN2 mais pas pour CLDN3. Dans l'analyse des tissus humains, l'immunomarquage anti-CLDN3 étant plus faible, il semble difficile d'objectiver une variation d'expression.

CLDN3 est considérée comme une protéine de scellement de la jonction serrée (Milatz S et al, 2010 ; Schulzke JD et al, 2102). CLDN2, elle, a la capacité de former un pore à cations (Na⁺, K⁺) (Yu AS, 2009 ; Schulzke JD et al, 2102). L'image « en miroir » de

l'expression de CLDN3 et de CLDN2 suggère que la barrière sang-LCR (plexus choroïdes) est moins perméable à certains ions ou composés de bas poids moléculaire dans l'encéphale en développement par rapport à l'encéphale adulte.

Ce profil développemental d'expression des claudines au niveau des plexus choroïdes peut être lié à la sécrétion du LCR par l'épithélium choroïdien. En effet, la sécrétion du LCR augmente très significativement dans la période postnatale chez les mammifères (Bass NH et Lundborg P, 1973). Chez l'adulte, la sécrétion du LCR est notamment déterminée par une ATPase Na^+/K^+ et une Anhydrase carbonique de type II (Damkier HH et al, 2013). La sécrétion du LCR résulte d'un transport complexe et coordonné de différents anions et cations inorganiques au niveau de l'épithélium choroïdien. Ces transports se font par voie transcellulaire du sang vers le LCR et incluent le Na^+ , le Cl^- et le HCO_3^- . Le gradient osmotique ainsi créé entraîne un flux d'eau du sang vers le LCR. Seul le transport du K^+ semble se faire par voie paracellulaire. La cinétique d'expression de CLDN2 au cours du développement suit l'augmentation de sécrétion du LCR. Dans ce cadre, la capacité à former un pore à cation de CLDN2 en ferait une candidate potentielle pour le transport paracellulaire du K^+ au niveau de l'épithélium choroïdien. La voie transcellulaire est considérée comme la voie principale des mouvements d'eau H_2O de part et d'autre de l'épithélium choroïdien. Le transport de l'eau se fait principalement par l'intermédiaire d'un canal apical, l'aquaporine 1. Dans une étude, la mise en évidence d'un transport d'eau au niveau de cellules MDCK transfectée avec CLDN2 soutiendrait l'hypothèse d'un rôle de cette claudine dans le transport de l'eau au niveau de la barrière sang-LCR (Rosenthal R et al, 2010). Une étude transcriptomique chez la souris a montré des résultats en accord avec la dynamique de CLDN2 que nous avons observée chez le rat et chez l'homme au cours du développement. Dans cette étude, il existait en effet un

niveau d'expression de CLDN2 élevé chez l'adulte par rapport à l'embryon (Liddelow SA et al, 2012).

Une expression faible de CLDN3 dans les capillaires cérébraux du rat n'est pas identifiée chez le fœtus humain. Une négativité de CLDN3 au niveau de la BHE a été rapportée récemment (Steinemann A et al, 2016) en accord avec nos résultats chez l'homme. Cette discordance pourrait être expliquée par une variation inter-espèces, une faible sensibilité de l'immunomarquage chez l'homme ou au contraire un marquage non-spécifique chez le rat.

CLDN11 remplit un rôle d'isolant électrique au niveau des oligodendrocytes myélinisants (Morita K et al, 1999a). CLDN11 pourrait remplir des fonctions semblables dans l'épithélium choroïdien et participer à empêcher la fuite non-spécifique de cations. Elle a été identifiée au niveau de l'épithélium choroïdien de la souris adulte (Lippoldt A et al, 2000) et notre étude montre de faible taux d'ARNm à ce niveau. Néanmoins, chez l'homme, l'expression immunohistochimique de CLDN11 n'a pas été confirmée au niveau de l'épithélium et semble restreinte au stroma choroïdien.

Durant la période périnatale, nous avons mis en évidence un ratio différent d'ARNm de CLDN2 et de CLDN11 entre les ventricules latéraux et le 4^{ème} ventricule. La cause de cette différence n'est pas connue mais pourrait être liée à une différence de contribution dans la sécrétion du LCR entre les plexus choroïdes des ventricules latéraux et du 4^{ème} ventricule. Pour CLDN2, cette différence est notable chez le rat en immunofluorescence mais pas évidente chez l'homme par immunohistochimie. Cette hypothèse reste à explorer.

CLDN5 est connue comme claudine endothéliale et comme composant majeur de la BHE (Morita K et al, 1999b ; Haseloff RF et al, 2015). Comme déjà décrit, nous identifions CLDN5 dans les microvaisseaux cérébraux aux stades de développement les plus

précoces. En utilisant le même anticorps monoclonal (Zymed, 4C3C2), il n'y a pas d'expression dans l'épithélium choroïdien chez le rat alors qu'il existe une expression positive à ce niveau chez l'homme. L'expression de CLDN5 dans l'épithélium choroïdien humain a été récemment confirmée dans une étude utilisant le même anticorps (Viràg J et al, 2017). La détection de CLDN5 au niveau des cellules épithéliales choroïdiennes humaines peut avoir plusieurs explications : une différence inter-espèces entre le rat et l'homme, un croisement de l'anti-CLDN5 avec une autre claudine. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour répondre à cette discordance entre le rat et l'homme.

Au total, les différences d'expression des protéines de jonction serrée que l'on observe au niveau de la barrière sang-LCR au cours du développement, nous semblent plus refléter un processus physiologique actif plutôt qu'une immaturité non-spécifique de la barrière. Le SNC en développement requiert un contrôle microenvironnemental spécifique auquel les jonctions serrées de l'interface sang-cerveau peuvent participer.

Résultats Etude 2

ETUDE 2 : Analyse des modifications de la barrière hémato-encéphalique et de la barrière sang-LCR dans un modèle d'excitotoxicité néonatale

Introduction :

L'injection intracérébrale d'iboténate constitue un modèle d'atteinte excitotoxique du SNC qui peut mimer les encéphalopathies hypoxo-ischémiques néonatales. Dans ces atteintes, les modifications de la BHE et de la barrière sang-LCR sont mal déterminées. Le rôle neuroprotecteur de la mélatonine, hormone anti-oxydante dont la forme endogène est sécrétée par la glande pinéale, sur ces lésions n'est pas connu.

Questions:

Quelles sont les lésions induites par l'iboténate chez le rat nouveau-né ?

Quelles sont les perturbations de la BHE et de l'interface sang-LCR (plexus choroïdes) dans ce modèle notamment quant à l'intégrité des jonctions serrées ?

La mélatonine, hormone anti-oxydante, a-t-elle un effet protecteur ?

Objectifs :

- 1) Définir les lésions induites par une drogue excitotoxique chez le raton.
- 2) Définir les perturbations de la BHE et de la barrière sang-LCR par l'étude des claudines (claudine 5 et claudine 2 respectivement).

Article correspondant :

Melatonin reduces excitotoxic blood-brain barrier breakdown in neonatal rats.

Moretti R, Zanin A, Pansiot J, Spiri D, Manganozzi L, Kratzer I, Favero G, **Vasiljevic A**, Rinaldi VE, Pic I, Massano D, D'Agostino I, Baburamani A, La Rocca MA, Rodella LF, Rezzani R, Ek J, Strazielle N, Ghersi-Egea JF, Gressens P, Titomanlio L. *Neuroscience* 2015 ; 311:382-397.

Résultats Etude 2

1) Introduction

Cette étude collaborative a été réalisée par R. Moretti et l'équipe des Pr Gressens et Titomanlio (INSERM U1141 Neuroprotection du cerveau en développement). Le but de cette étude était d'explorer les altérations de la BHE et de la barrière sang-LCR dans un modèle d'excitotoxicité périnatale induite par injection d'iboténate et d'évaluer les propriétés potentiellement neuroprotectrices de la mélatonine sur les lésions induites. Notre rôle dans ce travail a été d'analyser les lésions morphologiques aiguës induites par l'iboténate et d'évaluer l'état des jonctions serrées au niveau de la BHE et de la barrière sang-LCR (plexus choroïdes) par immunohistochimie dans ce modèle.

2) Résumé des travaux de R. Moretti et ses collègues

Deux méthodes ont été utilisées pour déterminer les modifications de perméabilité de la BHE aux petites molécules hydrophiles. L'étude de la perméabilité au sucrose radiomarqué (ratio des concentrations de sucrose cerveau/plasma) a été utilisée pour évaluer les changements globaux du fonctionnement de la BHE sur l'hémisphère lésé (ipsilatéral) comparé à l'hémisphère « sain » (controlatéral). Du dextran biotinylé a, lui, été utilisé pour détecter des altérations plus focales de la BHE. L'évaluation des zones de fuite du marqueur tenait compte de la densité du marquage et de la taille de la zone marquée. L'analyse des ratios de sucrose ne montrait pas de différence significative. L'étude au dextran montrait une augmentation de perméabilité de la BHE dans la zone

proche de l'injection d'iboténate à 2h post-injection. Chez les rats traités par Mélatonine, une diminution significative de cette fuite de dextran a été objectivée à 2h post-injection. Cette altération de la BHE diminuait à 4h et disparaissait à 18h post-injection.

La taille des lésions évaluée à P10 (J5 post-injection) sur coupes sériées après coloration par le Crésyl Violet était significativement moins étendues dans la substance blanche chez les animaux traités par Mélatonine.

Une étude par RT-PCR quantitative a été réalisée au niveau de la zone lésée et du plexus choroïde ipsilatéral à l'injection d'iboténate. Les gènes des protéines de jonction serrée ont été analysés. Il était notamment observé une diminution des expressions géniques de CLDN5 et de l'occludine dans la zone lésée à 4h post-injection. Au niveau des plexus choroïdes, aucune altération dans l'expression génique des protéines de jonctions serrées n'a été identifiée à 24h post-injection.

3) Altérations morphologiques en HPS (hématoxyline, phloxine, safran)

L'analyse a été effectuée sur les groupes « iboténate » et « iboténate + mélatonine ». Les encéphales des animaux sacrifiés 2 heures après injection d'iboténate ne montraient pas d'altération morphologiquement identifiables. A 4 heures post-injection, des zones clarifiées étaient visibles autour du ventricule latéral à proximité du site d'injection de l'iboténate (Fig.32A). Les zones lésées comprenaient les couches profondes du néocortex (Fig.32B), l'hippocampe (Fig.32C) et la partie dorsale du caudo-putamen. Les lésions étaient caractérisées par des neurones rétractés présents dans un neuropile oedémateux et vacuolisé (Fig.32B). L'œdème était à l'origine de la clarification des zones lésées, visible à faible grossissement. Les neurones présentaient un cytoplasme

hyperéosinophile et un noyau pycnotique (Fig.32B). Ces aspects sont ceux classiquement décrits dans les atteintes hypoxo-ischémiques (neurone de Spielmeyer).

A 24 heures post-injection, les lésions apparaissaient plus sévères.

Ces altérations morphologiques étaient absentes chez les animaux traités par Mélatonine (Fig.32E-G).

Aucune altération évidente des plexus choroïdes (Fig.32H) ou de l'épendyme n'a été mise en évidence.

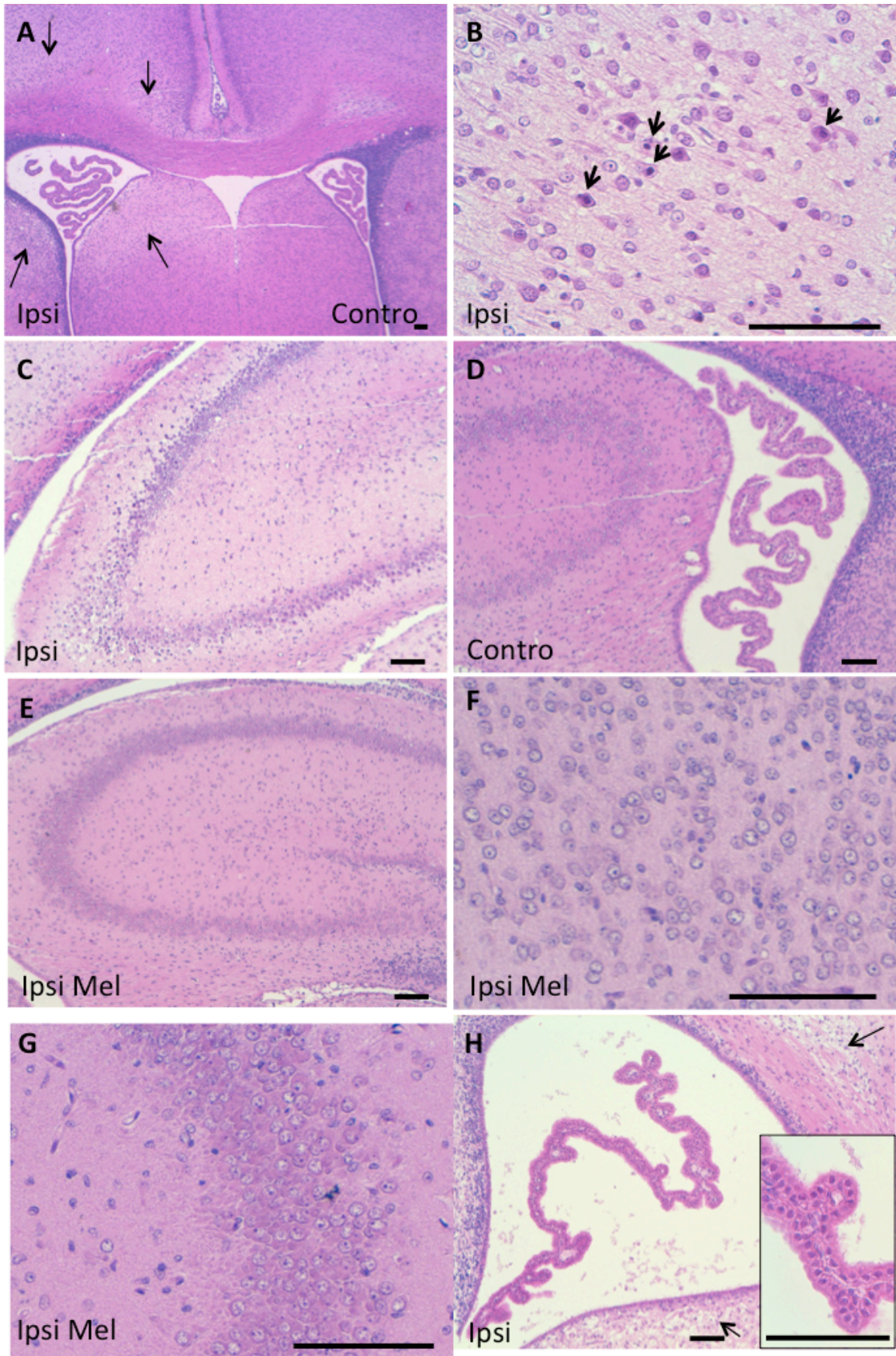


Figure 32. Sections coronales d'encéphales de rat après injection d'iboténate, sans et avec traitement par la mélatonine (coloration en HPS).

A à G- Sections au niveau du site d'injection de l'iboténate, 4 heures après.

A- Le tissu du côté ipsilatéral (Ipsi) apparaît clarifié (flèches), comparé au côté controlatéral, à l'exception de la région à la racine du corps calleux qui semble modifiée des deux côtés.

B- De nombreux neurones dans les couches corticales profondes présentent des noyaux pycnotiques (flèches courtes), et/ou un cytoplasme hyperéosinophile.

C et D- Les altérations morphologiques sont similaires au niveau de l'hippocampe ipsilatéral mais absentes dans l'hippocampe controlatéral.

E- Le traitement par mélatonine (Mel) prévient complètement les lésions induites par l'iboténate.

F-G Chez ces animaux, il n'est pas observé de neurones au noyau pycnotique et au cytoplasme hyperéosinophile dans les couches corticales profondes (F) et l'hippocampe (G).

H- Encéphale 24 heures après l'injection d'iboténate. Le plexus choroïde (encart) et l'épendyme ne présentent pas d'altération évidente après injection d'iboténate. Les lésions périventriculaires sont plus marquées par rapport au temps + 4h (flèches).

4) Analyse de l'expression de la claudine 5 (CLDN5) et de la claudine 2 (CLDN2) par immunohistochimie :

A 2 heures post-injection, l'expression de CLDN5 était confinée aux vaisseaux cérébraux, sans anomalie particulière.

A 4 heures post-injection, l'expression vasculaire de la CLDN5 était diminuée ou absente dans les zones lésées contrairement aux zones homolatérales situées à distance de la plage lésionnelle et à l'hémicerveau controlatéral (Fig.33A et B).

L'intégrité de l'expression de la CLDN5 au niveau des vaisseaux était préservée dans les cerveaux traités par mélatonine (Fig.33C).

L'expression de CLDN2, située à l'interface sang-LCR, au niveau des plexus choroïdes, n'était pas altérée dans les cerveaux injectés (Fig33.D et E).

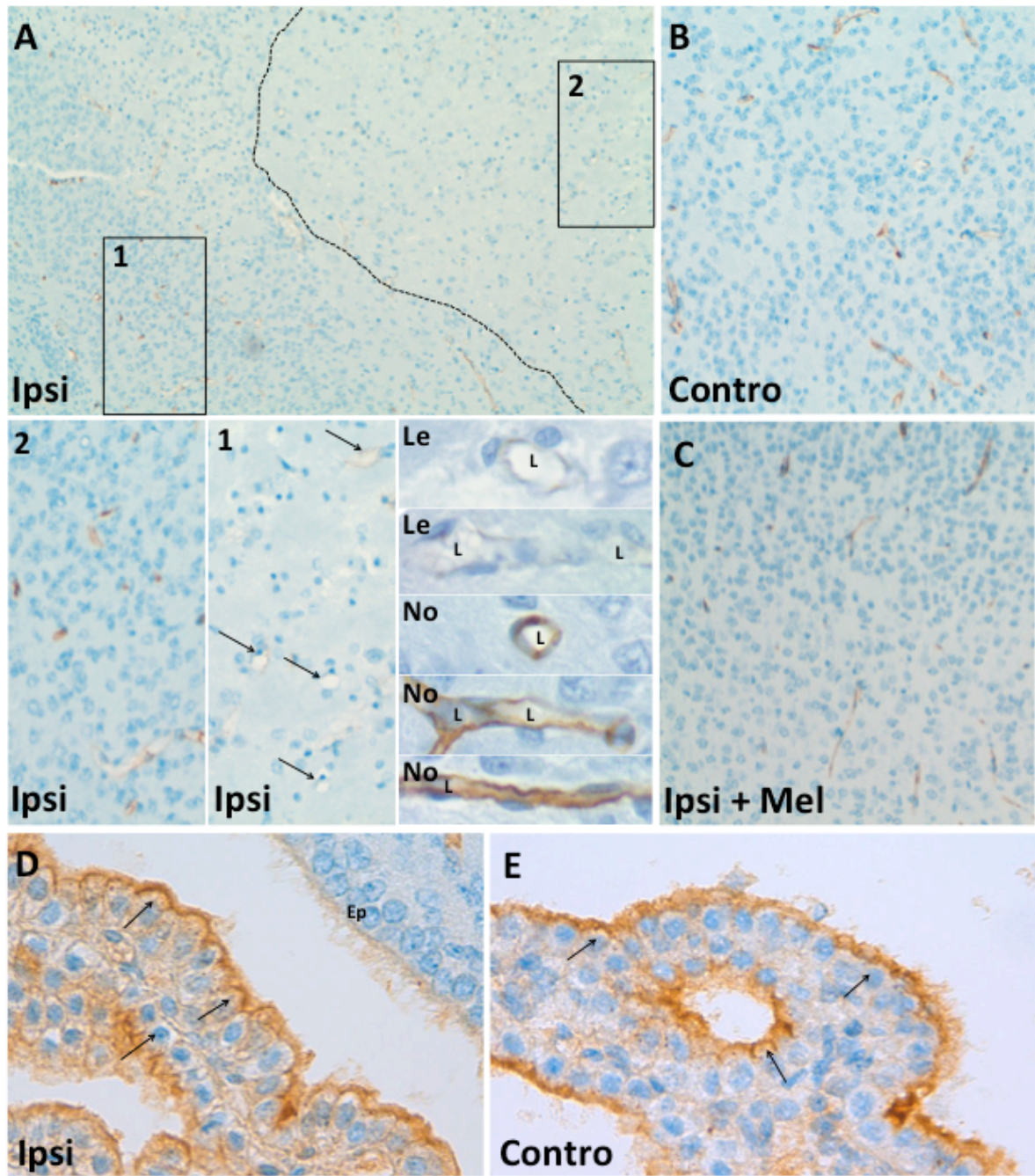


Figure 33 – Immunoexpressions de CLDN2 et de CLDN5 dans les encéphales de rat 4h après injection d'iboténate, avec et sans traitement par mélatonine.

A à C- Immunomarquage anti-CLDN5 des encéphales de rat 4 heures après injection d'Iboténate.

Dans l'hémisphère ipsilatéral à l'injection (A), une zone d'apparence normale (1 à gauche) et une zone lésée (2 à droite) peuvent être identifiées. Les rectangles 1 et 2 sont représentés à plus fort grossissement. L'immunopositivité de CLDN5 est fortement diminuée ou perdue dans les capillaires de la région lésée (flèches).

No et Le : Forts grossissements soulignant la forte immunopositivité de CLDN5 au niveau des jonctions serrées des capillaires de la zone morphologiquement normale (No), alors que le signal est fortement diminué voire absent dans la région lésée (Le). L : lumière des capillaires.

Le tissu controlatéral (B) est montré à titre de contrôle.

Dans (C), l'immunoexpression de CLDN5 au niveau de l'hémisphère ipsilatéral des animaux traités par mélatonine (Mel) apparaît similaire au contrôle.

(D,E). Immunomarquage anti-CLDN2 dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux d'encéphales prélevés 4 heures après injection d'iboténate (flèches : couche épithéliale). Une positivité apico-latérale similaire est observée dans l'épithélium choroïdien au niveau de l'hémisphère ipsilatéral (D) et controlatéral (E). (Ep : épendyme).

5) DISCUSSION

Cette étude montre que les lésions excitotoxiques induites par l'iboténate chez le rat nouveau-né sont associées à des altérations de la BHE. Ces altérations consistent notamment en une perte d'expression de CLDN5, protéine de jonction serrée, au niveau des capillaires cérébraux. Chez l'adulte, les accidents vasculaires cérébraux se caractérisent classiquement par deux phases principales : la phase ischémique et la phase de reperfusion (Sandoval KE et Witt KA, 2008). Au cours de la phase ischémique, il existe une augmentation de la perméabilité paracellulaire au niveau de la BHE qui est en général concomitante d'une perte d'expression ou de localisation des protéines de jonction serrée au niveau de la membrane plasmique des cellules endothéliales (claudine 5, occludine, ZO-1). Lors de la reperfusion, la perméabilité de la BHE est variable et présente plusieurs pics sous-tendus par des alternances d'assemblage et de désassemblage des jonctions serrées au niveau des capillaires cérébraux (Sandoval KE

et Witt KA, 2008). Les métalloprotéinases seraient des acteurs importants dans la dégradation des jonctions serrées et de la membrane basale capillaire. L'augmentation de perméabilité de la BHE contribue fortement à la formation d'un œdème dit « vasogénique ». Les perturbations de la BHE en période périnatale sont beaucoup moins bien caractérisées. Comparées à l'adulte, les atteintes hypoxo-ischémiques néonatales se caractérisent par une forte composante excitotoxique, une propension au développement de radicaux libres et une mort neuronale par apoptose en plus de la nécrose (Kratzer I et al, 2014). Dans une étude, la BHE a été analysée dans un modèle d'hypoxie-ischémie transitoire par occlusion de l'artère cérébrale moyenne chez le rat nouveau-né (P7) par rapport au rat adulte (Fernandez-Lopez D et al, 2012). Chez le rat nouveau-né, la faible fuite d'albumine dans le tissu lésé et l'imperméabilité de la BHE à des traceurs intravasculaires de taille variée, étaient en faveur d'une relative intégrité de la BHE comparée à l'adulte. Dans le tissu lésé, les niveaux d'expression génique de CLDN5, de l'occludine et de ZO-1 étaient mieux préservés par rapport à l'adulte et les taux protéiques de CLDN5 et de ZO-1 étaient plus élevés. Dans notre étude, l'expression immunohistochimique de CLDN5 était altérée en tissu lésé à 4h post-injection d'iboténate et ceci s'accompagnait d'une diminution concordante de l'expression génique de CLDN5. Ces résultats ne suggèrent pas spontanément de bonne préservation de l'intégrité de la BHE. Cependant, il est difficile de comparer les deux études en raison des différences de modèles (excitotoxicité versus occlusion artérielle transitoire) et de l'absence de comparaison avec le rat adulte dans notre analyse. Nos résultats se rapprochent d'une étude utilisant un modèle par ligature de l'artère carotide commune chez le rat nouveau-né (Zhang W et al, 2016). Dans ce modèle, l'expression de CLDN5, de ZO-1 et de l'occludine étaient diminuée en immunohistochimie au niveau des capillaires

cérébraux et en Western Blot sur l'hémisphère ipsilatéral. Ces altérations étaient améliorées chez les rats traités par acides gras polyinsaturés.

La place de la barrière sang-LCR (plexus choroïdes) dans les atteintes hypoxo-ischémiques du SNC est mal connue (Xiang J et al, 2017). Chez l'homme, les infarctus des plexus choroïdes lors d'un accident vasculaire cérébral ont rarement été rapportés dans la littérature. Leur vascularisation se caractérise par un réseau de collatérales développées qui assure une protection contre les atteintes hypoxo-ischémiques. Dans un modèle d'hypoxo-ischémie par ligature unilatérale permanente de l'artère carotide moyenne suivie d'une exposition en milieu hypoxique chez le rat nouveau-né, une nécrose du revêtement épithélial du plexus choroïde ipsilatéral a été observée (Rothstein RP et Levison SW, 2002). Dans le modèle excitotoxique par injection d'iboténate, nous n'avons pas constaté d'altération morphologique des plexus choroïdes et de modifications de CLDN2 dans l'hémisphère ipsilatéral. Le plexus choroïde peut aussi être vu comme un « acteur » de la réponse après atteinte hypoxo-ischémique (Kratzer I et al, 2014 ; Xiang J et al, 2017). Il constitue en effet une porte d'entrée des cellules inflammatoires dans le SNC (Llovera G et al, 2017). Dans un modèle d'hypoxo-ischémie cérébrale chez l'adulte, la greffe de plexus choroïdes diminuait la taille de l'infarctus et améliorait les fonctions neurologiques (Borolongan CV et al, 2004). Ces effets seraient médiés par la sécrétion de facteurs trophiques comme le BDNF (Brain-Derived Neurotrophic factor).

La mélatonine est une hormone synthétisée par la glande pinéale. Elle joue un rôle majeure dans le maintien des cycles veille-sommeil et constitue un marqueur de l'obscurité par sa sécrétion nocturne (Watson N et al, 2016). Outre ses fonctions de régulation des rythmes circadiens, la mélatonine a été proposée comme agent neuroprotecteur notamment dans les atteintes hypoxo-ischémiques (Dixon BJ et al,

2015). Le caractère neuroprotecteur de la mélatonine est principalement attribué à ses propriétés anti-oxydantes. La mélatonine peut inactiver les radicaux hydroxyle par la réaction de Fenton, réduit la peroxydation des lipides dans le SNC et bloque la toxicité liée aux singulets d'oxygène (Watson N et al, 2016). Un rôle plus indirect de protection des astrocytes et de limitation de la réponse inflammatoire a été avancé.

Nos travaux mettent en avant une action possible de la mélatonine sur le maintien des jonctions serrées lors d'un stress excitotoxique. Cet effet pourrait être médié de manière indirecte par ses propriétés anti-oxydantes.

Résultats Etude 3

ETUDE 3 : Analyse de l'expression des claudines dans l'organe sous-commissural chez l'homme. Evaluation de leur intérêt dans le diagnostic des tumeurs périventriculaires

Introduction :

En tant qu'OCV, l'organe sous-commissural (OSC) présente un profil de barrière inhabituel au sein du SNC, notamment caractérisé par une couche d'épendymocytes spécialisés reliés par des jonctions serrées. D'analyse limitée chez l'homme de par sa régression à l'âge adulte, l'OSC serait à l'origine d'une tumeur périventriculaire, la tumeur papillaire de la région pinéale.

Questions :

Quelle est la composition moléculaire (claudines) de l'OSC chez le fœtus humain?
Les tumeurs périventriculaires expriment-elles des claudines ?
Est-ce que leur composition différentielle en claudines peut être une aide dans leur diagnostic ?

Objectifs :

- 1) Définir la composition en claudines d'un OCV, l'OSC, chez le fœtus humain.
- 2) Evaluer l'utilité des claudines comme marqueur diagnostique de différentes tumeurs périventriculaires chez l'homme.

Article correspondant :

Histopathologic and ultrastructural features and claudin expression in papillary tumors of the pineal region : a multicenter analysis.

Fèvre-Montange M*, Vasiljevic A*, Bergemer-Fouquet AM, Bernier M, Champier J, Chrétien F, Figarella-Branger D, Kemeny JL, Lechapt-Zalcman E, Michalak S, Miquel C, Mokhtari K, Pommeypuy I, Quintin-Roué I, Rousseau A, Saint-Pierre G, Salon C, Uro-Coste E, Varlet P, Kratzer I, Ghersi-Egea JF, Jouvet A. Am J Surg Pathol 2012 ; 36: 916-928

* : co-premiers auteurs

Résultats ETUDE 3

1) Données cliniques

Un total de 46 patients présentant une tumeur papillaire de la région pinéale (TPRP) a été analysé. Les patients avaient entre 5 et 71 ans (médiane à 35 ans/moyenne à 36,2 ans \pm 2,7). La taille de la tumeur, évaluée sur les imageries préopératoires dans 30 cas (diamètre maximal), était en moyenne de 32,0 mm \pm 1,7 et variait de 20 à 54 mm.

Une exérèse chirurgicale de la tumeur a été réalisée chez 33 patients. Une biopsie diagnostique seule a été effectuée chez les 13 patients restants.

Un suivi détaillé était disponible pour 31 patients. La période moyenne de suivi était de 4,5 ans \pm 0,8 (0,1 à 19 ans). Parmi ces patients, 15 ont présenté une récurrence tumorale au cours de la période de suivi.

2) Histopathologie

Dans 30 cas, la tumeur présentait une architecture papillaire (Fig.34A). Les papilles étaient revêtues d'une couche pseudostratifiée de cellules cubiques à cylindriques (Fig.34C). Dans les 16 autres cas, des plages solides se mêlaient aux zones papillaires (Fig.34B). Dans 12 cas, des fragments de glande pinéale, isolés ou infiltrés par la tumeur, étaient identifiés (Fig.34D). Dans les tumeurs d'architecture papillaire, 66,6% des cellules étaient de taille moyenne, 16,6% de petite taille et 16,6% de grande taille. Dans les tumeurs avec zones solides, 50% des cellules étaient de taille moyenne, 31,2% de petite taille et 18,8% de grande taille. Le noyau des cellules tumorales était le plus

souvent excentré dans le cytoplasme. Trois tumeurs étaient composées de cellules au cytoplasme clair et vacuolisé.

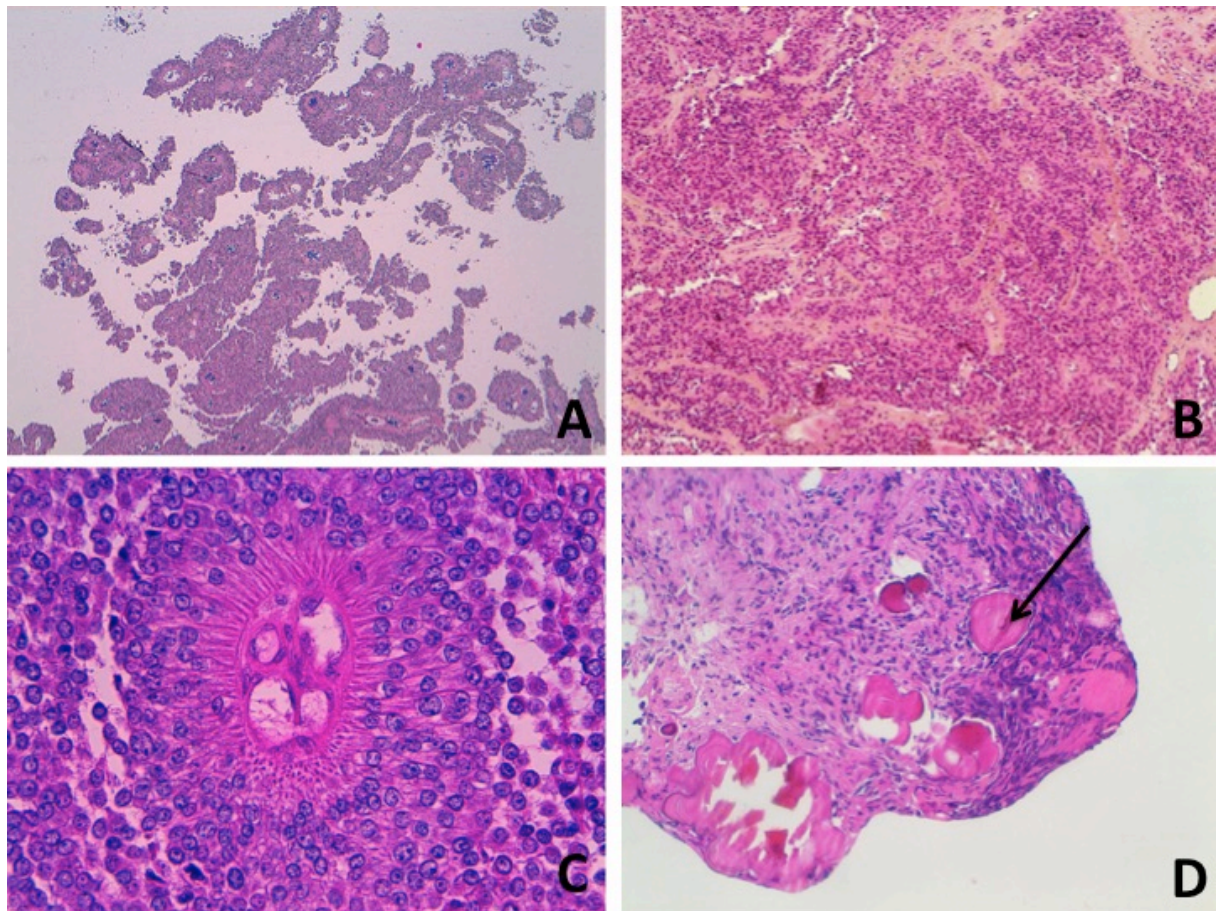


Figure 34. Architecture des TPRP (Coloration Hématoxyline, Phloxine, Safran HPS)

A- Architecture papillaire dans une TPRP (Grossissement original X 40).

B- Architecture solide dans une TPRP (Grossissement original X 100).

C- Papille caractéristique d'une TPRP : axe vasculaire revêtu d'une couche radiaire et pseudostratifiée de cellules tumorales (Grossissement original X 400).

D- Des fragments de glande pinéale sont reconnaissables par la présence de calcifications psammomateuses caractéristiques (flèche) (Grossissement original X 200).

La vascularisation des TPRP se caractérisait par un aspect souvent « pseudo-angiomateux » (Fig.35A et B). Les axes des papilles contenaient de multiples lumières capillaires. Cette multiplicité des lumières vasculaires n'était en général pas associée à une hyperplasie des cellules endothéliales ou une prolifération microvasculaire

(Fig.35D). Dans certains cas, la paroi des vaisseaux présentait un épaissement fibro-hyalin (Fig.35C).

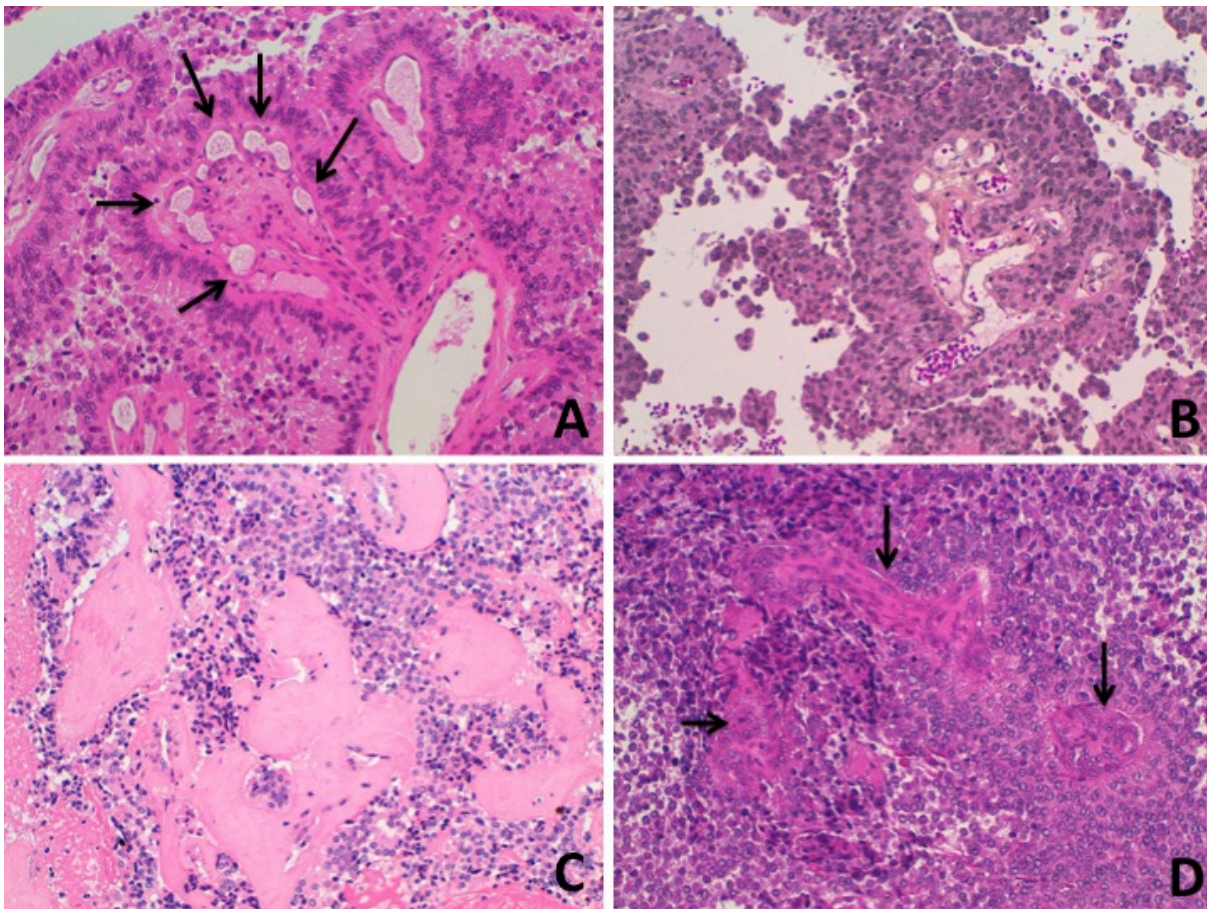


Figure 35. Vascularisation dans les TPRP (Coloration HPS)

A- Bouquet vasculaire d'aspect « pseudo-angiomateux » dans l'axe d'une papille de TPRP. Les lumières capillaires sont multiples (flèches) (Grossissement original X 200).

B- Autre exemple de bouquet vasculaire « pseudo-angiomateux » (Grossissement original X 200).

C- Les vaisseaux peuvent se hyaliniser, réduisant la taille de la lumière vasculaire (Grossissement original X 200).

D- Dans un seul cas les vaisseaux avaient un aspect proliférant (flèches) comme dans les gliomes (Grossissement original X 200).

Dans certains cas, le revêtement épithélial tumoral des papilles se détachait de son axe vasculaire. Ce détachement était à l'origine d'un espace clair périvasculaire de taille variable (Fig.36A à C). A ce niveau, le pôle vasculaire des cellules tumorales était caractérisé par un renforcement linéaire éosinophile bien défini (Fig.36B). Les espaces clairs périvasculaires larges contenant de petits vaisseaux aboutissaient à un aspect de

« faux-tubes » (Fig.36C). De « vraies » rosettes avec de petites lumières distinctes étaient parfois observées (Fig.36D).

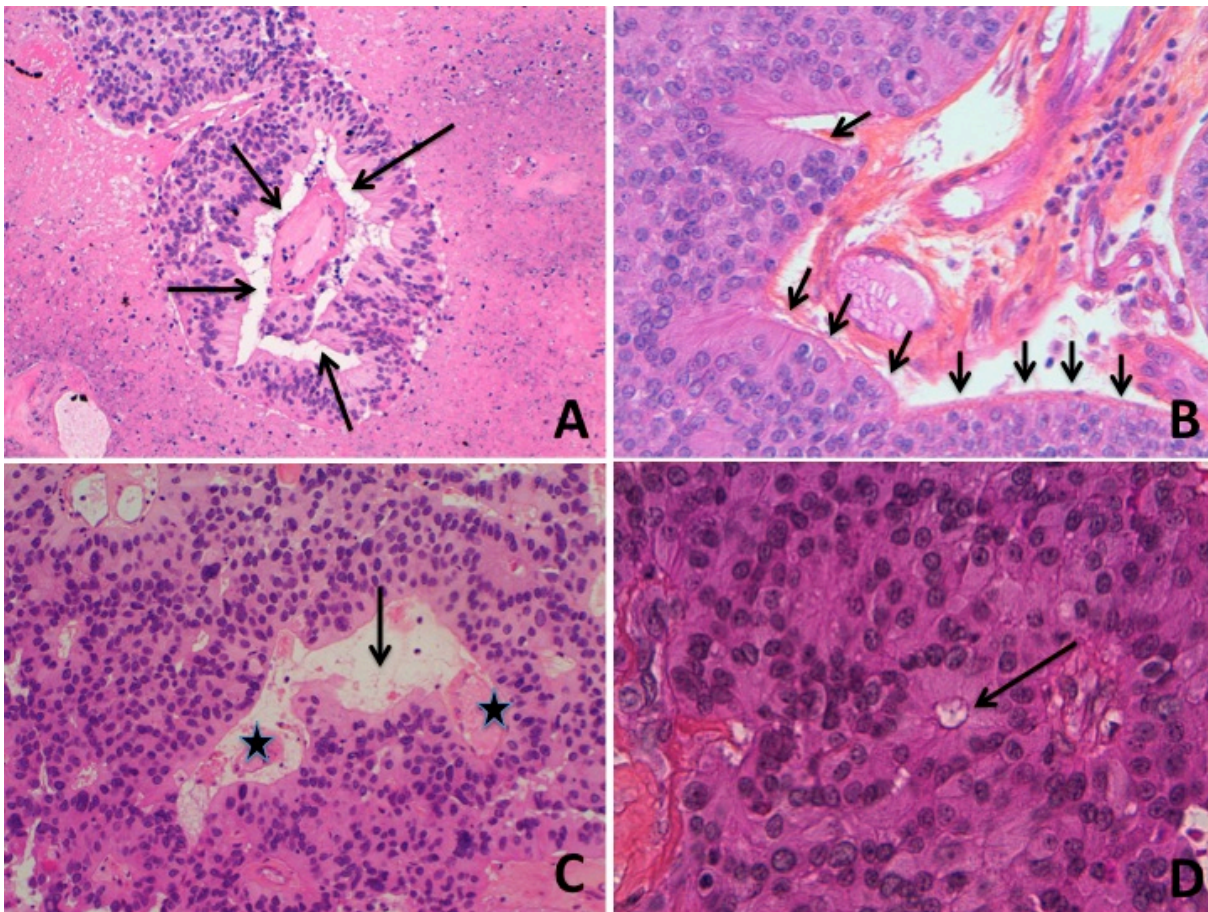


Figure 36. Espaces clairs périvasculaires dans les TPRP (Coloration HPS)

A- Détachement des cellules tumorales de leur axe vasculaire à l'origine d'un espace clair périvasculaire (flèches) (Grossissement original X 200).

B- La base des cellules se caractérise par une ligne fortement éosinophile et bien définie (flèches) (Grossissement original X 400).

C- Les espaces clairs périvasculaires peuvent être de grande taille (flèche) et contenir de petits vaisseaux (étoiles). Ceci peut aboutir à un aspect de « faux-tube » (Grossissement original X 200).

D- De « vraies » rosettes sont très focalement observées (Grossissement original X 600).

Une anisocaryose était présente dans 20% des tumeurs d'architecture papillaire et dans 18,8% des tumeurs comprenant des plages solides. Parmi les cas avec atypies nucléaires, le pléomorphisme nucléaire était parfois très prononcé avec des noyaux volumineux, aux contours irréguliers, avec une chromatine dense et « charbonneuse »

(Fig.37A). Certains de ces noyaux comprenaient une inclusion cytoplasmique intranucléaire (Fig.37B). Des plages de nécrose dont la nature ischémique ou tumorale était difficile à préciser, étaient observées dans certaines tumeurs (Fig.37C).

L'activité mitotique était modérée et variait de 0 à 20 mitoses pour 10 champs examinés à l'objectif x 40 (médiane à 2 mitoses) (Fig.37D). Seules 4 tumeurs présentaient un compte mitotique de 10 mitoses ou plus. L'activité mitotique moyenne entre les TPRP d'architecture papillaire et les TPRP avec zones solides ne différait pas significativement ($2,7 \pm 0,7$ contre $4,6 \pm 1,4$ respectivement).

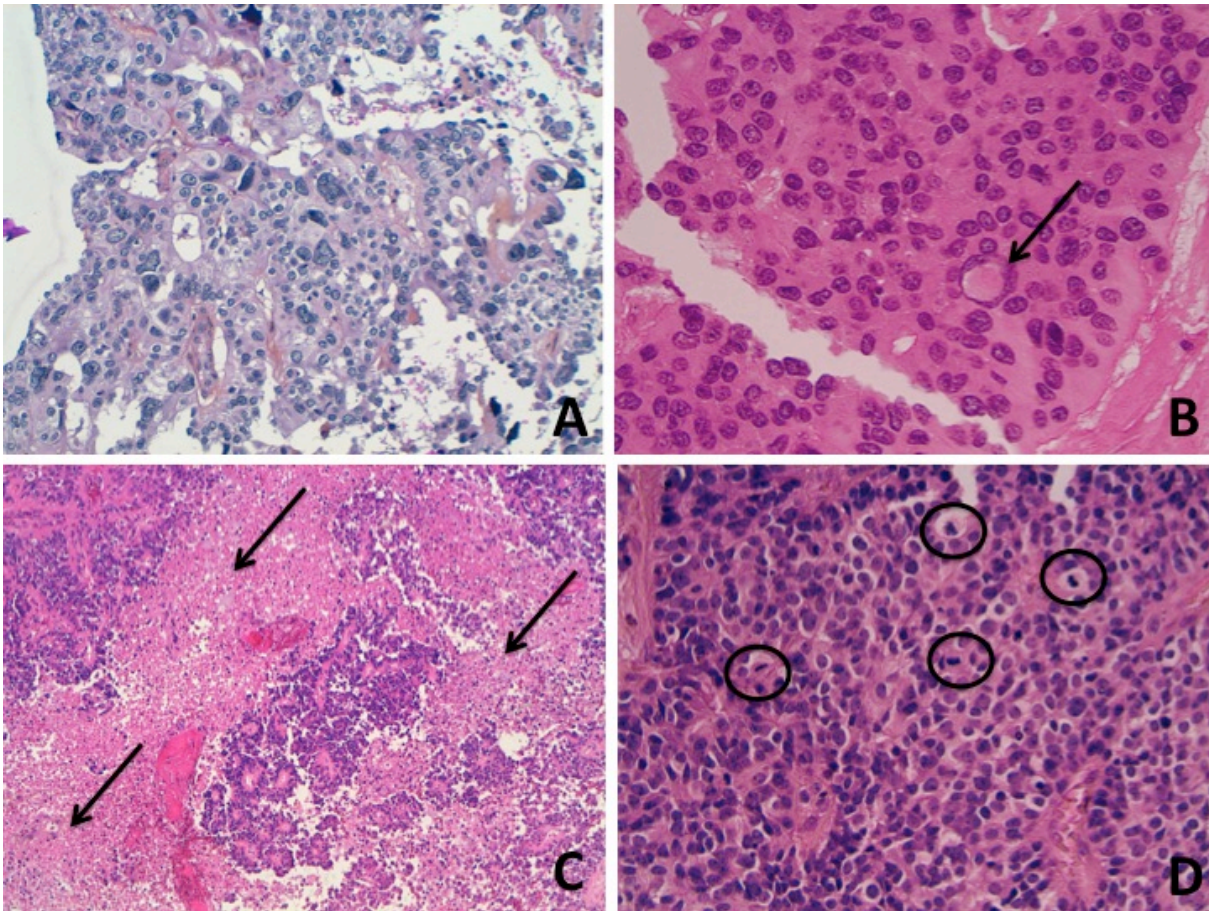


Figure 37. Signes histopathologiques d'agressivité dans les TPRP (Coloration HPS)

A- Certaines TPRP peuvent présenter des plages de noyaux très atypiques (pléomorphisme nucléaire) (Grossissement original X 200).

B- Ces noyaux peuvent présenter des inclusions cytoplasmiques intranucléaires (flèche) (Grossissement original X 400).

C- Dans cet exemple de TPRP, des plages de nécrose éosinophile occupent les zones interpapillaires (Grossissement original X 100).

D- Dans cet exemple de TPRP, les figures mitotiques sont nombreuses (Grossissement original X 400).

3) Microscopie électronique

Neuf cas ont été analysés à l'échelon ultrastructural (5 TPRP d'architecture papillaire et 4 TPRP avec zones solides).

Les tumeurs étaient formées par une alternance de cellules claires et de cellules sombres (Fig.38C). Les cellules étaient caractérisées par un aspect épithélial. Leur cytoplasme était abondant et riche en organites (Fig. 38C). Les noyaux étaient ovoïdes ou indentés et en général, localisés à un pôle de la cellule. Le réticulum endoplasmique granuleux était abondant dans le cytoplasme. Des citernes dilatées par un matériel granulaire étaient focalement observées. Les organites fréquemment identifiés dans le cytoplasme comprenaient des vésicules à cœur dense, des microtubules, des vésicules claires et à manteau, de nombreuses mitochondries (Fig.39A) et des filaments (Fig. 39D). Il existait parfois une zonation de ces organites. Les pôles apicaux des cellules se caractérisaient par la présence de nombreuses microvillosités (Fig. 38A et 39A) alors que les cils étaient au contraire rares (Fig.39B). Des complexes jonctionnels intercellulaires bien définis étaient identifiés dans les régions apicales de certains regroupements cellulaires (en général les cellules formant des tubes ou « vraies » rosettes). Ces complexes jonctionnels étaient formés de jonctions serrées et de jonctions adhérentes (Fig. 38A à C). Un matériel filamentaire était parfois associé au versant cytoplasmique des jonctions adhérentes. Une membrane basale bordait les pôles basaux des cellules tumorales (Fig. 38D). Des jonctions intercellulaires étaient parfois identifiées au pôle basal des cellules en regard de la lumière vasculaire (Fig. 38D). L'espace périvasculaire pouvait apparaître « vide » (Fig. 38D) ou comblé de filaments collagéniques. Des jonctions serrées reliaient les cellules endothéliales entre elles.

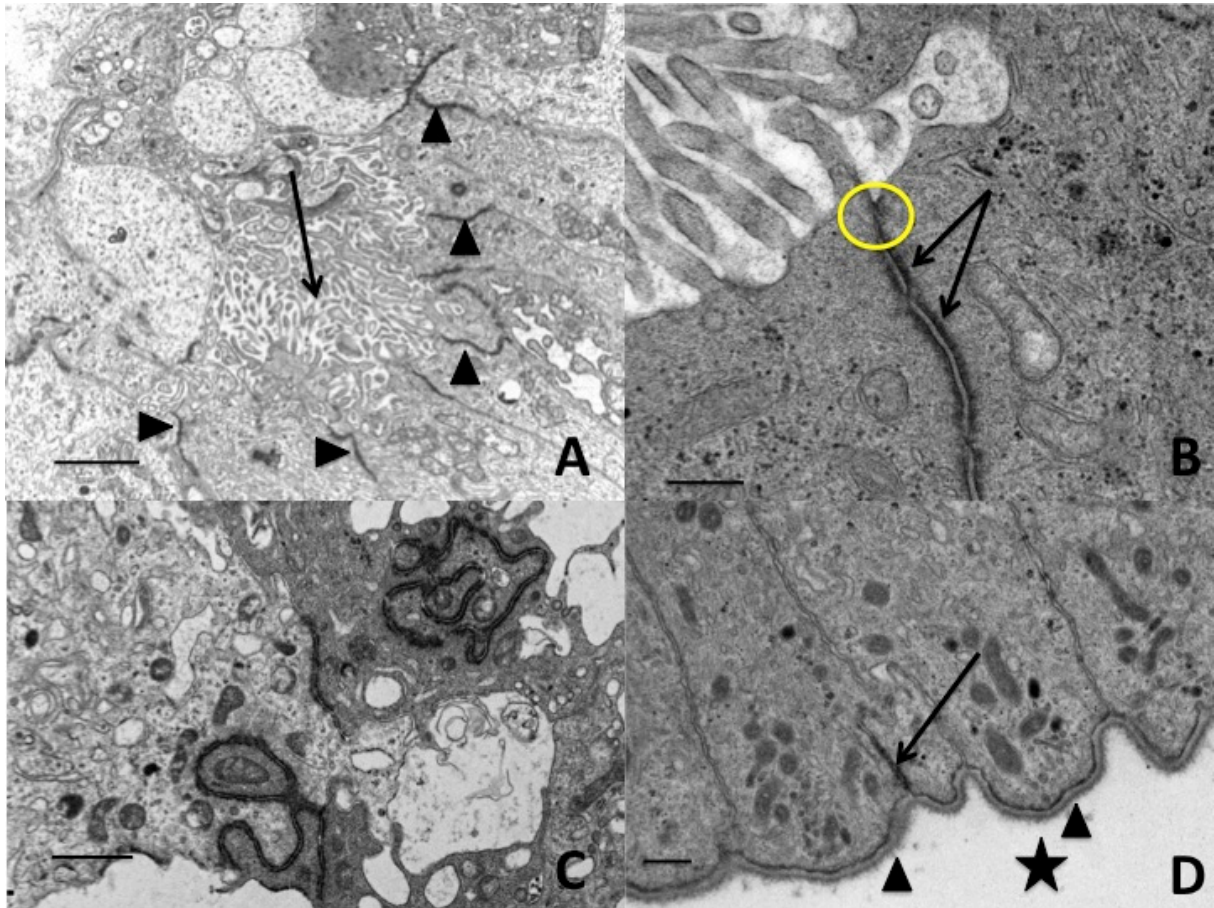


Figure 38. Caractéristiques ultrastructurales des TPRP (1)

A- «Vraies» rosettes dans une TPRP. La lumière est occupée de nombreuses microvillosités (flèche). Les cellules formant la rosette sont reliées entre elles par un complexe jonctionnel apico-latéral (têtes de flèche) (Barre d'échelle = 1 μ m).

B- Complexe jonctionnel au pôle apical de 2 cellules tumorales. La jonction serrée (cercle jaune) se situe à l'extrémité toute apicale de l'espace intercellulaire. Les autres jonctions visibles plus bas situées sont de type «adherens» (Barre d'échelle = 0,2 μ m).

C- Alternance de cellules claires et cellules sombres, d'aspect épithélial, avec un cytoplasme riche en organites et de nombreux complexes jonctionnels (Barre d'échelle = 1 μ m).

D- Au pôle basal des cellules tumorales autour des vaisseaux, les prolongements cellulaires sont bordés par une membrane basale (têtes de flèche). Des complexes jonctionnels sont parfois identifiés à ce niveau (flèche). Il existe souvent un espace clair périvasculaire entre les cellules tumorales et les vaisseaux (étoile noire) (Barre d'échelle = 0,5 μ m).

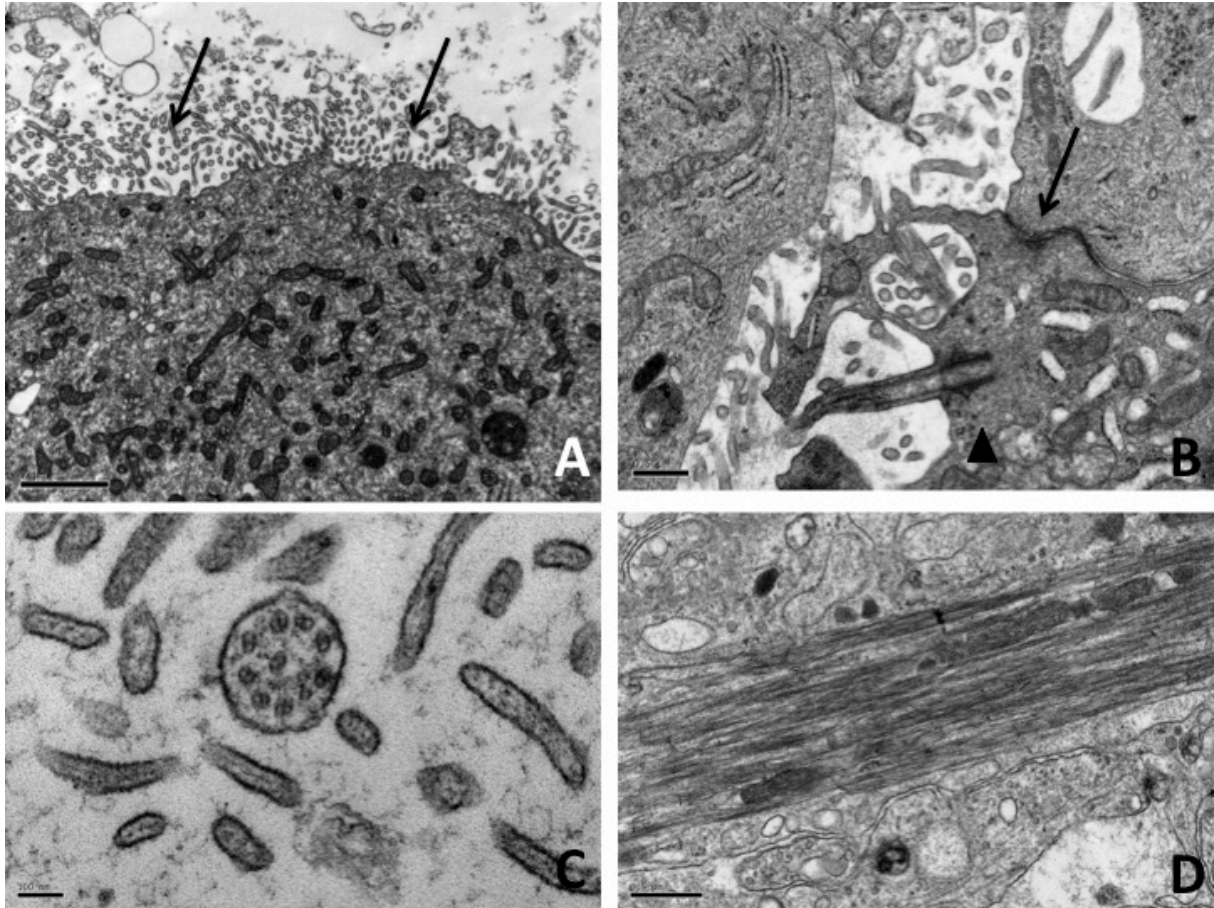


Figure 39. Caractéristiques ultrastructurales des TPRP (2)

A- Nombreuses mitochondries dans le cytoplasme de cellules tumorales. Le pôle apical de ces cellules est riche en microvillosités (Barre d'échelle = 2 μm).

B- Lumière contenant des microvillosités et des cils. La base d'un cil et son corpuscule basal sont visibles (tête de flèche). Un complexe jonctionnel intercellulaire est également observé (flèche) (Barre d'échelle= 0,5 μm).

C- Section transversale d'un cil (9 + 1) (Barre d'échelle = 0,1 μm).

D- Présence d'amas de filaments dans le cytoplasme des cellules tumorales (Barre d'échelle = 0,2 μm).

4) Analyse immunohistochimique

Les résultats de l'analyse immunohistochimique (hors claudines) sont résumés dans le tableau 10 page 135.

- Marqueurs épithéiaux

L'ensemble des tumeurs exprimaient la cytokératine 18 et les pancytokératines AE1-AE3 et KL1 (100%) (Fig.40A à C). L'expression de la cytokératine 18 était hétérogène et focale, principalement localisée dans les régions périvasculaires. Elle était fortement exprimée dans des fragments de plexus choroïdes accompagnant la tumeur. Il n'y avait pas d'expression de la cytokératine 20. La cytokératine 7 était focalement positive dans 4 tumeurs sur 18 testées.

L'E-Cadhérine n'était pas exprimée dans les cellules tumorales mais dans les plexus choroïdes (Fig.40D).

- Marqueurs gliaux

L'ensemble des TPRP exprimait fortement la vimentine (Fig.40E). La PS100 était exprimée dans 97% des tumeurs testées avec une répartition et une intensité très hétérogène d'une tumeur à l'autre. Il n'y avait pas d'expression de la GFAP (Fig.40F).

- Marqueurs neuroendocrines

Le marqueur neuroépithélial CD56 (ou NCAM) était positif dans 94% des TPRP, avec une expression à prédominance membranaire (Fig.40G). Aucune expression des neurofilaments n'a été mise en évidence dans les cellules tumorales (Fig.40H). Quand il était présent, le parenchyme pinéal était par contre très fortement marqué. Une positivité focale, en général faible, de la synaptophysine était présente dans 46% des TPRP testées. Une expression focale de la chromogranine A était identifiée dans 20% des cas.

- Index de prolifération évalué avec l'anti-Ki67

L'index de prolifération étudié dans 33 tumeurs variait de 1,0 à 29,7% (médiane à 7,5%) (Fig.40I). La moyenne était de $8\% \pm 1,3$ dans les TPRP avec architecture papillaire et de $9\% \pm 1,6$ dans les TPRP avec zones solides. La différence entre les 2 moyennes n'était

pas statistiquement significative. La glande pinéale, présente à proximité de certaines TPRP, ne comprenait pas de noyaux marqués avec l'anti-Ki67. De rares cellules endothéliales présentaient une positivité nucléaire.

| Antigène | Nombre de tumeurs analysées | + | +/- | 0 |
|-------------------------|-----------------------------|-----|-----|-----|
| | | (%) | (%) | (%) |
| Cytokératine 18 | 38 | 100 | 0 | 0 |
| Pancytokératine KL1 | 37 | 95 | 5 | 0 |
| Pancytokératine AE1-AE3 | 20 | 80 | 20 | 0 |
| Cytokératine 7 | 18 | 0 | 22 | 78 |
| Cytokératine 20 | 17 | 0 | 0 | 100 |
| NCAM | 35 | 94 | 3 | 3 |
| Neurofilaments | 32 | 0 | 0 | 100 |
| Synaptophysine | 44 | 14 | 32 | 54 |
| Chromogranine A | 40 | 13 | 7 | 80 |
| E-cadhérine | 34 | 0 | 0 | 100 |
| EMA | 41 | 12 | 35 | 53 |
| GFAP | 40 | 0 | 10 | 90 |
| Vimentine | 32 | 94 | 6 | 0 |
| Protéine S100 | 36 | 72 | 25 | 3 |

Tableau 10- Analyse immunohistochimique des TPRP
(Evaluation de l'expression: 0 : absent ; +/- : faible ; + : forte)

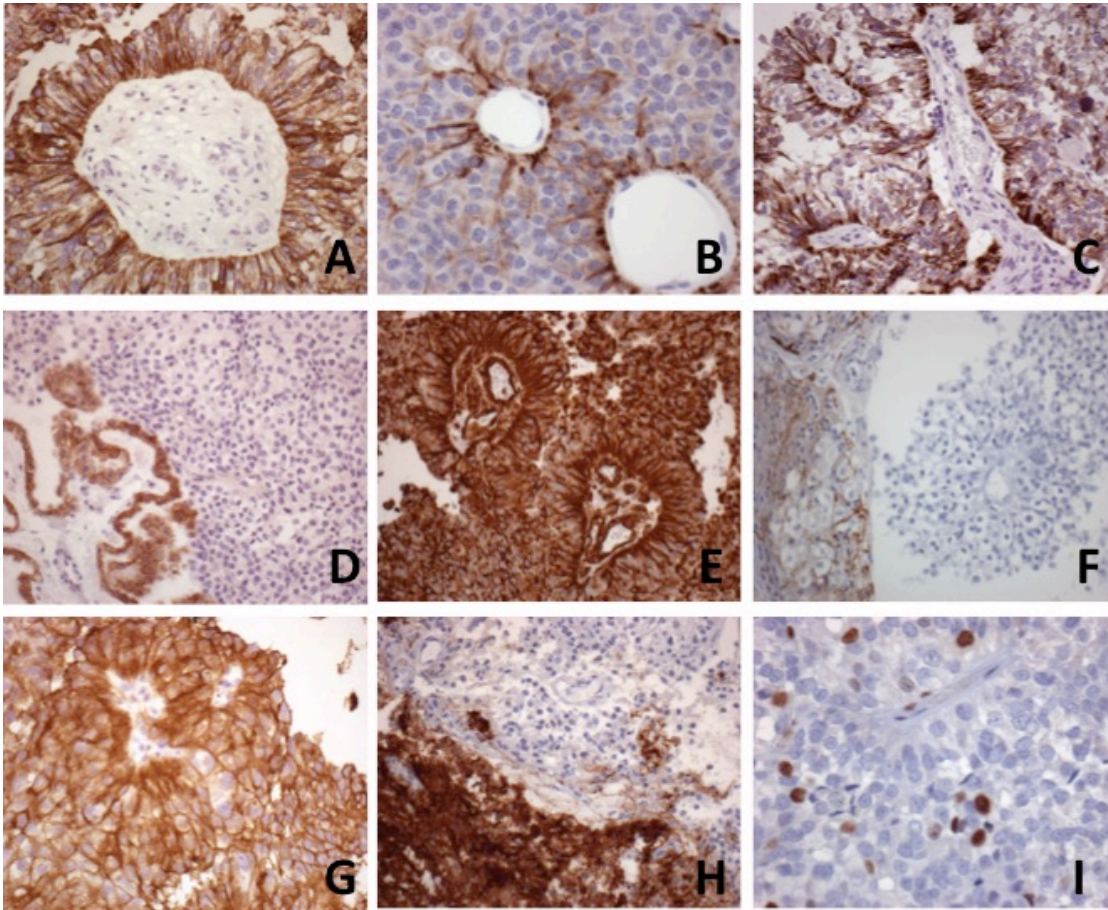


Figure 40. Immunophénotypage des TPRP

L'expression de la cytokératine 18 dans les cellules tumorales se concentre autour de l'axe vasculaire des papilles. Elle peut-être forte (A) ou plus faible (B). Cette distribution à prédominance périvasculaire est retrouvée sur l'immunomarquage anti-pancytokeratine KL1 (C). Les TPRP n'expriment pas l'E-Cadhérine, contrairement aux plexus choroïdes (D). La vimentine est fortement exprimée dans les TPRP avec des renforcements périvasculaires (E). Contrairement aux épendymomes, les TPRP n'expriment pas la GFAP. Une positivité de la GFAP est ici visible dans les astrocytes d'un fragment de glande pinéale juxta-tumorale (F). Les TPRP expriment fortement le CD56 (ou NCAM) (G). Contrairement aux tumeurs du parenchyme pinéal, les TPRP n'expriment pas les neurofilaments. Cette expression est très forte dans les fragments de glande pinéale juxta-tumorale (H). L'index de prolifération évalué avec l'anti-Ki67 est variable et s'échelonne de 1 à 30% environ (I).

5) Expression des claudines dans l'organe sous-commissural, le neuro-épendyme et les plexus choroïdes chez le fœtus humain

L'organe sous-commissural fœtal (OSC) a été analysé au niveau de la jonction diencéphalo-mésencéphalique sur des coupes frontales. Il apparaît chez le fœtus humain comme une structure nettement différenciée du neuro-épendyme adjacent. Il est constitué d'un neuroépithélium épais, pseudostratifié, présentant un pôle apical bien développé (Fig.41).

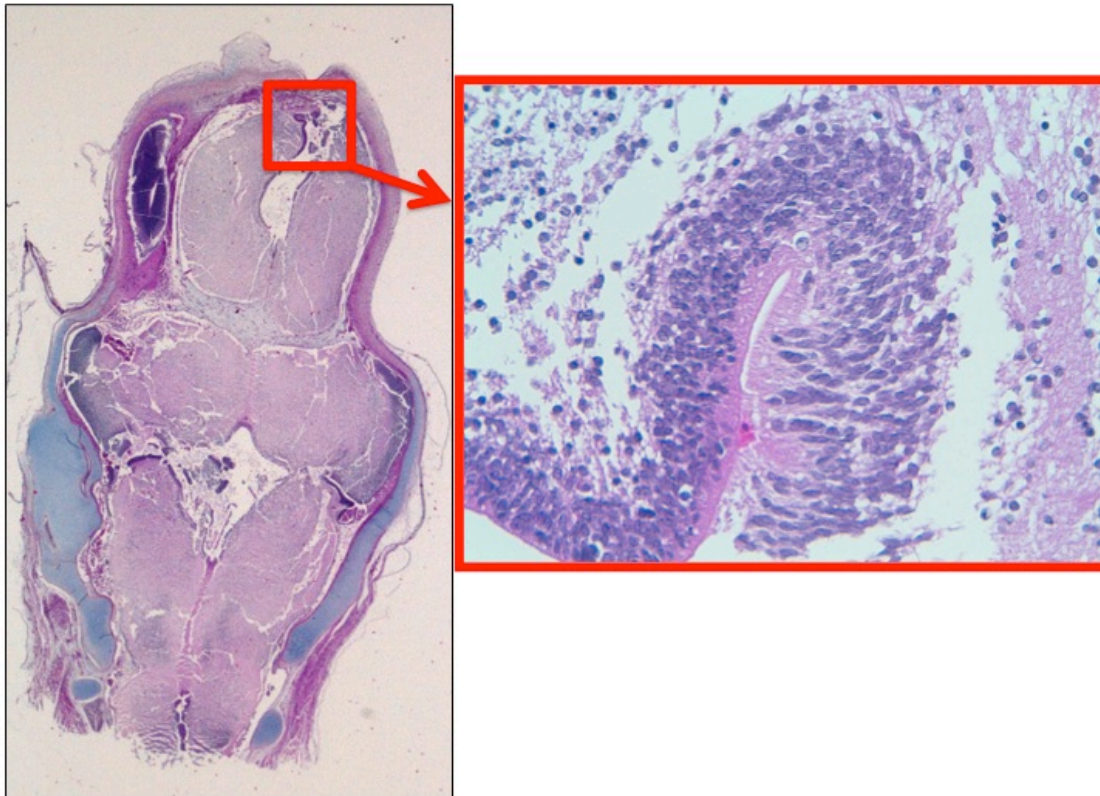


Figure 41- Organe sous-commissural fœtal (Coloration HPS)

Structure localisée à la jonction diencéphalo-mésencéphalique caractérisée par un neuroépithélium épais, pseudostratifié, avec pôle apical éosinophile bien développé.

CLDN1 était fortement exprimée au niveau du pôle apical de l'OSC fœtal (Fig.42B). Cette positivité s'étendait en profondeur au niveau de prolongements cellulaires issus de la

base de l'OSC. CLDN2 n'était pas exprimée (Fig.42C). CLDN3 présentait une expression de localisation semblable à CLDN1 mais avec une intensité moindre (Fig.42D).

Le neuro-épendyme foetal (Fig.43A) n'exprimait aucune des 3 claudines testées (Fig.43B à D). Les plexus choroïdes (Fig.44A), au contraire, exprimaient les 3 claudines testées (Fig.44B à D).

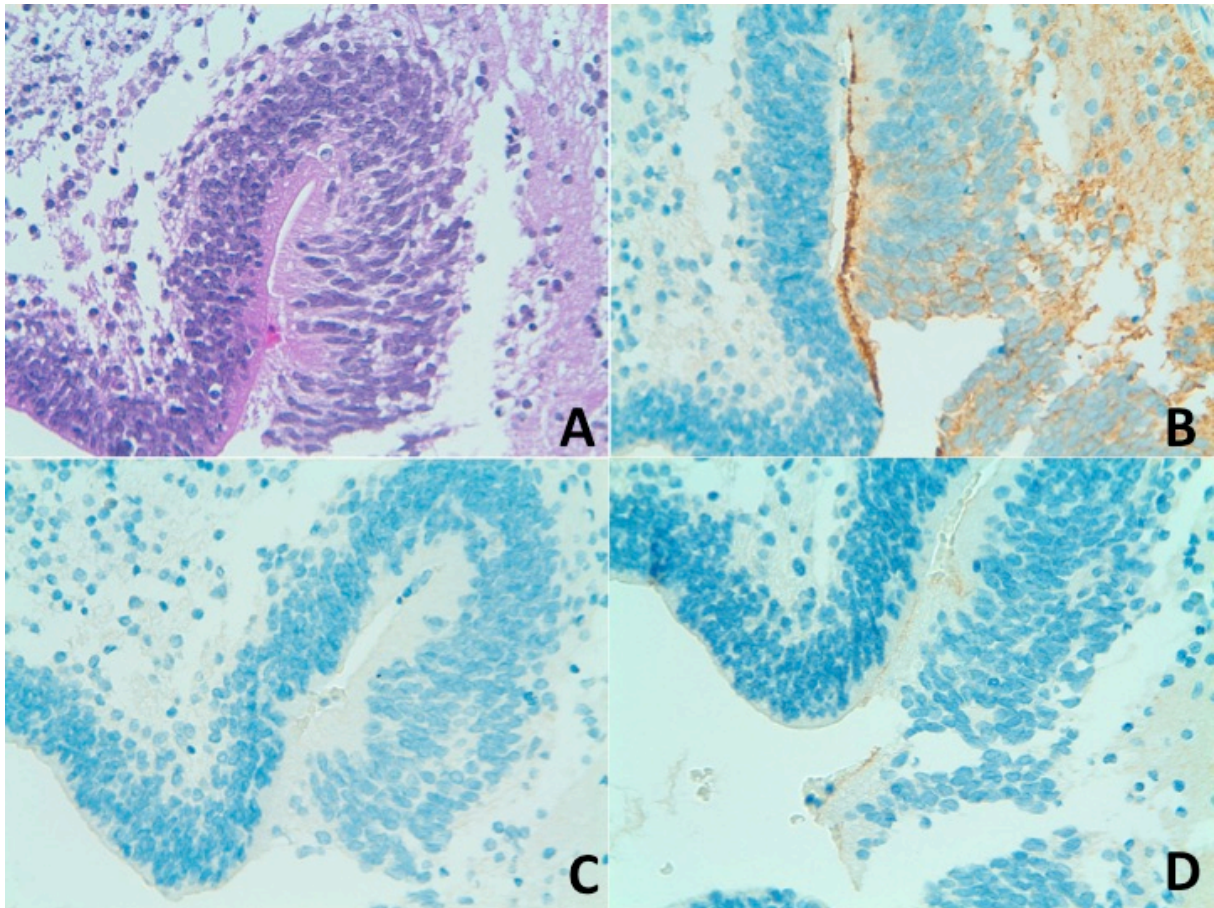


Figure 42. Organe sous-commissural (OSC) foetal et expression des claudines (Grossissement x 400)

A- OSC (coloration HPS) : structure épendymaire épaisse formée d'un neuroépithélium aux noyaux pseudostratifiés et au pôle apical bien développé.

B- Expression apicale et punctiforme de CLDN1 au niveau de l'OSC foetal.

C- Absence d'expression de CLDN2 au niveau de l'OSC foetal.

D- Expression apicale et punctiforme de CLDN3 au niveau de l'OSC foetal. L'intensité est ici plus faible comparée à l'immunomarquage anti-CLDN1.

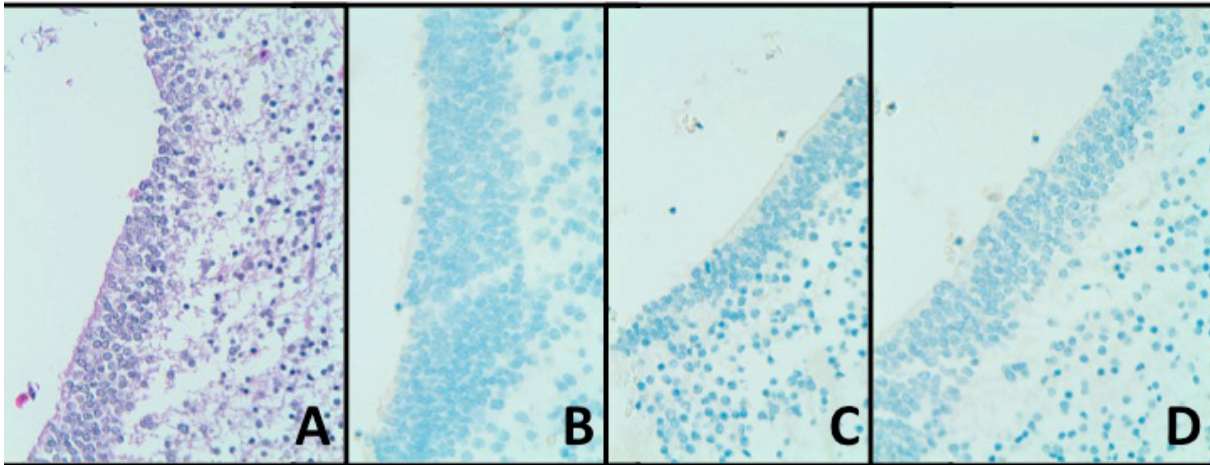


Figure 43. Ependyme fœtal et expression des claudines (Grossissement x 400)

A- Ependyme fœtal (Coloration HPS) : neuroépithélium pseudotratifié sans pôle apical très développé.

B- Absence d'expression de CLDN1 dans le neuro-épendyme fœtal.

C- Absence d'expression de CLDN2 dans le neuro-épendyme fœtal.

D- Absence d'expression de CLDN3 dans le neuro-épendyme fœtal.

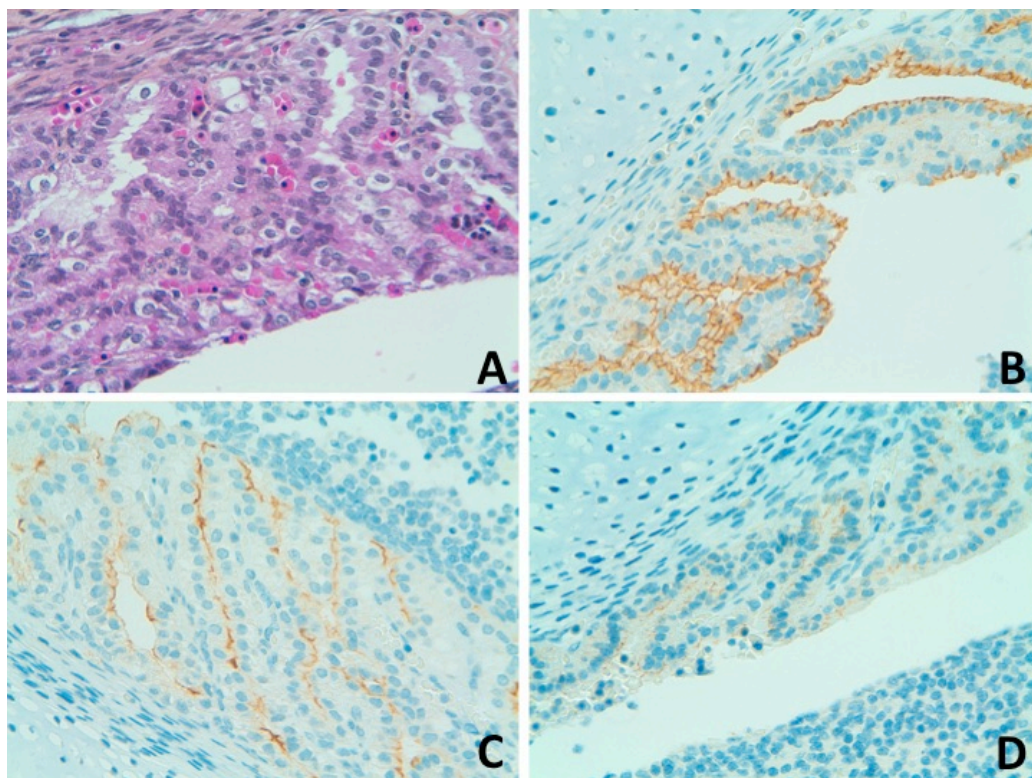


Figure 44. Plexus choroïdes et expression des claudines (Grossissement x 400)

A- Plexus choroïdes fœtaux du 4^{ème} ventricule (Coloration HPS).

B- Expression apico-latérale de CLDN1 dans l'épithélium choroïdien.

C- Expression apico-latérale de CLDN2 dans l'épithélium choroïdien.

D- Expression apico-latérale de CLDN3 dans l'épithélium choroïdien.

Les résultats sont résumés dans le **tableau 11 page 143**.

6) Expression des claudines (CLDN) dans différentes tumeurs périventriculaires

Dans les tumeurs papillaires de la région pinéale (TPRP), CLDN1 était exprimée dans 76% des cas (Fig.45A à C). L'expression restait toujours focale. L'expression de CLDN1 était localisée à la jonction apico-latérale de cellules formant des tubes de petite ou grande taille et/ou au niveau du pôle vasculaire des papilles (Fig.45A et B). Dans les zones solides, un immunomarquage en « anneau » ou en « dot » paranucléaire pouvait être identifié dans certains cas (Fig.45C). Aucun cas de TPRP ne présentait d'immunoréactivité avec l'anti-CLDN2 (Fig.45D). CLDN3 était exprimée dans 42% des cas dans une localisation superposable à CLDN1 mais avec une intensité plus faible.

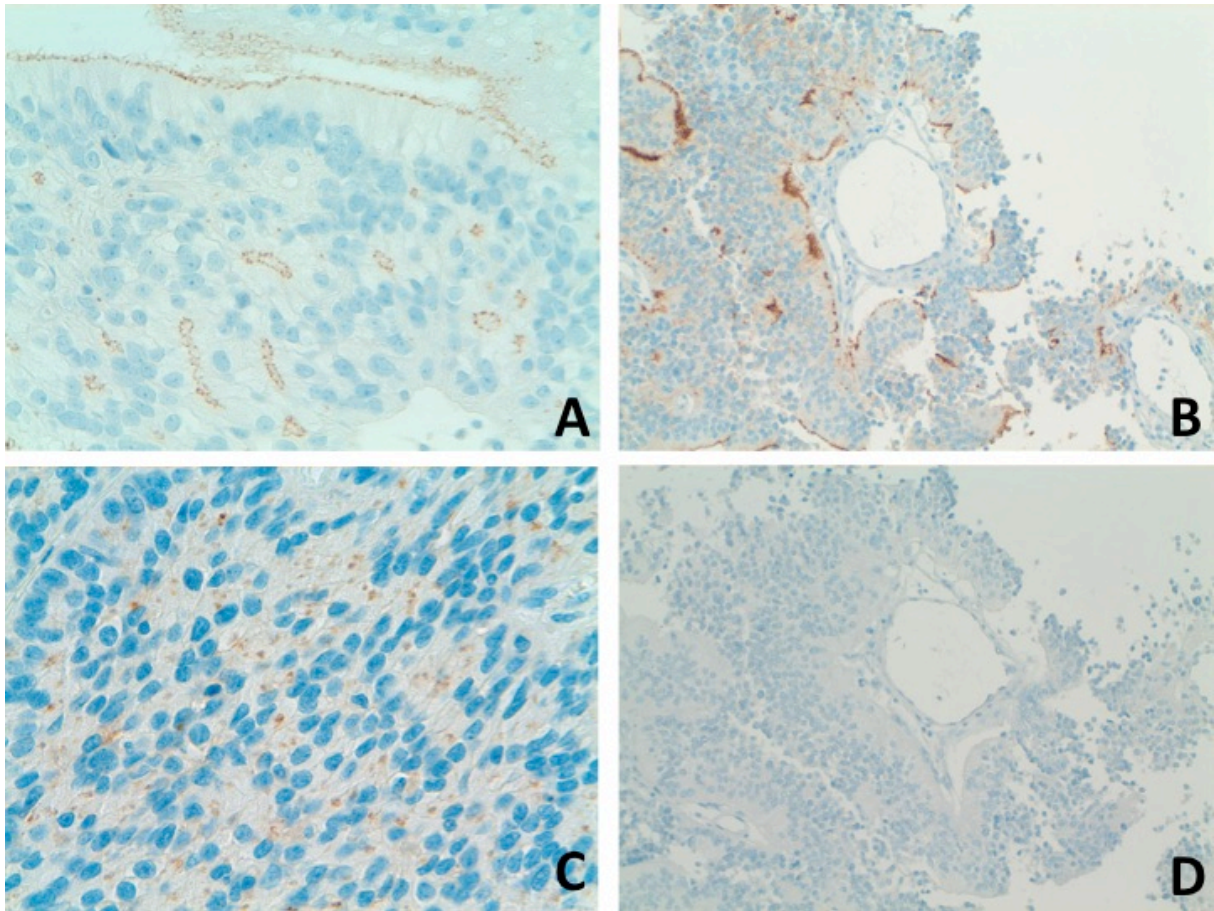


Figure 45. Immunomarquages anti-CLDN1 et anti-CLDN2 dans les TPRP

A- Expression de CLDN1 au pôle apical des tubes de grande taille et des vraies rosettes (Grossissement original X 400).

B- Expression de CLDN1 au niveau du pôle vasculaire des papilles (Grossissement original X 200).

C- Expression cytoplasmique de CLDN1 sous forme de « dot » paranucléaire dans les cellules tumorales (Grossissement original X 600).

D- Absence d'expression de CLDN2 dans une TPRP (Grossissement original X 200).

CLDN1 était exprimée dans les 4 cas d'épendymomes. L'immunopositivité pouvait être identifiée au pôle apical de tubes (Fig.46A) ou sous forme d'« anneau » ou « dot » paranucléaire (Fig.46B). Aucune expression de CLDN1 n'a été identifiée au pôle vasculaire des pseudorosettes périvasculaires (Fig.46C). CLDN2 n'était pas exprimée (Fig.46D) et CLDN3 faiblement positive dans un seul cas.

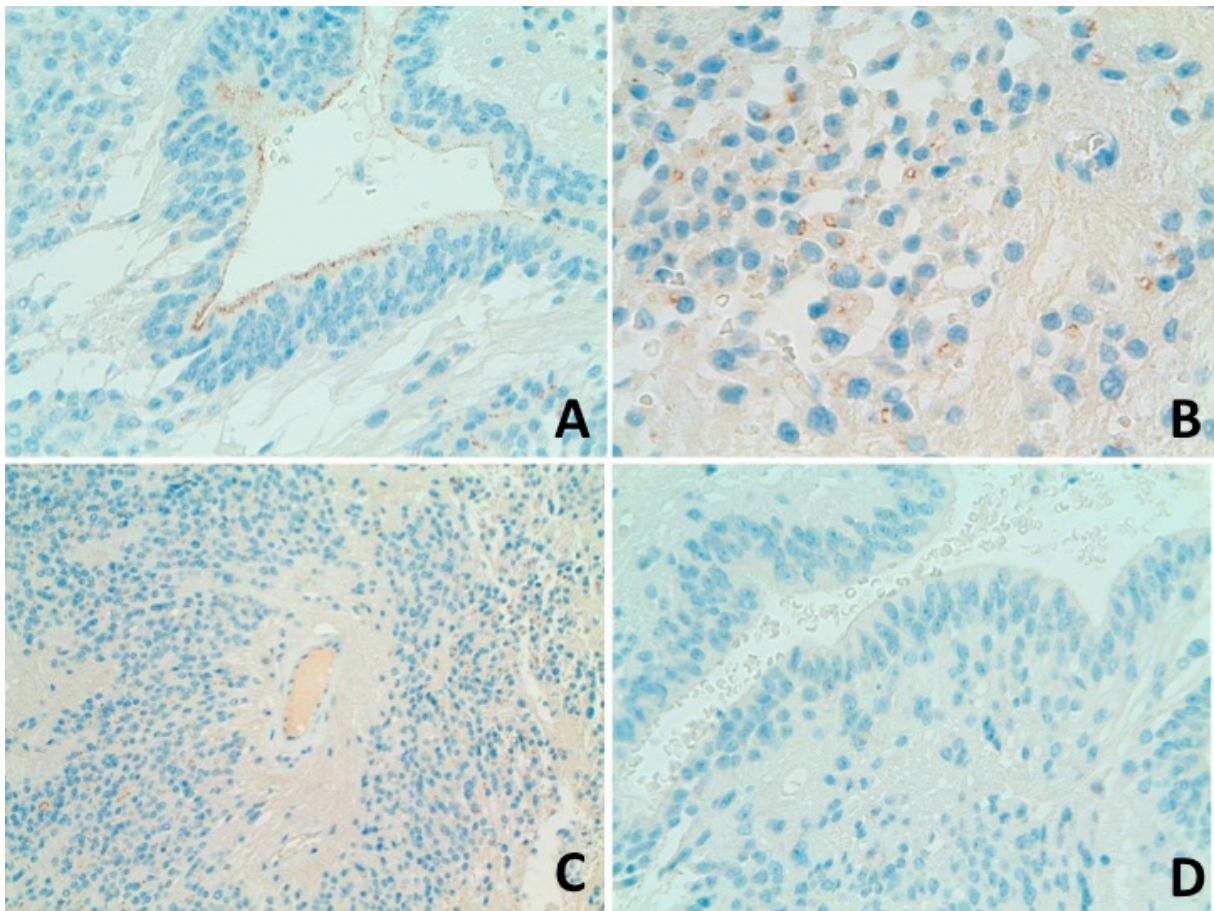


Figure 46. Immunomarquages anti-CLDN1 et anti-CDLN2 dans les épendymomes (
A- Expression de CLDN1 au pôle apical d'un tube épendymaire (Grossissement original X 400).
B- Expression de CLDN1 sous forme de « dot » et micro-lumière paranucléaire dans les cellules tumorales d'un épendymome (Grossissement original X 600).
C- Absence d'expression de CLDN1 au pôle vasculaire d'une pseudorosette périvasculaire (Grossissement original X 200).
D - Absence d'expression de la CLDN2 dans un épendymome (Grossissement original X 400).

Dans les papillomes des plexus choroïdes, les 3 claudines étaient exprimées dont CLDN2. La localisation était typique de jonctions serrées avec une distribution apico-latérale entre les cellules tumorales (Fig.47).

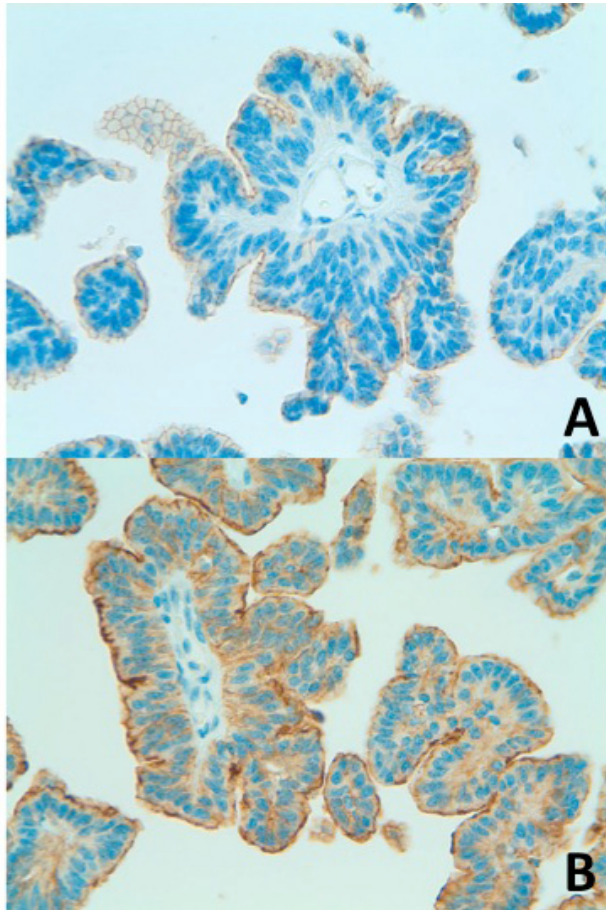


Figure 47- Immunomarquages anti-CLDN1 et anti-CLDN2 dans les papillomes des plexus choroïdes

A- Expression apico-latérale de CLDN1 au niveau d'une papille tumorale (Grossissement original x 400)

B- Forte expression de CLDN2 au niveau d'une papille tumorale (Grossissement original 400)

| | TPRP | Ependymome | Tumeurs plexuelles | Foetus | | |
|-------|------|------------|--------------------|--------|----------|----|
| | | | | OSC | Ependyme | PC |
| CLDN1 | + | + | + | + | 0 | + |
| CLDN2 | 0 | 0 | + | 0 | 0 | + |
| CLDN3 | +/- | +/- | + | +/- | 0 | + |

Tableau 11. Résumé des données immunohistochimiques des claudines 1, 2 et 3 sur les tissus tumoraux et fœtaux.

L'intensité du marquage a été quantifiée selon les critères suivants : 0 quand absent, +/- quand faible, + quand fort. Abréviations : CLDN (claudine), OSC (organe sous-commissural), PC (plexus choroïdes), TPRP (tumeur papillaire de la région pinéale).

7) DISCUSSION

1) Organe sous-commissural humain et développement

L'organe sous-commissural (OSC) est une structure épendymaire spécifique présente chez les vertébrés et faisant partie de la famille des organes circumventriculaires (OCV). Il présente la caractéristique d'être inclus entre 2 barrières: une barrière située à l'interface avec le LCR (épendyme spécialisé) et une barrière située à l'interface avec le sang (BHE) (Rodríguez EM et al, 1998). Sur le plan ultrastructural, la barrière épendymaire est caractérisée par des jonctions serrées, formant un obstacle physique entre le LCR et le tissu nerveux constitutif de l'OSC. En accord avec les données de microscopie électronique, l'expression de protéines de jonctions serrées telles que l'occludine, ZO-1 et CLDN1 a été montrée par immunofluorescence chez la souris adulte (Petrov T et al, 1994 ; Langlet F et al, 2013). Cette barrière épendymaire est aussi retrouvée dans d'autres OCV chez la souris comme l'éminence médiane, l'organe sous-fornical et l'area postrema. Au niveau de ces organes, la couche épendymaire est constituée de cellules « tancytiques » caractérisées par une absence de cils à leur pôle apical et un prolongement cytoplasmique basal étendu se connectant en profondeur avec le réseau de capillaires fenêtrés de l'OCV (Langlet F et al, 2013). La définition de « tancyte » n'est pas très homogène dans la littérature. En général, le tancyte est défini comme une cellule de nature gliale, très allongée, présentant une connexion avec le ventricule et le LCR d'un côté et les vaisseaux ou la surface du parenchyme cérébral de l'autre (Lehman NH, 2008a). Sous ce nom générique ont été désignées la glie radiaire, les cellules épendymaires des OCV et les cellules épendymaires fœtales. Comparé aux autres OCV, l'OSC constitue une exception. Bien qu'il partage une expression de CLDN1 au pôle apical de la couche épendymaire, il n'est pas connecté à des capillaires fenêtrés et

présentent des caractéristiques sécrétoires. Chez l'homme, l'OSC atteint son plein développement durant la vie fœtale mais régresse à la naissance, ne persistant qu'à l'état vestigial chez l'adulte (Rodríguez EM et al, 2001 ; Castañeyra-Perdomo A et al, 2004). Ceci limite la « fenêtre » d'étude de l'OSC humain au stade fœtal, stade qui a été choisi dans notre analyse.

Si la présence de jonctions serrées sur le plan ultrastructural a été montré chez le fœtus humain (Rodríguez EM et al, 2001), la caractérisation moléculaire de ces jonctions, elle, n'est pas connue. L'expression de CLDN1 et de CLDN3 au pôle apical de l'OSC conforte la présence de jonctions serrées dans cet OCV chez le fœtus humain. CLDN2 n'est pas exprimée à ce niveau. De plus, l'expression des claudines est restreinte à l'OSC et ne s'étend pas au neuro-épendyme classique contigu. L'absence des 3 claudines étudiées dans le neuro-épendyme classique est cohérente avec les données de la littérature. Chez l'adulte, les épendymocytes sont reliés par des jonctions adhérentes impliquant notamment la N-Cadhérine mais ne présentent pas de jonctions serrées (Jiménez AJ et al, 2014). Néanmoins, chez l'embryon et le fœtus, le neuroépithélium correspondant au futur épendyme et situé à la jonction entre le LCR et le parenchyme cérébral se caractérise par la présence d'un système jonctionnel particulier appelé « strap junctions » ou jonctions « en bretelles ». Ces jonctions se différencient des jonctions serrées classiques par leur structure « monobrin » et leur orientation perpendiculaire à la surface ventriculaire (Møllgård K et al, 1987). Les jonctions serrées « classiques » se différencient par une structure « multi-brins » et une organisation circonférentielle « en ceinture » au pôle ventriculaire. Chez l'homme, les « strap junctions » sont identifiables en microscopie électronique au stade embryonnaire. Elles sont moins proéminentes à 16 SA et ont disparu à 22 SA (Møllgård K and Saunders NR, 1986). Une étude a analysé l'expression d'ARNm de différentes molécules jonctionnelles

dans la zone ventriculaire latérale de souris à l'âge E17/E18 par séquençage ARN (Whish S et al, 2015). Cette étude suggère que CLDN5 rentrerait dans la composition des « strap junctions ». Une étude immunohistochimique complémentaire utilisant un anticorps polyclonal de lapin anti-CLDN5 (abcam ab15106) montrait une positivité attendue dans les microvaisseaux ainsi qu'une positivité plus faible au bord apical du neuroépithélium. Dans notre étude, portant sur des stades de développement où les jonctions « strap » sont normalement présentes, les immunomarquages anti-CLDN1, 2, 3 et 5 étaient négatifs au niveau du neuroépithélium ce qui rend les précédents résultats discutables. Le caractère polyclonal de l'anticorps utilisé et la présence de microvaisseaux CLDN5+ dans la zone ventriculaire prélevée pour analyse RNAseq pourraient expliquer les résultats obtenus dans cette étude.

2) Origine des TPRP

Les TPRP font partie des tumeurs se développant dans la région pinéale. Parmi ces tumeurs, les plus fréquentes sont les tumeurs germinales et les tumeurs du parenchyme pinéal (TPP) (Fèvre-Montange M et al, 2010). Les tumeurs germinales, qui récapitulent le spectre du développement embryo-fœtal et de ses annexes, seraient issues d'une cellule germinale primordiale cancérisée ectopique. Cette cellule aurait migré de manière anormale dans la région pinéale au lieu de s'arrêter dans les futures gonades (Vasiljevic A et al, 2015). Les TPP, elles, partagent des caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques communes avec les cellules constitutives de la glande pinéale, les pinéaloctes.

Le développement stéréotypé des TPRP dans la région pinéale a immédiatement suggéré une origine de ces tumeurs à partir d'une structure spécifique à cette région (Jouvet A et al, 2003).

- **Une origine à partir du parenchyme pinéal (pinéaloctes) ?**

Le pinéaloctes est une cellule neurosensorielle modifiée présentant encore certaines caractéristiques ultrastructurales rappelant la rétine telles que des cils de type (9+0) et des rubans synaptiques (Jouvet A et al, 1994). Elle présente aussi une fonction neurosécrétoire (sécrétion de mélatonine) comme le montre l'identification de vésicules à cœur dense dans son cytoplasme. Sur le plan immunohistochimique, la glande pinéale normale exprime des marqueurs neuronaux et neuroendocrines comme la synaptophysine et les neurofilaments et de façon très variable la chromogranine A (Jouvet A et al, 1994 ; Scheithauer BW, 1999). Ces éléments caractéristiques sont identifiés à des degrés variables dans les TPP. Les caractéristiques ultrastructurales des TPP ne sont pas concordantes avec une origine pinéaloctaire. En immunohistochimie, la TPP peut présenter une faible positivité avec l'anti-synaptophysine dans 32% mais cette dernière semble plus correspondre à un bruit de fond qu'à une immunopositivité significative.

- **Une origine épendymaire classique ou épendymaire spécialisé (OSC) ?**

La glande pinéale est en contact en avant avec l'épendyme du 3^{ème} ventricule au niveau d'une expansion « en doigt de gant » nommé récessus pinéal. Elle est aussi dans le voisinage de l'OSC qui borde la commissure postérieure. Sur le plan ultrastructural, les épendymocytes classiques sont caractérisés par un pôle apical riche en cils et sont reliés par des jonctions adhérentes. Le revêtement épendymaire de l'OSC, lui, est constitué de cellules dont l'apex contient des microvillosités mais très peu de cils. Les cellules sont reliées entre elles par des complexes jonctionnels comprenant des jonctions serrées (Rodríguez EM et al, 2001).

Sur le plan ultrastructural, les épendymomes présentent des caractéristiques proches des épendymocytes classiques : jonctions adhérentes, filaments intracytoplasmiques,

villosités et cils. Ils peuvent aussi présenter des micro-lumières intracytoplasmiques bordées de microvillosités et de cils et contenant un matériel protéinacé. Ces micro-lumières sont à l'origine des aspects en « dot » ou « anneau » paranucléaire observés en immunohistochimie avec l'anti-EMA. Les TPRP partagent beaucoup de ces éléments mais se caractérisent aussi par des éléments sécrétoires.

Les immunomarquages anti-claudines ne diffèrent pas sensiblement entre les TPRP et les épendymomes testés avec des positivités variables pour l'anti-CLDN1 et l'anti-CLDN3. De manière intéressante, les marquages sont focaux et cantonnés à des structures très différenciées comportant une lumière visible (tubes et « vraies » rosettes) ou non (« dot » ou « anneau » paranucléaire). L'identification de ces structures dans les TPRP, associée à la positivité de CLDN1 et CLDN3, est compatible avec l'hypothèse d'une origine à partir de l'OSC. En effet l'OSC est une structure épendymaire spécialisée avec jonctions serrées et expression de CLDN1 et CLDN3. Néanmoins, que penser de ces éléments, même focaux, dans les épendymomes qui sont censés récapituler l'épendymocyte classique et ses jonctions adhérentes ? La mise en évidence d'une expression focale de protéines de jonctions serrées dans ces tumeurs pourrait signifier que les épendymomes, même « classiques » pourraient présenter une différenciation de type « tancytique » comme au niveau des OCV. Le croisement des anticorps anti-claudines avec les jonctions adhérentes est peu probable car le neuro-épendyme n'a jamais montré de positivité dans notre étude. Il est aussi intéressant de noter que les structures appelées pseudo-rosettes périvasculaires, dans lesquelles les cellules tumorales s'arrangent radialement autour des vaisseaux, pourraient être considérées comme une marque de différenciation tancytique puisque ces cellules présentent un angiotropisme avec connexion vasculaire (Lehman NL, 2008b).

Les épendymomes et les TPRP sont donc très proches et il est légitime de questionner la séparation de la TPRP comme une entité à part. Dans une étude récente en collaboration avec l'équipe du Dr Sandro Santagata (Harvard, Etats-Unis), nous avons montré que les TPRP et l'OSC fœtal humain exprimaient le facteur de transcription FOXJ1 (Coy S et al, 2017). FOXJ1 est un facteur de transcription impliqué dans le processus de ciliogenèse. Il est exprimé dans l'épendyme où les épendymocytes présentent de nombreux cils. Ce résultat reste en accord avec une différenciation épendymaire de la tumeur et une origine potentielle aux dépens de l'OSC. Contrairement à FOXJ1, le facteur de transcription CRX n'était pas exprimé dans les TPRP ni dans l'OSC. CRX est un facteur de transcription impliqué dans le développement des lignées rétiniennes et pinéalo-cytaire. Son expression est identifiée dans les pinéalo-cytes de la glande pinéale normale et dans toutes les tumeurs du parenchyme pinéal. La négativité de CRX dans les TPRP ne soutient pas l'hypothèse du développement de ces tumeurs à partir de la glande pinéale elle-même.

Mais la TPRP ne correspond pas non plus à un épendymome classique. Dans une étude collaborative avec l'équipe du Pr Martin Hasselblatt (Münster, Allemagne), nous avons montré que les TPRP sont groupées séparément des épendymomes par analyse de leur méthylome (Heim S et al, 2016).

Afin de préserver ses particularités tout en soulignant son appartenance à la famille des épendymomes, le terme de SCOPE (Subcommissural Organ Papillary Ependymoma) a été proposé (Coy S et al, 2017).

3) Utilité des claudines dans le diagnostic différentiel des TPRP

Les principaux diagnostics différentiels des TPRP sont les épendymomes et les tumeurs des plexus choroïdes. Dans cette étude, les épendymomes et les TPRP partageaient un

profil commun (CLDN1+/CLDN3+) alors que les tumeurs plexuelles (papillomes typiques et atypiques) exprimaient CLDN2 en plus de CLDN1 et CLDN3. Seule l'utilisation de CLDN2 apparaît donc intéressante dans le diagnostic différentiel des TPRP pour éliminer un papillome atypique des plexus choroïdes.

Depuis la publication de notre travail, une étude a exploré l'expression de différentes claudines (CLDN 2-5, 7 et 10) dans les épendymomes (Nordfords K et al, 2013). Cette étude incluait 61 épendymomes et contrairement à nos résultats montrait une expression de CLDN2 dans 42% des cas testés. Néanmoins le clone affiché dans la section matériel et méthodes (JAY.8) est celui de CLDN1, non de CLDN2 (MH44) ce qui rend ces résultats douteux. Dans cette même étude, les épendymomes supratentoriels exprimaient volontiers CLDN5. Dans une étude plus récente (Viràg J et al, 2017), une expression de CLDN5 était identifiée dans 45% des épendymomes supratentoriels. Il n'y avait pas d'expression dans les épendymomes de la fosse cérébrale postérieure. Dans les épendymomes supratentoriels, l'expression de CLDN5 était un marqueur de meilleur pronostic.

Dans notre série de tumeurs périventriculaires, l'expression de CLDN5 était comparable à CLDN1 (résultats non-montrés).

En résumé, l'OSC humain exprime des protéines de jonctions serrées incluant CLDN1 et CLDN3. Ceci confirme les données identifiées dans le modèle murin. Les données radiologiques, ultrastructurales et immunohistochimiques présentées sont compatibles avec l'hypothèse de l'origine des TPRP à partir de l'OSC. Les anticorps anti-claudines seuls ne permettent pas un diagnostic spécifique de TPRP. Néanmoins, l'utilisation de l'anti-CLDN2 pourrait avoir une utilité dans le diagnostic des tumeurs des plexus choroïdes.

Résultats Etude 4

ETUDE 4 : Analyse de l'expression d'enzymes de détoxification dans l'encéphale foetal humain

Introduction :

En plus des jonctions serrées, les mécanismes de neuroprotection du SNC comprennent des transporteurs d'efflux et des enzymes de détoxification. L'expression de ces enzymes au cours du développement cérébral chez l'homme est mal connue.

Questions :

Des enzymes de détoxification comme l'époxyde hydrolase sont exprimées dans les plexus choroïdes chez l'adulte. Ces enzymes sont-elles exprimées au cours du développement ?

Objectifs :

- 1) Analyser par immunohistochimie l'expression de différentes enzymes de détoxification chez le fœtus humain à 22 SA.
- 2) Evaluer l'intensité de l'immunomarquage et sa localisation dans le SNC (neuro-épendyme, cortex, plexus choroïdes, zone sous-ventriculaire, capillaires).

Résultats ETUDE 4

L'objectif de cette étude descriptive était d'explorer par immunohistochimie la présence d'enzymes de détoxification dans l'encéphale fœtal humain. Cette analyse immunohistochimique préliminaire a porté sur le ventricule latéral d'un fœtus humain à 22 SA. Pour l'époxyde hydrolase microsomale (EPHX1), un stade plus tardif dans le développement a été analysé (2 mois et 17 jours). Pour l'EPHX1 et la glutathion peroxydase de type 1 (GPx1), le plexus choroïde du 4^{ème} ventricule était disponible pour analyse. L'ensemble des données est résumé dans le tableau 12, page 154.

1) Epoxyde hydrolase microsomale (EPHX1)

A 22 SA, une expression cytoplasmique périphérique, forte, d'EPHX1, à prédominance apicale, était identifiée au niveau de l'épithélium choroïdien du ventricule latéral (Fig.48A). Les macrophages du stroma étaient aussi fortement positifs. Les cellules du stroma lui-même étaient marquées mais plus modérément. Dans le 4^{ème} ventricule, l'expression d'EPHX1 dans l'épithélium choroïdien était cytoplasmique et homogène (Fig.48C). L'expression épendymaire et capillaire d'EPHX1 était peu significative.

A 2 mois et 17 jours, l'expression cytoplasmique épithéliale d'EPHX1 au niveau du plexus choroïde du ventricule latéral était toujours très forte mais de distribution plus homogène dans le cytoplasme (Fig.48B). Dans le 4^{ème} ventricule, l'immunopositivité choroïdienne était similaire. Les positivités épendymaire et capillaire étaient faibles. Les astrocytes différenciés exprimaient faiblement EPHX1 (Fig.48D). Dans tous les cas, il n'y avait pas d'expression dans les neurones corticaux.

2) Glutathion peroxydase (GPx1)

A 22 SA, il existait une expression cytoplasmique forte, à prédominance périphérique, de GPx1 par l'épithélium des plexus choroïdes du ventricule latéral (Fig.49A). Il s'y associait une expression nucléaire variable d'allure non-spécifique. Des cellules de nature indéterminée, situées dans la zone sous-ventriculaire, étaient aussi fortement positives. Il existait une expression de faible intensité dans le neuro-épendyme et les capillaires cérébraux.

Dans le 4^{ème} ventricule, l'expression cytoplasmique de GPx1 dans l'épithélium choroïdien était homogène (Fig.49C). Il n'y avait pas d'expression dans les neurones corticaux.

3) Glutathion Réductase (GR)

A 22 SA, seule une expression modérée au niveau de l'épithélium choroïdien et des macrophages du stroma ont été mises en évidence (Fig.49B). Il n'y avait pas d'expression dans les neurones corticaux. Des cellules de nature indéterminée, situées dans la zone sous-ventriculaire, étaient très faiblement positives.

4) Glutathion-S-transférase (GST) mu1/2

A 22 SA, l'épithélium du plexus choroïde du ventricule latéral présentait une expression cytoplasmique hétérogène d'intensité modérée de GST mu1/2, associée à une positivité nucléaire d'allure non-spécifique. L'expression dans les capillaires cérébraux était de même intensité. L'expression linéaire au niveau du neuro-épendyme a été interprétée

comme un effet de bord non-spécifique. Il n'y avait pas d'expression dans les neurones corticaux.

5) Glutathion-S-transférase (GST) mu5

A 22 SA, seule une expression modérée au niveau de l'épithélium choroïdien et une expression faible au niveau du stroma ont été mises en évidence (Fig.49D). Il n'y avait pas d'expression dans les neurones corticaux.

| | | Plexus choroïdes (VL) | Ependyme | Capillaires | Cortex | Autre |
|------------------|---------------|--|-------------------------|--------------------|---------------|--|
| EPHX1 | 22 SA | Epithélium +++ (apical) Stroma ++ Macrophages +++ | ± | ± | - | - |
| | 2 mois | Epithélium +++ (cytoplasmique) Stroma ++ Macrophages plus rares ++ | + | + | - | + astrocytes |
| GPX1 | 22 SA | Epithélium +++ (périphérique, nucléaire variable) Stroma - Macrophages +++ | + | + | - | Quelques cellules +++ notamment dans la zone sous-ventriculaire |
| GR | 22 SA | Epithélium (périphérique) ++ Macrophages ++ | - | - | - | Rares cellules + dans la zone sous-ventriculaire |
| GST mu1/2 | 22 SA | Epithélium ++ (périphérique, nucléaire) Stroma - Macrophages ++ | Linéaire non-spécifique | ++ | - | Quelques cellules faiblement marqués dans la zone sous-ventriculaire (+) |
| GST mu5 | 22 SA | Epithélium ++ (périphérique) Stroma + | - | - | - | - |

Tableau 12- Analyse immunohistochimique des enzymes Epoxyde hydrolase microsomale (EPHX1), Glutathion peroxydase (GPx1), Glutathion Réductase (GR) et Glutathion-S-transférases (GST) mu1/2 et mu5 dans le cerveau humain. Abréviations: VL: ventricule latéral; SA: semaines d'aménorrhée; expression immunohistochimique négative (-), peu significatif (±), faible (++) et forte (+++).

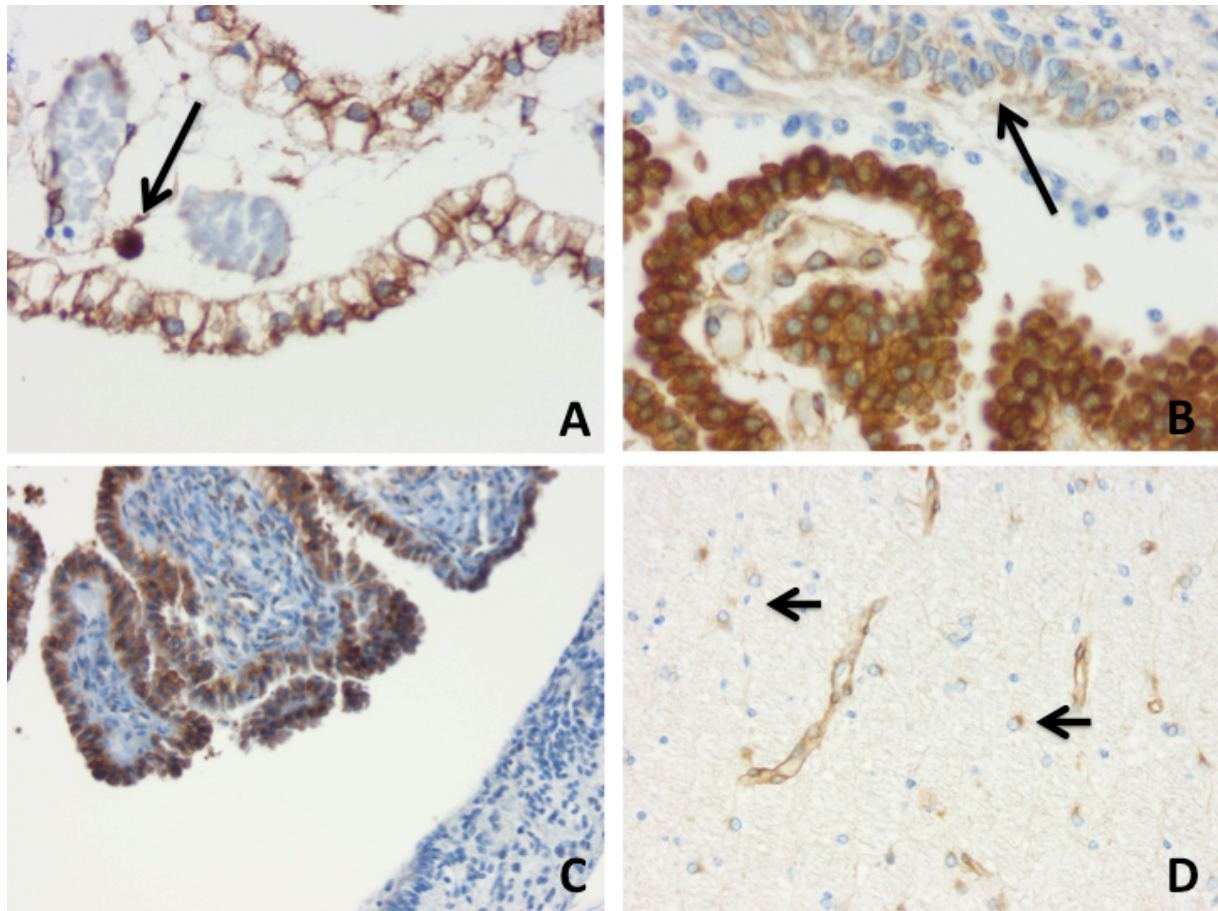


Figure 48. Expression de EPHX1 chez le fœtus à 22 SA et chez le nourrisson de 2 mois.

A- Expression d'EPHX1 dans le cytoplasme de l'épithélium choroïdien à 22 SA (ventricule latéral, grossissement x 400). Cette expression est périphérique avec renforcement apical. Un macrophage fortement positif situé dans le stroma est indiqué par une flèche.

B- Expression d'EPHX1 dans le cytoplasme choroïdien à 2 mois (grossissement x 400). Cette expression est plus homogène. Des épendymocytes faiblement positifs sont indiqués par une flèche.

C- Expression d'EPHX1 dans le cytoplasme de l'épithélium choroïdien à 22 SA (4^{ème} ventricule, grossissement x 200). Contrairement au plexus choroïde du 4^{ème} ventricule, cette expression est homogène.

D- Expression d'EPHX1 dans le tissu nerveux à 2 mois (grossissement x 200). Les vaisseaux et les astrocytes (flèches) sont faiblement positifs.

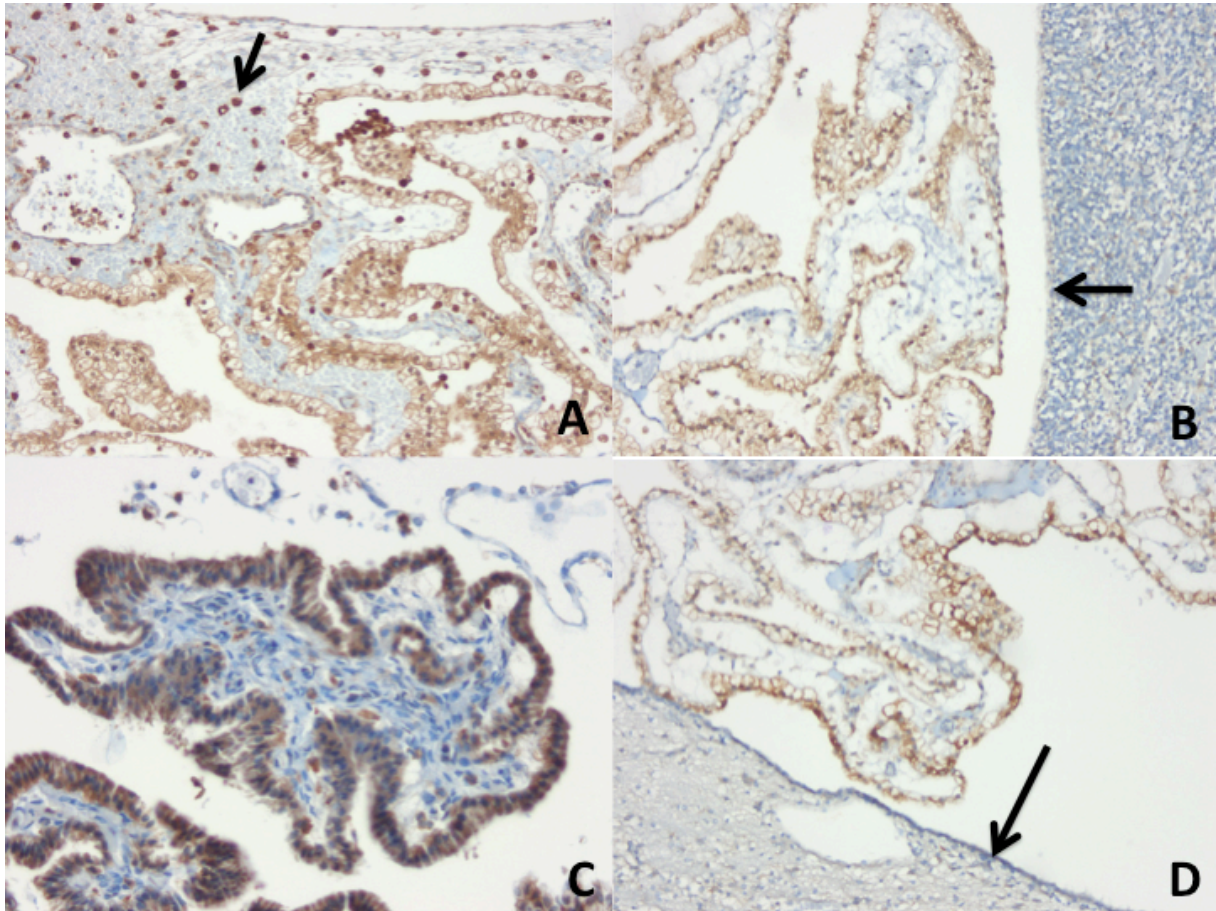


Figure 49. Expression de GPx1, de GR et de GST mu5 chez le fœtus à 22 SA.

A- Expression de GPx1 dans le cytoplasme de l'épithélium choroïdien à 22 SA (ventricule latéral, grossissement x 100). Cette expression est périphérique avec renforcement apical. Un macrophage fortement positif situé dans le stroma est indiqué par une flèche.

B- Expression de GR dans le cytoplasme choroïdien à 22 SA (ventricule latéral, grossissement x 100). Cette expression est modérée de distribution périphérique. Il n'y a pas d'expression significative au niveau du neuro-épendyme (flèche).

C- Expression de GPx1 dans le cytoplasme de l'épithélium choroïdien à 22 SA (4^{ème} ventricule, grossissement x 200). Contrairement au plexus choroïde du 4^{ème} ventricule, cette expression est homogène.

D- Expression de GST mu5 dans le cytoplasme choroïdien à 22 SA (ventricule latéral, grossissement x 100). Cette expression est modérée et de distribution périphérique. Il n'y a pas d'expression significative au niveau du neuro-épendyme (flèche).

6) DISCUSSION

Ces résultats préliminaires montrent une expression de différentes enzymes de détoxification et enzymes anti-oxydantes dans le système nerveux central du fœtus humain. Cette expression est majoritairement située dans les plexus choroïdes même si une analyse complète d'autres régions cérébrales à différents stades de développement sera nécessaire pour valider cette constatation. Cette étude devra être étendue à d'autres enzymes de détoxification comme les sulfo-transférases. L'expression de ces enzymes dans le neuro-épendyme, les neurones du néocortex ou les capillaires cérébraux de la BHE apparaît absente ou faible. Pour l'EPHX1 et la GPx1, la localisation du marquage au niveau de l'épithélium choroïdien diffère significativement entre le ventricule latéral et le 4^{ème} ventricule à 22 SA. A cet âge, les 2 plexus choroïdes sont morphologiquement très différents avec un épithélium choroïdien très clarifié, riche en glycogène, au niveau du ventricule latéral (Dziegielewska KM et al, 2001). Cette présence du glycogène pourrait expliquer la distribution périphérique du marquage dans l'épithélium choroïdien du ventricule latéral comparativement à la distribution homogène dans le 4^{ème} ventricule qui se rapproche de ce qui est constaté à 2 mois après la naissance. Il est par contre difficile d'attribuer à cette différence certains marquages nucléaires observés pour GPx1 et GSTmu1/2 d'allure non-spécifique.

L'expression de EPHX1 a été rapportée dans les neurones et astrocytes de plusieurs régions du SNC humain adulte tel que le pont, le noyau rouge ou la substance noire (Farin FM et Omiecinski CJ, 1993). La mise en évidence d'une immunopositivité très forte dans les plexus choroïdes de souris (Marowsky A et al, 2009) et d'une activité enzymatique forte dans les plexus choroïdes de rat (Gherzi-Egea J et al, 1994) suggèrent que les plexus choroïdes constituent un élément crucial dans l'action intracérébrale

d'EPHX1 pour le rongeur. Une expression génique d'EPHX1 est également présente dans le plexus choroïde de rat en période de développement à des niveaux comparables à l'adulte dès E19 (Kratzer I et al, 2013). Nos résultats chez le fœtus humain sont concordants avec ces données puisque nous identifions une forte immunoexpression plexuelle d'EPHX1 à ce stade. Cette expression plexuelle est aussi prédominante pour les GST mu1/2 et mu5 et pour GPx1 et GR. Ceci est concordant avec les données du transcriptome chez le plexus choroïde de rat au cours du développement (Kratzer I et al, 2013). Chez le rat, les niveaux d'expression génique des GST mu1 et mu5 étaient élevés et supérieurs en période périnatale, comparés à l'adulte. Le niveau d'expression génique de GPx1 est d'emblée élevé pendant le développement, comparable au niveau identifié chez l'adulte. GR est aussi exprimé durant le développement mais à un niveau plus bas que GPx1. Ces données transcriptomiques confirment les résultats de Tayarani I et collègues qui ont mis en évidence des activités GPx1 et GR dans le plexus choroïde de rat (Tayarani I et al, 1989). Ces données suggèrent que les capacités anti-oxydantes et de détoxification des plexus choroïdes seraient d'installation précoce au cours du développement. Les plexus choroïdes pourraient ainsi jouer un rôle majeur dans la protection de l'encéphale en développement contre différents types d'agression comme l'hypoxie-ischémie ou l'inflammation au cours desquelles des dérivés actifs de l'oxygène sont produits. Ils pourraient également protéger l'encéphale contre l'exposition à des agents chimiques tels que différents médicaments, composés cytotoxiques, carcinogènes ou génotoxiques, polluants environnementaux et additifs alimentaires. La barrière sang-LCR « enzymatique » devrait donc jouer un rôle essentiel dans la prévention des anomalies de développement du SNC induites par des agents chimiques.

DISCUSSION GENERALE

I - L'interface sang-cerveau (plexus choroïde) au cours du développement : barrière immature ou complexe hautement régulé ?

Dans notre travail, nous avons étudié 2 aspects de la barrière sang-LCR (plexus choroïdes) : sa composante physique par l'intermédiaire des jonctions serrées et de leur composition en claudines et sa composante « enzymatique » par l'analyse de différentes enzymes anti-oxydantes et de détoxification. Cette analyse s'est centrée sur la période embry-fœtale. En effet, la vision de l'interface sang-LCR chez le fœtus a récemment évoluée (Johansson PA et al, 2008 ; Saunderson NR et al, 2006). Longtemps considérée comme immature et fuyarde, cette barrière apparaît maintenant comme une structure d'emblée « continente » et fonctionnelle dès les stades précoces du développement. Ce caractère organisé dès le début de la formation de l'encéphale suggère une importance capitale du maintien d'un microenvironnement intracérébral propice à la corticogénèse et à la gliogénèse. Il traduit aussi probablement la nécessité d'assurer une neuroprotection efficace du SNC en développement car les conséquences d'une agression à cet âge sont dramatiques.

Nous montrons dans nos travaux que les plexus choroïdes de rat expriment CLDN1, CLDN2 et CLDN3 au cours du développement. Ces résultats ont été récemment confirmés chez la souris (Steinemann A et al, 2016). Il est intéressant de noter ici que ces auteurs n'identifient pas de CLDN3 dans les capillaires cérébraux. Ce résultat est concordant avec le profil d'expression de CLDN3 que nous avons mis en évidence chez le fœtus humain. Par contre, il est discordant avec nos résultats chez le rat où une faible expression de CLDN3 était identifiée dans les capillaires cérébraux. Comme discuté préalablement, ceci peut être expliqué par une variation inter-espèces, un manque de sensibilité de l'immunomarquage anti-CLDN3 chez l'homme ou au contraire un

marquage non-spécifique chez le rat. Comme chez le rat, une expression endothéliale de CLDN3 a été montrée chez la souris (Mullier A et al, 2010). L'expression de CLDN3 au niveau de la BHE n'est donc pas claire et nécessite d'être confirmée.

La mise en évidence d'enzymes de détoxification comme les glutathion-S-transférases (GST)mu1/2 et mu5 au niveau des plexus choroïdes suggère un rôle protecteur des plexus contre des agressions toxiques chez le fœtus humain. Chez le fœtus humain et chez le raton, il existe une activité GST-transférase importante dans les plexus choroïdes (Gherzi-Egea J et al, 2006). De plus, la GST-transférase de l'épithélium choroïdien a la capacité de métaboliser une molécule électrophile potentiellement toxique et d'assurer une barrière enzymatique efficace couplée à des transporteurs (Gherzi-Egea J et al, 2006). Dans l'étude 2, une étude de l'expression génique de différentes enzymes de détoxification avait été réalisée à 4h et 24h post-injection d'iboténate au niveau des plexus choroïdes afin d'explorer l'hypothèse d'une surexpression de ces gènes en cas d'agression hypoxo-ischémique. Parmi les enzymes analysées (GST mu1, GST pi1, GPx1, superoxyde dismutase 1, EPHX1 et hème-oxydase), seules GST pi1 et l'hème oxydase étaient augmentées. La présence de GST pi a été montrée dans les plexus choroïdes du fœtus humain (Carder PJ et al, 1990). Nous n'avons pas pu encore le confirmer pour des problèmes techniques liés à l'anticorps. Une étude transcriptomique explorant la fonction neuroprotective du plexus choroïde au cours du développement a été réalisée chez le rat (Kratzer I et al, 2013). De nombreux gènes d'enzymes de détoxification et d'enzymes anti-oxydantes ont été analysés. Parmi eux, une forte expression d'enzymes de phase I (EPHX1), d'enzymes de phase II (UGT1A, SULT1A1, GST alpha4/mu1/mu5/pi1) et d'enzymes anti-oxydantes (GPx1, superoxyde dismutase) était identifiée. L'expression de certains gènes variait entre la période périnatale et l'âge adulte comme pour les GST alpha3 et alpha4 qui étaient exprimées à des niveaux plus

élevés chez l'adulte. L'étude plus précise de ces systèmes de détoxification dans le plexus choroïde fœtal humain est un enjeu important dans le domaine de la neuroprotection.

II- Les claudines : intérêt dans le domaine de la neuropathologie tumorale

Nous avons montré dans l'étude 3, l'intérêt d'utiliser un panel de claudines dans le diagnostic des tumeurs périventriculaires du système nerveux central. Certaines claudines telles que CLDN1 et CLDN6 ont déjà été utilisées dans le passé comme marqueurs tumoraux. CLDN1 a montré un intérêt dans le diagnostic des méningiomes (Takei H et al, 2007). Les méningiomes sont des tumeurs des méninges dont le diagnostic peut être délicat notamment dans leur forme fibroblastique. Les méningiomes fibroblastiques sont formés de cellules fusiformes et il peut être difficile de les différencier d'autres tumeurs à cellules fusiformes comme les hémangiopéricytomes/tumeurs fibreuses solitaires ou les schwannomes vestibulaires. Une immunopositivité de CLDN1 a été identifiée dans environ 53% des méningiomes (Hahn HP et al, 2006) alors que les autres types de tumeurs à cellules fusiformes étaient négatifs. Bien que spécifique dans ce cadre diagnostique, la sensibilité est probablement basse car le pourcentage de méningiomes positifs pour CLDN1 varie de 8% à 85% d'une étude à l'autre (Hahn HP et al, 2006 ; Takei H et al, 2007 ; Soini Y et al, 2010 ; Agaimy A et al, 2014).

Contrairement aux marquages punctiformes de type jonctionnel que nous avons observés dans les tumeurs périventriculaires, le marquage de CLDN1 dans les cellules

méningiomateuses est cytoplasmique. Les méningiomes proviendraient des cellules arachnoïdiennes de « coiffe », qui sont situées au niveau des sinus veineux. Si les cellules arachnoïdiennes superficielles comme vu dans l'introduction, comprennent des jonctions serrées, les méningiomes, eux, ne présentent que des jonctions de type desmosome. L'absence d'immunomarquage jonctionnel pour CLDN1, protéine de jonction serrée, n'est donc pas incohérente. L'expression cytoplasmique de CLDN1 a été montrée pour des tumeurs aussi variées que les sarcomes d'Ewing, les synoviosarcomes ou certains adénocarcinomes colorectaux. Dans ce cadre, l'expression ou la localisation aberrante de CLDN1 dans la cellule tumorale pourrait jouer un autre rôle que sa fonction primaire de barrière physique (Hahn HP et al, 2006). Les claudines peuvent ainsi être surexprimées ou, au contraire, inhibées dans les tumeurs, leur inhibition pouvant par exemple jouer un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse (Turksen K et Troy TC, 2011).

Les tumeurs rhabdoïdes/tératoïdes atypiques (TR/TA) sont des tumeurs pédiatriques se développant dans le SNC (Birks DK et al, 2010). Ces tumeurs sont des néoplasmes embryonnaires très agressifs caractérisés par un pronostic très sombre et par une perte d'expression de la protéine INI1. INI1 est impliquée dans le remodelage de la chromatine et est codée par le gène *SMARCB1* situé sur le chromosome 22. La claudine 6 (CLDN6) a été initialement identifiée comme un marqueur diagnostique d'intérêt des TR/TA dans une étude transcriptomique confirmée secondairement par Western Blot et immunohistochimie (Birks DK et al, 2010). L'intérêt de ce marqueur a ensuite été discuté compte tenu d'une sensibilité et d'une spécificité très limitées (Antonelli M et al, 2011). En effet, dans deux études, une immunopositivité avec l'anti-CLDN6 était identifiée dans seulement 29% à 39% des TR/TA et également dans de nombreuses autres tumeurs pédiatriques (Antonelli M, et al, 2011 ; Sullivan LM et al, 2012). CLDN6

est une protéine jonctionnelle apparaissant très tôt dans le développement (Turksen K et Troy TC, 2001). Elle constitue un marqueur très précoce d'épithélialisation. Elle est par exemple exprimée dans les tubes rénaux chez la souris en période néonatale (Abuazza G et al, 2006). Elle n'est pas exprimée chez l'adulte. Ce profil d'expression de CLDN6 a été aussi identifié par RT-PCR dans le plexus choroïde de rat dans l'étude 1.

Comme discuté dans l'étude 3, l'expression de CLDN1 et CLDN3 et sa localisation au sein des tumeurs suggèrent une proximité entre les épendymomes et les TPRP. Certaines claudines, comme CLDN3, présentent un site de fixation à l'entérotoxine de la bactérie *Clostridium perfringens* (Fujita K et al, 2000). Cette particularité peut avoir une application en terme de stratégie thérapeutique (Freedman JC et al, 2016). L'entérotoxine se lie à la claudine et forme un complexe dont l'oligomérisation est à l'origine d'un pore dans la membrane plasmique de la cellule. Ce pore autorise l'entrée d'un influx calcique à l'origine de la mort cellulaire. Même si ce mode de traitement peut sembler « séduisant », le caractère très focal et hétérogène de l'expression de CLDN3 dans les épendymomes et les TPRP ne prédit pas une bonne sensibilité de la tumeur à cette thérapeutique. L'expression est plus diffuse dans les papillomes des plexus choroïdes mais la chirurgie reste dans ces cas le traitement le plus approprié. L'analyse de CLDN5 a montré récemment un intérêt comme marqueur de bon pronostic dans les épendymomes supratentoriels (hémisphères cérébraux) (Viràg J et al, 2017).

Conclusions et perspectives :

Nos travaux confirment que la barrière sang-LCR (plexus choroïdes) est une structure déjà différenciée et organisée dès les stades précoces du développement, non seulement chez le rat, mais aussi chez l'homme. Cette barrière est sous-tendue par des jonctions serrées dont la composition moléculaire en claudines ne semble pas rigide mais dynamique au cours du développement. Cette composition variable en claudines pendant la période embryo-fœtale suggère une adaptation à des processus physiologiques particuliers à l'organogenèse. En plus des jonctions serrées, une machinerie enzymatique aux fonctions anti-oxydantes et détoxifiantes est présente dans le plexus choroïde du fœtus humain. Une étude plus approfondie des deux composantes de ces barrières chez le fœtus humain semble importante afin d'améliorer la prise en charge de l'enfant prématuré en réanimation néonatale et afin de mieux anticiper la tératogenicité de certains composés. Chez le prématuré, ces études sont nécessaires afin d'améliorer les stratégies de neuroprotection et la diffusion de certains médicaments dans le parenchyme cérébral. Chez le fœtus, une bonne connaissance de ces barrières, en plus de l'analyse de la barrière placentaire, permettrait d'anticiper les conséquences toxiques de certains médicaments ou polluants environnementaux sur l'encéphale en développement. Dans le domaine de la neuropathologie tumorale, l'utilisation des claudines peut aider le pathologiste à l'évaluation diagnostique et pronostique des tumeurs périventriculaires. Les claudines peuvent elles-mêmes constituer des cibles thérapeutiques intéressantes.

Références

- Abbott NJ (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *Journal of anatomy* 200:629-638.
- Abuazza G, Becker A, Williams SS, Chakravarty S, Truong HT, Lin F, Baum M (2006) Claudins 6, 9, and 13 are developmentally expressed renal tight junction proteins. *American journal of physiology Renal physiology* 291:F1132-1141.
- Agaimy A, Buslei R, Coras R, Rubin BP, Mentzel T (2014) Comparative study of soft tissue perineurioma and meningioma using a five-marker immunohistochemical panel. *Histopathology* 65:60-70.
- Anderson JM, Van Itallie CM (2009) Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1:a002584.
- Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS (2008) Biology of claudins. *American journal of physiology Renal physiology* 295:F867-876.
- Anstrom JA, Thore CR, Moody DM, Brown WR (2007) Immunolocalization of tight junction proteins in blood vessels in human germinal matrix and cortex. *Histochemistry and cell biology* 127:205-213.
- Antonelli M, Hasselblatt M, Haberler C, Di Giannatale A, Garre ML, Donofrio V, Lauriola L, Ridola V, Arcella A, Fruhwald M, Giangaspero F (2011) Claudin-6 is of limited sensitivity and specificity for the diagnosis of atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Brain pathology* 21:558-563.
- Back SA (2017) White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms. *Acta neuropathologica*.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease* 16:1-13.
- Ballabh P, Hu F, Kumarasiri M, Braun A, Nedergaard M (2005) Development of tight junction molecules in blood vessels of germinal matrix, cerebral cortex, and white matter. *Pediatric research* 58:791-798.
- Ballabh P (2010) Intraventricular hemorrhage in premature infants: mechanism of disease. *Pediatric research* 67:1-8.
- Bass NH, Lundborg P (1973) Postnatal development of bulk flow in the cerebrospinal fluid system of the albino rat: clearance of carboxyl-(14 C)inulin after intrathecal infusion. *Brain research* 52:323-332.
- Bauer HC, Bauer H, Lametschwandtner A, Amberger A, Ruiz P, Steiner M (1993) Neovascularization and the appearance of morphological characteristics of the blood-brain barrier in the embryonic mouse central nervous system. *Brain research Developmental brain research* 75:269-278.
- Birks DK, Kleinschmidt-DeMasters BK, Donson AM, Barton VN, McNatt SA, Foreman NK, Handler MH (2010) Claudin 6 is a positive marker for atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Brain pathology* 20:140-150.
- Borlongan CV, Skinner SJ, Geaney M, Vasconcellos AV, Elliott RB, Emerich DF (2004) Intracerebral transplantation of porcine choroid plexus provides structural and functional neuroprotection in a rodent model of stroke. *Stroke* 35:2206-2210.
- Brochner CB, Holst CB, Møllgaard K (2015) Outer brain barriers in rat and human development. *Frontiers in neuroscience* 9:75.
- Carder PJ, Hume R, Fryer AA, Strange RC, Lauder J, Bell JE (1990) Glutathione S-transferase in human brain. *Neuropathology and applied neurobiology* 16:293-303.

- Chang AH, Fuller GN, Debnam JM, Karis JP, Coons SW, Ross JS, Dean BL (2008) MR imaging of papillary tumor of the pineal region. *AJNR American journal of neuroradiology* 29:187-189.
- Coy S, Dubuc AM, Dahiya S, Ligon KL, Vasiljevic A, Santagata S (2017) Nuclear CRX and FOXJ1 Expression Differentiates Non-Germ Cell Pineal Region Tumors and Supports the Ependymal Differentiation of Papillary Tumor of the Pineal Region. *The American journal of surgical pathology* 41:1410-1421.
- Damkier HH, Brown PD, Praetorius J (2013) Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus. *Physiological reviews* 93:1847-1892.
- Dauchy S, Dutheil F, Weaver RJ, Chassoux F, Dumas-Duport C, Couraud PO, Scherrmann JM, De Waziers I, Declèves X (2008) ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *Journal of neurochemistry* 107:1518-1528.
- Decker M, Arand M, Cronin A (2009) Mammalian epoxide hydrolases in xenobiotic metabolism and signalling. *Archives of toxicology* 83:297-318.
- Declèves X, Strazielle N, Scherrmann JM, Ghersi-Egea JF (2014) Drug metabolism at the blood-brain and blood-CSF barriers. *In: Drug delivery to the brain. Eds: Hammarlund-Udenaes M, de Lange ECM, Thorne RG. Springer, AAPSPress : 101-124.*
- Dixon BJ, Reis C, Ho WM, Tang J, Zhang JH (2015) Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *International journal of molecular sciences* 16:22368-22401.
- Douglas-Escobar M, Weiss MD (2015) Hypoxic-ischemic encephalopathy: a review for the clinician. *JAMA pediatrics* 169:397-403.
- Duvernoy HM, Risold PY (2007) The circumventricular organs: an atlas of comparative anatomy and vascularization. *Brain research reviews* 56:119-147.
- Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD, Saunders NR (2001) Development of the choroid plexus. *Microscopy research and technique* 52:5-20.
- Ek CJ, Habgood MD, Dziegielewska KM, Saunders NR (2003) Structural characteristics and barrier properties of the choroid plexuses in developing brain of the opossum (*Monodelphis Domestica*). *The Journal of comparative neurology* 460:451-464.
- Ek CJ, Dziegielewska KM, Stolp H, Saunders NR (2006) Functional effectiveness of the blood-brain barrier to small water-soluble molecules in developing and adult opossum (*Monodelphis domestica*). *The Journal of comparative neurology* 496:13-26.
- Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801-805.
- Farin FM, Omiecinski CJ (1993) Regiospecific expression of cytochrome P-450s and microsomal epoxide hydrolase in human brain tissue. *Journal of toxicology and environmental health* 40:317-335.
- Fauchon F, Hasselblatt M, Jouvét A, Champier J, Popovic M, Kirillos R, Santarius T, Amemiya S, Kumabe T, Frappaz D, Lonjon M, Fevre Montange M, Vasiljevic A (2013) Role of surgery, radiotherapy and chemotherapy in papillary tumors of the pineal region: a multicenter study. *Journal of neuro-oncology* 112:223-231.
- Fernandez-Lopez D, Faustino J, Daneman R, Zhou L, Lee SY, Derugin N, Wendland MF, Vexler ZS (2012) Blood-brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:9588-9600.

- Fevre-Montange M, Vasiljevic A, Champier J, Jouvét A (2010) Histopathology of tumors of the pineal region. *Future oncology* 6:791-809.
- Fevre Montange M, Vasiljevic A, Champier J, Jouvét A (2015) Papillary tumor of the pineal region: Histopathological characterization and review of the literature. *Neuro-Chirurgie* 61:138-142.
- Fletcher NF, Wilson GK, Murray J, Hu K, Lewis A, Reynolds GM, Stamatakis Z, Meredith LW, Rowe IA, Luo G, Lopez-Ramirez MA, Baumert TF, Weksler B, Couraud PO, Kim KS, Romero IA, Jopling C, Morgello S, Balfe P, McKeating JA (2012) Hepatitis C virus infects the endothelial cells of the blood-brain barrier. *Gastroenterology* 142:634-643 e636.
- Forster C (2008) Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochemistry and cell biology* 130:55-70.
- Freedman JC, Shrestha A, McClane BA (2016) Clostridium perfringens Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins* 8.
- Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, Tsukita S (2000) Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS letters* 476:258-261.
- Gazzin S, Strazielle N, Schmitt C, Fevre-Montange M, Ostrow JD, Tiribelli C, Ghersi-Egea JF (2008) Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCb1 and ABCc1 between blood-brain interfaces. *The Journal of comparative neurology* 510:497-507.
- Ghersi-Egea JF, Minn A, Siest G (1988) A new aspect of the protective functions of the blood-brain barrier: activities of four drug-metabolizing enzymes in isolated rat brain microvessels. *Life sciences* 42:2515-2523.
- Ghersi-Egea JF, Perrin R, Leininger-Muller B, Grassiot MC, Jeandel C, Floquet J, Cuny G, Siest G, Minn A (1993) Subcellular localization of cytochrome P450, and activities of several enzymes responsible for drug metabolism in the human brain. *Biochemical pharmacology* 45:647-658.
- Ghersi-Egea JF, Leininger-Muller B, Suleman G, Siest G, Minn A (1994) Localization of drug-metabolizing enzyme activities to blood-brain interfaces and circumventricular organs. *Journal of neurochemistry* 62:1089-1096.
- Ghersi-Egea JF, Strazielle N, Murat A, Jouvét A, Buenerd A, Belin MF (2006) Brain protection at the blood-cerebrospinal fluid interface involves a glutathione-dependent metabolic barrier mechanism. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 26:1165-1175.
- Giepmans BN, van Ijzendoorn SC (2009) Epithelial cell-cell junctions and plasma membrane domains. *Biochimica et biophysica acta* 1788:820-831.
- Govaert P (2009) Prenatal stroke. *Seminars in fetal & neonatal medicine* 14:250-266.
- Hagan N, Ben-Zvi A (2015) The molecular, cellular, and morphological components of blood-brain barrier development during embryogenesis. *Seminars in cell & developmental biology* 38:7-15.
- Hahn HP, Bundock EA, Hornick JL (2006) Immunohistochemical staining for claudin-1 can help distinguish meningiomas from histologic mimics. *American journal of clinical pathology* 125:203-208.
- Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE (2015) Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Seminars in cell & developmental biology* 38:16-25.

- Heim S, Sill M, Jones DT, Vasiljevic A, Jouvét A, Fevre-Montange M, Wesseling P, Beschorner R, Mittelbronn M, Kohlhof P, Hovestadt V, Johann P, Kool M, Pajtler KW, Korshunov A, Ruland V, Sperveslage J, Thomas C, Witt H, von Deimling A, Paulus W, Pfister SM, Capper D, Hasselblatt M (2016) Papillary Tumor of the Pineal Region: A Distinct Molecular Entity. *Brain pathology* 26:199-205.
- Herve F, Ghinea N, Scherrmann JM (2008) CNS delivery via adsorptive transcytosis. *The AAPS journal* 10:455-472.
- Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ (2006) The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC cancer* 6:186.
- Jimenez AJ, Dominguez-Pinos MD, Guerra MM, Fernandez-Llebrez P, Perez-Figares JM (2014) Structure and function of the ependymal barrier and diseases associated with ependyma disruption. *Tissue barriers* 2:e28426.
- Johansson PA, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Mollgard K, Potter A, Schuliga M, Saunders NR (2005) Aquaporin-1 in the choroid plexuses of developing mammalian brain. *Cell and tissue research* 322:353-364.
- Johansson PA, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Liddel SA, Potter AM, Stolp HB, Saunders NR (2006) Blood-CSF barrier function in the rat embryo. *The European journal of neuroscience* 24:65-76.
- Johansson PA, Dziegielewska KM, Liddel SA, Saunders NR (2008) The blood-CSF barrier explained: when development is not immaturity. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 30:237-248.
- Johnston MV (2005) Excitotoxicity in perinatal brain injury. *Brain pathology* 15:234-240.
- Joly JS, Osorio J, Alunni A, Auger H, Kano S, Retaux S (2007) Windows of the brain: towards a developmental biology of circumventricular and other neurohemal organs. *Seminars in cell & developmental biology* 18:512-524.
- Jouvét A, Fevre-Montange M, Besancon R, Derrington E, Saint-Pierre G, Belin MF, Pialat J, Lapras C (1994) Structural and ultrastructural characteristics of human pineal gland, and pineal parenchymal tumors. *Acta neuropathologica* 88:334-348.
- Jouvét A, Fauchon F, Liberski P, Saint-Pierre G, Didier-Bazes M, Heitzmann A, Delisle MB, Biassette HA, Vincent S, Mikol J, Streichenberger N, Ahboucha S, Brisson C, Belin MF, Fevre-Montange M (2003) Papillary tumor of the pineal region. *The American journal of surgical pathology* 27:505-512.
- Kaur C, Ling EA (2017) The circumventricular organs. *Histology and histopathology* 32:879-892.
- Kratzer I, Vasiljevic A, Rey C, Fevre-Montange M, Saunders N, Strazielle N, Ghersi-Egea JF (2012) Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier. *Histochemistry and cell biology* 138:861-879.
- Kratzer I, Liddel SA, Saunders NR, Dziegielewska KM, Strazielle N, Ghersi-Egea JF (2013) Developmental changes in the transcriptome of the rat choroid plexus in relation to neuroprotection. *Fluids and barriers of the CNS* 10:25.
- Kratzer I, Chip S, Vexler ZS (2014) Barrier mechanisms in neonatal stroke. *Frontiers in neuroscience* 8:359.
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE (2008) Structure and function of claudins. *Biochimica et biophysica acta* 1778:631-645.
- Lal-Nag M, Morin PJ (2009) The claudins. *Genome biology* 10:235.
- Langlet F, Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B (2013) Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain. *The Journal of comparative neurology* 521:3389-3405.

- Larsen BT, Gutterman DD, Hatoum OA (2006) Emerging role of epoxyeicosatrienoic acids in coronary vascular function. *European journal of clinical investigation* 36:293-300.
- Lehman NL (2008a) Central nervous system tumors with ependymal features: a broadened spectrum of primarily ependymal differentiation? *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67:177-188.
- Lehman NL (2008b) Patterns of brain infiltration and secondary structure formation in supratentorial ependymal tumors. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 67:900-910.
- Liddel SA, Temple S, Mollgard K, Gehwolf R, Wagner A, Bauer H, Bauer HC, Phoenix TN, Dziegielewska KM, Saunders NR (2012) Molecular characterisation of transport mechanisms at the developing mouse blood-CSF interface: a transcriptome approach. *PLoS one* 7:e33554.
- Liddel SA (2015) Development of the choroid plexus and blood-CSF barrier. *Frontiers in neuroscience* 9:32.
- Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote EH, Kalbacher H, Wolburg H (2000) Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica* 100:323-331.
- Lippoldt A, Liebner S, Andbjør B, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H, Fuxe K (2000) Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *Neuroreport* 11:1427-1431.
- Listowsky I, Rowe JD, Patskovsky YV, Tchaikovskaya T, Shintani N, Novikova E, Nieves E (1998) Human testicular glutathione S-transferases: insights into tissue-specific expression of the diverse subunit classes. *Chemico-biological interactions* 111-112:103-112.
- Llovera G, Benakis C, Enzmann G, Cai R, Arzberger T, Ghasemigharagoz A, Mao X, Malik R, Lazarevic I, Liebscher S, Erturk A, Meissner L, Vivien D, Haffner C, Plesnila N, Montaner J, Engelhardt B, Liesz A (2017) The choroid plexus is a key cerebral invasion route for T cells after stroke. *Acta neuropathologica*.
- Lun MP, Monuki ES, Lehtinen MK (2015) Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system. *Nature reviews Neuroscience* 16:445-457.
- Mark KS, Davis TP (2002) Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 282:H1485-1494.
- Marowsky A, Burgener J, Falck JR, Fritschy JM, Arand M (2009) Distribution of soluble and microsomal epoxide hydrolase in the mouse brain and its contribution to cerebral epoxyeicosatrienoic acid metabolism. *Neuroscience* 163:646-661.
- Migdal C, Serres M (2011) [Reactive oxygen species and oxidative stress]. *Medecine sciences : M/S* 27:405-412.
- Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Gunzel D, Müller D, Schulzke JD, Amasheh S, Fromm M (2010) Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochimica et biophysica acta* 1798:2048-2057.
- Miyata S (2015) New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. *Frontiers in neuroscience* 9:390.
- Mollgard K, Balslev Y, Lauritzen B, Saunders NR (1987) Cell junctions and membrane specializations in the ventricular zone (germinal matrix) of the developing sheep brain: a CSF-brain barrier. *Journal of neurocytology* 16:433-444.

- Mollgard K, Saunders NR (1986) The development of the human blood-brain and blood-CSF barriers. *Neuropathology and applied neurobiology* 12:337-358.
- Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S (1999a) Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *The Journal of cell biology* 145:579-588.
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999b) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *The Journal of cell biology* 147:185-194.
- Morse DC, Stein AP, Thomas PE, Lowndes HE (1998) Distribution and induction of cytochrome P450 1A1 and 1A2 in rat brain. *Toxicology and applied pharmacology* 152:232-239.
- Mullier A, Bouret SG, Prevot V, Dehouck B (2010) Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *The Journal of comparative neurology* 518:943-962.
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *The Journal of cell biology* 161:653-660.
- Nordfors K, Haapasalo J, Sallinen PK, Haapasalo H, Soini Y (2013) Expression of claudins relates to tumour aggressivity, location and recurrence in ependymomas. *Histology and histopathology* 28:1137-1146.
- Petrov T, Howarth AG, Krukoff TL, Stevenson BR (1994) Distribution of the tight junction-associated protein ZO-1 in circumventricular organs of the CNS. *Brain research Molecular brain research* 21:235-246.
- Pfeiffer F, Schafer J, Lyck R, Makrides V, Brunner S, Schaeren-Wiemers N, Deutsch U, Engelhardt B (2011) Claudin-1 induced sealing of blood-brain barrier tight junctions ameliorates chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Acta neuropathologica* 122:601-614.
- Philbert MA, Beiswanger CM, Manson MM, Green JA, Novak RF, Primiano T, Reuhl KR, Lowndes HE (1995) Glutathione S-transferases and gamma-glutamyl transpeptidase in the rat nervous systems: a basis for differential susceptibility to neurotoxicants. *Neurotoxicology* 16:349-362.
- Richard K, Hume R, Kaptein E, Stanley EL, Visser TJ, Coughtrie MW (2001) Sulfation of thyroid hormone and dopamine during human development: ontogeny of phenol sulfotransferases and arylsulfatase in liver, lung, and brain. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86:2734-2742.
- Rodriguez EM, Rodriguez S, Hein S (1998) The subcommissural organ. *Microscopy research and technique* 41:98-123.
- Rodriguez EM, Oksche A, Montecinos H (2001) Human subcommissural organ, with particular emphasis on its secretory activity during the fetal life. *Microscopy research and technique* 52:573-590.
- Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Gunzel D, Fromm M (2010) Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *Journal of cell science* 123:1913-1921.
- Rothstein RP, Levison SW (2002) Damage to the choroid plexus, ependyma and subependyma as a consequence of perinatal hypoxia/ischemia. *Developmental neuroscience* 24:426-436.
- Sandoval KE, Witt KA (2008) Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiology of disease* 32:200-219.

- Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM (1999) Barrier mechanisms in the brain, I. Adult brain. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 26:11-19.
- Saunders NR, Liddelow SA, Dziegielewska KM (2012) Barrier mechanisms in the developing brain. *Frontiers in pharmacology* 3:46.
- Saunders NR, Habgood MD, Mollgard K, Dziegielewska KM (2016) The biological significance of brain barrier mechanisms: help or hindrance in drug delivery to the central nervous system? *F1000Research* 5.
- Scheithauer BW (1999) Pathobiology of the pineal gland with emphasis on parenchymal tumors. *Brain tumor pathology* 16:1-9.
- Schulzke JD, Gunzel D, John LJ, Fromm M (2012) Perspectives on tight junction research. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1257:1-19.
- Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A (2015) Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Seminars in cell & developmental biology* 38:2-6.
- Shawahna R, Uchida Y, Decleves X, Ohtsuki S, Yousif S, Dauchy S, Jacob A, Chassoux F, Dumas-Duport C, Couraud PO, Terasaki T, Scherrmann JM (2011) Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Molecular pharmaceutics* 8:1332-1341.
- Sofroniew MV (2015) Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature reviews Neuroscience* 16:249-263.
- Soini Y, Rauramaa T, Alafuzoff I, Sandell PJ, Karja V (2010) Claudins 1, 11 and twist in meningiomas. *Histopathology* 56:821-824.
- Steed E, Balda MS, Matter K (2010) Dynamics and functions of tight junctions. *Trends in cell biology* 20:142-149.
- Steinemann A, Galm I, Chip S, Nitsch C, Maly IP (2016) Claudin-1, -2 and -3 Are Selectively Expressed in the Epithelia of the Choroid Plexus of the Mouse from Early Development and into Adulthood While Claudin-5 is Restricted to Endothelial Cells. *Frontiers in neuroanatomy* 10:16.
- Strazielle N, Gherzi-Egea JF (1999) Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:6275-6289.
- Sullivan LM, Yankovich T, Le P, Martinez D, Santi M, Biegel JA, Pawel BR, Judkins AR (2012) Claudin-6 is a nonspecific marker for malignant rhabdoid and other pediatric tumors. *The American journal of surgical pathology* 36:73-80.
- Sura P, Sura R, Enayetallah AE, Grant DF (2008) Distribution and expression of soluble epoxide hydrolase in human brain. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 56:551-559.
- Szathmari A, Champier J, Gherzi-Egea JF, Jouvet A, Watrin C, Wierinckx A, Fevre Montange M (2013) Molecular characterization of circumventricular organs and third ventricle ependyma in the rat: potential markers for periventricular tumors. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology* 33:17-29.
- Szmydynger-Chodobska J, Pascale CL, Pfeffer AN, Coulter C, Chodobski A (2007) Expression of junctional proteins in choroid plexus epithelial cell lines: a comparative study. *Cerebrospinal fluid research* 4:11.
- Tahraoui SL, Marret S, Bodenant C, Leroux P, Dommergues MA, Evrard P, Gressens P (2001) Central role of microglia in neonatal excitotoxic lesions of the murine periventricular white matter. *Brain pathology* 11:56-71.

- Takei H, Bhattacharjee MB, Rivera A, Dancer Y, Powell SZ (2007) New immunohistochemical markers in the evaluation of central nervous system tumors: a review of 7 selected adult and pediatric brain tumors. *Archives of pathology & laboratory medicine* 131:234-241.
- Tayarani I, Cloez I, Clement M, Bourre JM (1989) Antioxidant enzymes and related trace elements in aging brain capillaries and choroid plexus. *Journal of neurochemistry* 53:817-824.
- Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nature reviews Molecular cell biology* 2:285-293.
- Turksen K, Troy TC (2001) Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 222:292-300.
- Turksen K, Troy TC (2011) Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer. *Biochimica et biophysica acta* 1816:73-79.
- Virag J, Haberler C, Baksa G, Pjurko V, Hegedus Z, Reiniger L, Balint K, Chocholous M, Kiss A, Lotz G, Glasz T, Schaff Z, Garami M, Hegedus B (2017) Region Specific Differences of Claudin-5 Expression in Pediatric Intracranial Ependymomas: Potential Prognostic Role in Supratentorial Cases. *Pathology oncology research : POR* 23:245-252.
- Virgintino D, Errede M, Robertson D, Capobianco C, Girolamo F, Vimercati A, Bertossi M, Roncali L (2004) Immunolocalization of tight junction proteins in the adult and developing human brain. *Histochemistry and cell biology* 122:51-59.
- Volpe JJ (2009a) The encephalopathy of prematurity--brain injury and impaired brain development inextricably intertwined. *Seminars in pediatric neurology* 16:167-178.
- Volpe JJ (2009b) Brain injury in premature infants: a complex amalgam of destructive and developmental disturbances. *The Lancet Neurology* 8:110-124.
- Watson N, Diamandis T, Gonzales-Portillo C, Reyes S, Borlongan CV (2016) Melatonin as an Antioxidant for Stroke Neuroprotection. *Cell transplantation* 25:883-891.
- Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO (2005) Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19:1872-1874.
- Whish S, Dziegielewska KM, Mollgard K, Noor NM, Liddel SA, Habgood MD, Richardson SJ, Saunders NR (2015) The inner CSF-brain barrier: developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions. *Frontiers in neuroscience* 9:16.
- Wippold FJ, 2nd, Perry A (2006) Neuropathology for the neuroradiologist: rosettes and pseudorosettes. *AJNR American journal of neuroradiology* 27:488-492.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B (2001) Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neuroscience letters* 307:77-80.
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood-brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta neuropathologica* 105:586-592.
- Wolburg H, Paulus W (2010) Choroid plexus: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119:75-88.

- Xiang J, Routhe LJ, Wilkinson DA, Hua Y, Moos T, Xi G, Keep RF (2017) The choroid plexus as a site of damage in hemorrhagic and ischemic stroke and its role in responding to injury. *Fluids and barriers of the CNS* 14:8.
- Yu AS (2009) Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based pores. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165:53-57.
- Zhang W, Davis CM, Edin ML, Lee CR, Zeldin DC, Alkayed NJ (2013) Role of endothelial soluble epoxide hydrolase in cerebrovascular function and ischemic injury. *PloS one* 8:e61244.
- Zhang W, Zhang H, Mu H, Zhu W, Jiang X, Hu X, Shi Y, Leak RK, Dong Q, Chen J, Gao Y (2016) Omega-3 polyunsaturated fatty acids mitigate blood-brain barrier disruption after hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiology of disease* 91:37-46.

Résumé

Les interfaces sang-cerveau comme la barrière hémato-encéphalique (BHE), les plexus choroïdes (PC) ou les organes circumventriculaires (OCV), constituent des barrières physiologiques nécessaires au fonctionnement du système nerveux central. Ces barrières sont à la fois « physiques », constituées de jonctions serrées, et « enzymatiques ». Longtemps considérées comme immatures chez le fœtus, ces barrières sont en réalité présentes précocement au cours du développement. Leurs caractéristiques et leurs propriétés restent peu connues chez l'homme. Nos travaux montrent que les PC expriment, précocement au cours du développement, des protéines de jonction serrée, les claudines (CLDN) 1, 2 et 3 chez le rat et chez l'homme. Cette expression est dynamique au cours du développement avec une apparition progressive de la CLDN2 pouvant avoir un lien avec la sécrétion du liquide céphalo-rachidien. Les CLDN 1 et 3 sont identifiées chez le fœtus humain au niveau de l'organe sous-commissural (OSC), un des OCV. La CLDN5 est exprimée précocement au niveau de la BHE chez le rat et chez l'homme et son expression est altérée dans un modèle d'excitotoxicité néonatale. Nos travaux montrent également que l'analyse du profil des CLDN est utile en pathologie tumorale notamment dans la compréhension et le diagnostic de tumeurs développées à partir des PC ou de l'OSC. Enfin, diverses enzymes antioxydantes et de détoxification dont l'époxyde hydrolase microsomale sont exprimées à 22 semaines d'aménorrhée principalement au niveau des PC du fœtus humain. Ces données suggèrent des capacités de détoxification des PC, d'installation précoce au cours du développement chez l'homme.

Mots-clé : interfaces sang-cerveau ; plexus choroïdes ; claudine ; développement ; tumeurs cérébrales ; détoxification ; excitotoxicité

Blood-brain interfaces including blood-brain barrier (BBB), choroid plexuses (CP) or circumventricular organs (CVO) are physiological barriers required for brain homeostasis. These barriers are “physical”, with tight junctions, and “enzymatic”. Though long considered immature in fetuses, these barriers are present from an early stage of development. Their characteristics and their properties are largely unknown in humans. Our work demonstrates that CP express tight junction-associated proteins claudins (CLDN) 1, 2, and 3 at early stages of development in rat and human. This expression is dynamic during development as shown by the progressive increase of CLDN2 immunopositivity that may follow increase in cerebrospinal fluid secretion. CLDN 1 and 3 are identified in human fetal subcommissural organ (SCO), one of the CVO. CLDN5 is early expressed in rat and human BBB and its expression is disrupted by excitotoxic injury. Our work also shows that CLDN immunohistochemical profile is useful in tumoral pathology, notably to better understand and diagnose tumors arising from CP or the SCO. Finally, various antioxidant and detoxifying enzymes such as the microsomal epoxide hydrolase are expressed at 22 weeks of gestation in the human fetus, mainly in CP. These results suggest a high detoxifying capacity for the CP during development in humans.

Mots-clé : blood-brain interfaces ; choroid plexus ; claudin ; development ; brain tumors ; detoxification ; excitotoxicity

ANNEXES

ARTICLE 1

Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier.

Kratzer I, Vasiljevic A, Rey C, Fevre-Montange M, Saunders N, Strazielle N, Gherzi-Egea JF (2012) Histochemistry and cell biology 138:861-879.

ARTICLE 2

Melatonin reduces excitotoxic blood-brain barrier breakdown in neonatal rats.

Moretti R, Zanin A, Pansiot J, Spiri D, Manganozzi L, Kratzer I, Favero G, Vasiljevic A, Rinaldi VE, Pic I, Massano D, D'Agostino I, Baburamani A, La Rocca MA, Rodella LF, Rezzani R, Ek J, Strazielle N, Gherzi-Egea JF, Gressens P, Titomanlio L. Neuroscience 2015 ; 311:382-397. (non reproduit/soumis à copyright)

ARTICLE 3

Histopathologic and ultrastructural features and claudin expression in papillary tumors of the pineal region : a multicenter analysis.

Fèvre-Montange M*, Vasiljevic A*, Bergemer-Fouquet AM, Bernier M, Champier J, Chrétien F, Figarella-Branger D, Kemeny JL, Lechapt-Zalcman E, Michalak S, Miquel C, Mokhtari K, Pommeypuy I, Quintin-Roué I, Rousseau A, Saint-Pierre G, Salon C, Uro-Coste E, Varlet P, Kratzer I, Gherzi-Egea JF, Jouvét A. Am J Surg Pathol 2012 ; 36: 916-928

* : co-premiers auteurs (non reproduit/soumis à copyright)

Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood–CSF barrier

Ingrid Kratzer · Alexandre Vasiljevic · Catherine Rey ·
Michelle Fevre-Montange · Norman Saunders ·
Nathalie Strazielle · Jean-François Gherzi-Egea

Accepted: 10 July 2012 / Published online: 11 August 2012
© The Author(s) 2012. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract The choroid plexus epithelium controls the movement of solutes between the blood and the cerebrospinal fluid. It has been considered as a functionally more immature interface during brain development than in adult. The anatomical basis of this barrier is the interepithelial choroidal junction whose tightness has been attributed to the presence of claudins. We used quantitative real-time polymerase chain reaction, Western blot and immunohistochemistry to identify different claudins in the choroid plexuses of developing and adult rats. Claudin-1, -2, and -3

were highly and selectively expressed in the choroid plexus as compared to brain or parenchyma microvessels and were localized at epithelial junctions. Claudin-6, -9, -19, and -22 also displayed a previously undescribed choroidal selectivity, while claudin-4, -5, and -16 were enriched in the cerebral microvessels. The choroidal pattern of tight junction protein expression in prenatal brains was already complex and included occludin and zonula occludens proteins. It differed from the adult pattern in that the pore-forming claudin-2, claudin-9, and claudin-22 increased during development, while claudin-3 and claudin-6 decreased. Claudin-2 and claudin-11 presented a mirror image of abundance between lateral ventricle and fourth ventricle choroid plexuses. Immunohistochemical analysis of human fetal and postnatal brains for claudin-1, -2, and -3 demonstrated their early presence and localization at the apico-lateral border of the choroid plexus epithelial cells. Overall, choroidal epithelial tight junctions are already complex in developing brain. The observed differences in claudin expression between developing and adult choroid plexuses may indicate developmental differences in selective blood–cerebrospinal fluid transport functions.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00418-012-1001-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. Kratzer · A. Vasiljevic · M. Fevre-Montange ·
J.-F. Gherzi-Egea
INSERM U1028, CNRS UMR 5292, Lyon Neuroscience Research
Center, Lyon-1 University, 69008 Lyon, France

A. Vasiljevic
East Pathological Center, Lyon Public Hospitals, Lyon, France

C. Rey
ProfilXpert, UNIV-US7 INSERM-UMS 3453 CNRS Lyon,
Lyon, France

N. Saunders
Department of Pharmacology, University of Melbourne,
Melbourne, Australia

N. Strazielle
Brain-i, Lyon, France

J.-F. Gherzi-Egea (✉)
Neurooncology and Neuroinflammation Team, INSERM U1028,
CNRS UMR 5292, Lyon Neuroscience Research Center, Faculté
de Médecine Laennec, 7 rue G. Paradin, 69372 Lyon Cedex 08,
France
e-mail: jean-francois.ghersi-egea@inserm.fr

Keywords Blood–brain barrier · Brain development ·
Choroid plexus · Tight junction

Introduction

A tight regulation of the neural cell microenvironment is mandatory for efficient neuronal activities. Cerebral homeostasis largely results from the ability of both the blood–brain barrier (BBB) at the brain microvascular endothelium and the blood–cerebrospinal fluid barrier (BCSFB) at the epithelium of the choroid plexuses (CPs),

to control the composition of the CSF and cerebral extracellular fluid. Tight junction (TJ) proteins that link the cells forming these blood–brain interfaces form the anatomical basis for this control by preventing non-specific paracellular leakage between blood and the cerebral fluids. Influx and efflux transporters located at both barriers allow nutrient supply to the brain, while excluding a wide range of potentially deleterious compounds from this organ. The CPs, which are located in the different ventricles of the brain fulfill additional specific functions. They are a source of trophic factors during brain development, are responsible for controlled secretion of CSF, and are major detoxifying organs within the brain (Davson and Segal 1996; Saunders et al. 2008; Strazielle and Ghersi-Egea 2000; Zappaterra and Lehtinen 2012).

The brain is especially vulnerable during development, and perinatal brain injury can lead to altered myelination, reduced neurogenesis or inappropriate neuronal network organization with dramatic consequences throughout life (Dammann and Leviton 1999; Stolp et al. 2011). The blood–brain interfaces are often considered immature in the developing brain due to a high protein concentration in the CSF (e.g. Adinolfi 1985). However, electron microscopy and tracer experiments in rodents and marsupials indicate that the paracellular pathway is already restricted in early developing brain (Ek et al. 2006; Johansson et al. 2006), and alternative explanations based on CSF space volume, CSF turnover, and transcellular transport of specific proteins have been brought forward to explain the presence of proteins in the CSF of developing animals (Johansson et al. 2008b). Transfer of exogenous polar compounds and some endogenous proteins between the blood and the CSF has been demonstrated in the developing rat brain, which partly occurs by diffusion (Habgood et al. 1992). A transcellular route has been described for both proteins and small lipid insoluble molecules during development (Balslev et al. 1997; Liddelow et al. 2009), but further studies are required to resolve whether there is also a paracellular component of this transfer before a definitive conclusion can be reached.

Unraveling the complexity of TJs is important to appreciate the level of neuroprotection provided by the blood–brain interfaces at different stages of brain maturation, especially during the perinatal period, and to understand cerebral drug bioavailability in the context of pediatric treatments. The tightness of the cellular junctions results from the complex interplay of transmembrane and accessory proteins. The transmembrane proteins of the claudin (Cld) family play a crucial role in determining the efficiency and selectivity of TJs. In mammals Cld-5 is the main Cld identified in BBB tight junctions, which also comprise Cld-3 and -12 (Morita et al. 1999b; Nitta et al. 2003; Wolburg et al. 2003). The molecular identity of the

TJ-forming Clds at the BCSFB remains more elusive. So far Cld-1/3,-2, and -11 have been described in the rodent or murine CP epithelium (Lippoldt et al. 2000; Wolburg et al. 2001). In human, Cld-5 was also shown to localize in intercellular junctions of the cerebral microvascular endothelium (Virgintino et al. 2004), but no data exist concerning the composition of TJ that link the choroidal epithelial cells forming the BCSFB.

To decipher the molecular composition and understand the complexity of TJs at the BCSFB in the developing rat brain, we analyzed the pre- and post-natal developmental profile of Cld expression in the CP, in comparison to the BBB-forming microvessels (MV), and determined the cellular localization of these proteins. On the basis of the current knowledge of TJ proteins in the brain, and preliminary transcriptomic analyses we performed on choroidal tissue, we selected 14 members of the Cld family. Occludin and the three zonula occludens (ZO) peripheral membrane proteins were also included. We report the presence of hitherto undescribed Cld members associated with junctional complexes of the BCSFB and BBB, and show differences in the developmental patterns of TJ proteins in the CP of the lateral and fourth ventricle. We finally demonstrate that knowledge of the early choroidal expression of Clds can be extended to the human BCSFB.

Materials and methods

Tissue collection

Animal care and procedures were conducted according to the guidelines approved by the French ethical committee (decree 87-848) and by the European Community (directive 86-609-EEC). Sprague–Dawley rats, either adult males (250 g), pregnant time-dated females or females with litters were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). All animals were kept under similar conditions in standard cages, with free access to food and tap water under a controlled environment (12 h day/light cycle). Animals were euthanized under isoflurane anesthesia by decapitation and their brains were rapidly excised and placed at 4 °C in Krebs–Ringer buffer (in mM: 135 NaCl, 4 KCl, 2.2 CaCl₂, 1.2MgCl₂, 6 NaHCO₃, 10 HEPES, 5 glucose, pH 7.4). The two lateral ventricle choroid plexuses (LCVP) and the fourth ventricle choroid plexus (4VCP) were dissected individually from postnatal day 2 (P2), postnatal day 9 (P9) and adult rats at 4 °C under stereomicroscope as previously described and illustrated (Strazielle and Ghersi-Egea 1999, 2000). Nineteen day-old embryos (E19) were removed one by one from the mother, which was kept under isoflurane anesthesia on a heated pad and were used for brain sampling and further microdissection of the CPs

as described above. CPs collected from several animals (between 2 and 5, depending on the developmental stage) were pooled. Following CP isolation, brain cortices were sampled at all stages and cleaned of apparent meninges under a stereomicroscope. These tissues were either used as homogenates or for RNA extraction at all stages of development, or for MVs preparation at P9 and adult stages. The cortical MVs were isolated and assessed for purity as previously described (Gazzin et al. 2008). Briefly, cortices were homogenized in a Dounce-type glass–glass homogenizer after the addition of 5 vol/g tissue of 1 % bovine serum albumin (BSA)-supplemented Krebs–Ringer. The MVs were separated from larger vessels and brain parenchyma material by a sequence of a 17.5 % 70 kDa-Dextran gradient followed by filtering steps through decreasing pore diameter mesh sieves. The microvessel fraction retained on the 40- μ m sieve was recovered in 0.1 % albumin in Krebs–Ringer buffer. All steps were performed at 4 °C. For gene expression analysis, the tissue collection and MV isolation were performed under RNase-free conditions. Samples collected for gene expression analyses and Western blot (WB) were snap-frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C. For immunohistochemistry, brains sampled from E19 to adult animals were snap-frozen in isopentane at –50 °C, embedded in Tissue-Tek (Sakura Finetek Europe, The Netherlands) and stored at –80 °C.

Human fetal brain tissues were obtained from autopsies performed at the Centre de Pathologie Est, Groupement Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, France, after obtaining an informed consent from the parents.

Quantitative RT-PCR

Total RNA was isolated from four batches of 4VCP, LVCP as well as cortices sampled from E19, P2, P9 and adult rats using the RNeasy[®] Micro Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), and DNase-treated according to the manufacturer's protocol. For comparative purpose, RNA was also isolated from two batches of MVs prepared from P9 and adult rat brain. Total RNA was quantified using OD_{260nm} on a NanoDrop 2000c spectrophotometer (ThermoScientific, Baltimore, MA, USA) and quality was assessed with the Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). RNA (1 μ g) was spiked with 25 pg of bacterial AraB RNA from *E. coli* used as an external standard (GE Healthcare Bio-Sciences Freiburg, Germany) and reverse transcribed using the iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). This external bacterial standard was used for normalization as the expression of conventionally used house-keeping genes including glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase or hypoxanthine-phosphoribosyl transferase proved to be variable between tissues or developmental stages.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was performed with the LightCycler FastStart-DNA Master SYBR Green I kit and the LightCycler[®] 1.5 Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). All primers were designed using NCBI Primer-BLAST and selected to generate amplicons with a length of 100–200 bp (Online Resource 1). The LightCycler experimental run protocol consisted of an initial *Taq* activation at 95 °C, for 8 min followed by a “touch down” amplification program. The first cycle of the program consisted of 15 s at 95 °C, 5 s at 68 °C and 8 s at 72 °C. The annealing temperature was reduced by 0.5 °C every cycle until 62 °C was reached. This was followed by generic PCR amplification for 27 additional cycles keeping the annealing temperature at 62 °C. Melting-curve analysis was then performed to verify the amplification of a single product with a specific melting temperature. MgCl₂ concentration was optimized for each gene and negative PCR controls without cDNA template were included in every run. A standard curve was generated using the LightCycler[®] Software 4.1 by non-linear regression analysis of crossing points (Cp) measured from serial dilutions of a cDNA pool for each gene analyzed and for the external standard AraB. Cp values of unknown samples were used with the appropriate standard curve to determine in each sample the relative cDNA concentration of the target gene. Potential variability in sample-to-sample reverse transcription efficiency and RT-PCR processing was corrected by normalizing the data to AraB expression.

To provide an approximate ranking of the different Cld gene product abundance, expression levels of all genes were estimated first in a reference sample, arbitrarily chosen as P2 LVCP #3 as follows: $\text{AraB efficiency}^{\text{AraB CP}} / \text{Target efficiency}^{\text{Target CP}}$, where efficiencies of amplification were calculated from the linear part of the standard curves using the LightCycler[®] Software 4.1 (http://www.rocke-applied-science.com/sis/rtpcr/lightcycler/index.jsp?id=lc_0106010302). The obtained values were expressed as a percentage of Cld-1 value after correction for variation in the size of amplification product. For each target gene, the expression levels of all individual samples were finally expressed relative to the value of the reference sample.

The significance of differences in expression levels between tissues or between developmental stages was assessed for each gene by one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test. The significance of difference in expression levels between age-matched 4VCP and LVCP was assessed by two-tailed paired Student's *t* test.

Primary antibodies

Polyclonal rabbit anti-Cld-1 Ab (pAb) (51-9000, not cross-reacting with Cld-3), rabbit anti-Cld-2 pAb (51-6100),

rabbit anti-Cld-3 pAb (34-1700), rabbit anti-Cld-4 pAb (36-4800), rabbit anti-Cld-5 pAb (34-1600) and the mouse anti-Cld-5 monoclonal antibody (mAb) (35-2500) were purchased from Zymed Laboratories (Invitrogen, Carlsbad, CA). Rabbit anti-Cld-9 pAb (16196-1-AP) was bought from Protein Tech Group (Chicago, IL). Rabbit anti-Cld-11 pAb (AP06062PU-N) was ordered from Acris Antibodies (San Diego, CA). Antibody quality was assessed by Western blot of CPs or MVs. Only one specific band for Cld-1, -2, -3 (all 22 kDa) or Cld-9 (25 kDa) was observed in adult LVCP. The anti-Cld-4 pAb and anti-Cld-5 monoclonal Ab detected only one band (22 kDa) in adult MVs (Online Resource 2). The rabbit anti-Cld-5 antibody also selectively labeled parenchyma MVs and was used for double immunostaining with the endothelial cell antibody RECA-1. The rabbit anti-Cld-19 pAb, custom-produced by Zymed Laboratories as an IgG preparation, was a kind gift of Dr. Yu (Angelow et al. 2007). In our hands, the antibody stained the tight junctions of the thick ascending limb of Henle on rat kidney sections, as previously described in mouse kidney cortex (Angelow et al. 2007). It was not applicable to Western blot analysis of cerebral preparations. The mouse anti-RECA-1 mAb (MCA970GA), directed against a rat endothelial cell-surface antigen, and the rabbit anti-actin pAb (A-2066) were purchased from AbD Serotec (Oxford, UK), and Sigma (St-Louis, MO, USA), respectively.

Immunohistochemical analysis of claudins in rat brain

Rat brain sections (10 μm thick) were cut in a cryostat, mounted on glass-slides, air-dried at room temperature (RT), and immediately used for IHC or kept at -20°C . Slices were fixed in acetone/methanol (V/V) at -20°C for 90 s except for Cld-4. For this protein, sections were fixed in 4 % paraformaldehyde at RT for 10 min and microwave-treated (3×5 min at 600 W) in 0.01 M citrate buffer, pH 6 for epitope retrieval. After 1 h of saturation at RT in a blocking solution containing 0.2 % BSA, 0.2 % Triton X-100 and 10 % normal goat serum (NGS) in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), sections were incubated at 4°C overnight with primary antibodies diluted in a PBS solution containing 1 % BSA, 0.3 % Triton, 1 % NGS. Primary antibodies were diluted and used at a final concentration of 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for Cld-1, -2, -3, -4. The anti-Cld-5 mAb and pAb were used at 1.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Cld-9 pAb was diluted to 0.383 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and Cld-19 pAb to 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. In some cases, double labeling was performed with one of the anti-Cld pAb and the anti-RECA-1 mAb used at a final concentration of 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. After 5 washes for 10 min at RT in the Ab-solution without NGS, sections were incubated

with either Alexa Fluor[®] 488-conjugated secondary goat-anti-mouse Ab (A-10667), Alexa 555[®]-conjugated goat-anti-mouse secondary Ab (A-21424) or Alexa 555[®]-conjugated secondary goat-anti-rabbit Ab (A-21428) all from Invitrogen at a final concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at RT for 1 h. Diamidine-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI, 236276 from Roche Diagnostics) was used as fluorescent nuclear stain at 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in PBS. Sections were washed again four times in Ab-solution without NGS and rinsed once in PBS. Negative controls were performed by omitting the primary Ab. After mounting the slides with Fluoroprep (bioMerieux, Marcy l'Etoile, F), immunofluorescence was viewed and analyzed using a Zeiss fluorescence microscope equipped with a Digital Camera and the software AxioVs40 V 4.7.2.0. For direct comparison of expression and localization between either developmental stages or between 4VCP and LVCP at a given stage, appropriate sections were mounted on the same slide and treated simultaneously under identical conditions. Pictures were taken at the same exposure time to assess potential expression differences. The staining specificity of the custom-produced Cld-19 pAb was evaluated using a blocking peptide on brain slices. The IgG preparation was incubated with a tenfold molar excess of peptide that corresponds to the epitope recognized by the Ab (H-ERANSIPQPYRSGPSTAAREYV-OH) at 4°C for 8 h under agitation. The staining protocol was then performed as described above.

Immunohistochemical analysis of claudins in human fetal brain

Fetal brains were fixed in 4 % formaldehyde. The duration of fixation is provided in Table 1. Coronal slices of the supratentorial brain and horizontal slices of the brainstem and cerebellum were performed and embedded in paraffin. Sections (4 μm thick) were cut from the blocks with a Leica microtome (Leica Instruments GmbH, Hubloch, Germany) and transferred to SuperFrost Plus slides (VWR International bvba, Leuven, Belgium) for morphological and immunohistochemical studies. Hemalum phloxin saffron (HPS) staining was performed for morphological analysis. An automated IHC analysis of the sections was performed on a BenchMark[®] XT (Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ, USA) using anti-Cld antibodies at a final concentration of 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ according to the manufacturer's protocol, and revealed by avidin-biotin-peroxidase complex, and a Ventana kit including DAB reagent and an amplification system. Sections were counterstained with hematoxylin. The localization, continuity and intensity of Cld expression were assessed in all 13 cases.

Table 1 Description of human samples included in the study and claudin immunopositivity evaluation

| Case | WD | Clinical history | Fixation (days) | CLD-1 | | CLD-2 | | CLD-3 | |
|------|---------------------------------|---|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | | | | LVCP | 4 VCP | LVCP | 4 VCP | LVCP | 4VCP |
| 1 | 8 | Spontaneous abortion | 3 | + CA | + CA | + DA | + DA | + CA | + CA |
| 2 | 10 | Limb malformations | 3 | + CA | + CA | + DA | + DA | + CA | + CA |
| 3 | 10 | Spontaneous abortion | 7 | + CA | + CA | + DA | + DA | + CA | + CA |
| 4 | 16 | Spontaneous rupture of membranes | 13 | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA |
| 5 | 18 | Twin pregnancy Spontaneous rupture of membranes | 43 | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA |
| 6 | 20 | Acute chorioamnionitis | 40 | + CA | + CA | + CA | + CA | ± CA | ± CA |
| 7 | 20–21 | Twin pregnancy Late spontaneous abortion | 35 | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA |
| 8 | 21 | Acute chorioamnionitis | 67 | + CA | + CA | + CA | + CA | ± CA | ± CA |
| 9 | 22 | Acute chorioamnionitis | 8 | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA |
| 10 | 28–29 | Premature, pulmonary hypoplasia, refractory hypoxia | 58 | + CA | + CA | + CA | + CA | 0 | 0 |
| 11 | 38 | Postpartum death, SIDS | 54 | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA | ± DA |
| 12 | 39 | Postpartum death, SIDS | 17 | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA |
| 13 | 2 months and 17 days post-natal | SIDS | 38 | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA | + CA |

Immunolabeling was scored as follows: 0: no staining, ± : weak staining, + and ++: definite staining. *C* continuous, *D* discontinuous, *A* apico-lateral

LVCP choroid plexus from the lateral ventricle, *4VCP* choroid plexus from the fourth ventricle, *WD* weeks of development, *SIDS* sudden infant death syndrome

Protein content

Choroidal tissues and brain cortices were homogenized in Cell lysis buffer (9803 from Cell Signaling, Boston, MA) containing 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, igma, St. Louis, MO) with 10–15 strokes in a glass–glass homogenizer. Protein concentrations were determined by the method of Peterson (1977) using BSA for the standard curve.

Western blotting

Proteins were separated on 10 % Bis–Tris Criterion XT gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) run in MOPS buffer (Bio-Rad) at 80 V for 10 min, followed by 120 V for 2 h. The gel was blotted to 0.45 µm Whatman PROTRAN nitrocellulose membrane (# NBA085C, Perkin Elmer, Waltham, MA) in Tris–glycine transfer buffer (Euromedex, Souffleweyersheim, F), containing 20 % methanol for 50 min. After assessing transfer efficiency by Ponceau-red staining, the membrane was cut longitudinally to separate actin from the lower molecular weight ClDs and incubated in a saturation buffer (5 % skimmed milk, 0.1 % Tween 20 in Tris-buffered saline; TBS) at RT for 1 h. When antibody quality was tested, the membranes were kept in one piece. All primary anti-Cld antibodies were diluted in saturation

buffer at 1 µg/ml except Cld-9, which was used at 0.307 µg/ml. The rabbit anti-actin pAb was used at a final dilution of either 0.533 or 0.267 µg/ml, depending on the amount of protein loaded. Membranes were incubated at 4 °C overnight, then washed 3 × 10 min in TBS containing 0.1 % Tween-20 (TBST) at RT. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies from Jackson ImmunoResearch (Baltimore, MA, USA) were either goat-anti-rabbit (111-035-045) used at a final concentration of 0.04 µg/ml or goat-anti mouse (115-036-003) used at 0.08 µg/ml. After two washes in TBST and a final one in TBS, chemiluminescent HRP substrates (Immobilon Western from Millipore, Molsheim, France, for ClDs, and Pierce ECL substrate from Perbio Science, Brebière, France, for actin) were used and membranes were exposed to X-ray films (Biomax, Kodak Rochester, NY).

Results

The expression of TJ-associated proteins was assessed in rats at E19, P2, P9 and adult stages in LVCPs and 4VCPs by qRT-PCR. For comparison, the expression levels of these genes were also measured in cortical tissues at all stages, and in cortical MVs isolated from P9 and adult brain (Figs. 1, 7). Differences in y scale values between

graphs provide an approximation of the respective abundance of the various gene products (see “Materials and methods”). Overall, Cld-1, -2 and -3 were the most highly expressed Clds in the choroidal tissue and displayed a distinct specificity for this tissue in comparison to age-matched MVs and cortices (Fig. 1a). The latter tissue displayed 10- to 100-fold lower expression levels than CPs ($p < 0.001$). Cld-6, -9, -10, -11, -12, -19 and -22 were expressed at lower, but still significant levels in the choroidal tissue (Fig. 1b). While Cld-19 and Cld-22 displayed a high degree of choroidal specificity at all stages investigated (statistically different from age-matched cortex mRNA levels, $p < 0.001$ for P2, P9, adult), and Cld-9 followed a similar pattern of choroidal enrichment ($p < 0.05$ for LVCP and 0.01 for 4VCP at E19, $p < 0.001$ at P2 and in adult), Cld-6 was found enriched in CP as compared to cortex preparations only in the perinatal developmental stages ($p < 0.001$ at E19 and 0.001 for 4VCP at P2, Fig. 1b). Cld-4, -5, and -16, whose expression in the choroidal tissue was very low, were rather selectively enriched in the MVs forming the BBB (Fig. 1c). Cld-14 was not detected in any sample of CP, cortex and MV. Its mRNA was found in liver, used as positive control (data not shown). The developmental qRT-PCR analysis of Clds in CPs revealed overall high expression levels in the tissues sampled at prenatal and postnatal stages. We observed however variations in the choroidal expression and localization of Clds during development and investigated them in more detail using protein analysis when antibodies of sufficient quality were available.

Claudin-1 and -3 expression is high in both types of choroid plexus in the developing brain

Quantitative RT-PCR analysis showed that Cld-1 and -3 are already highly expressed in both LVCPs and 4VCPs of E19 and P2 rats compared to P9 and adult animals. Cld-1 and Cld-3 mRNA levels were not statistically different between 4V and LVCP at all stages investigated (Fig. 1a). Western blot analysis (see method section and Online Resource 2 for details on the quality of the antibodies used) confirmed the expression of Cld-1 in CPs of E19 and P2, and showed no obvious difference in protein levels between 4VCP and LVCP, or between stages (Fig. 2a). This result and all subsequent Western blot analyses presented have been confirmed on at least three batches of tissues. The cellular protein localization was then determined by IHC. Cld-1 was found strictly associated with the interepithelial junctions of both 4VCP and LVCP at all stages investigated (Fig. 2b–d). Cld-1 was not detected in the choroidal or parenchymal vessels at any stage of development.

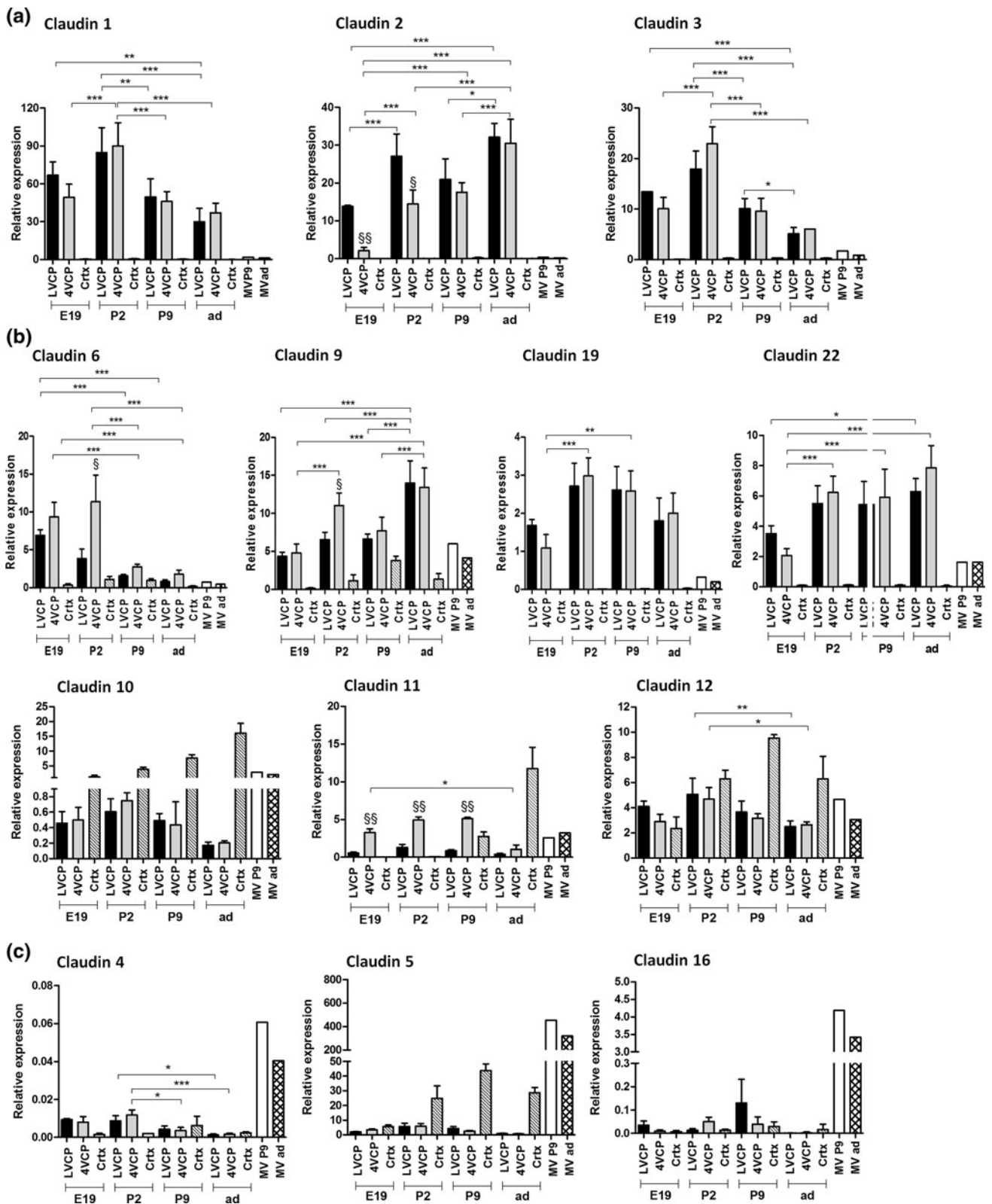
Western blot analysis of Cld-3 in CPs also confirmed the expression of the protein in E19 and P2 animals, and

Fig. 1 Developmental analysis of claudin transcript levels in choroid plexuses, cerebral cortex and cerebral microvessels of the rat. RT-PCR was performed on tissues sampled at four developmental stages. The results, expressed relative to the bacterial AraB gene added as an external standard, are shown as mean \pm SD, $n = 4$, except for MV, for which values represent the mean of two preparations. Gene expression levels did not differ by more than 13.8 % between the two age-matched MV preparations. The results are expressed as arbitrary units, and are all normalized to the expression level found for Cld-1 in one sample of LVCP obtained from P2 animals, and set arbitrarily at 100 (see “Materials and methods” for details of calculations). **a** Clds displaying the highest specific expression in CP throughout development. **b** Clds expressed at lower, but significant levels in the CP by comparison to other brain preparations. Some displayed a strong specificity for the choroidal tissue. **c** Clds specifically enriched in the MV preparations, see “Results” for a detailed description of the data. *, **, ***Statistical differences in expression levels between developmental stages, analyzed by one-way ANOVA followed by a Tukey’s multiple comparison test, $p < 0.05$, 0.01, 0.001, respectively. For clarity, only differences observed for LVCPs and 4VCPs are shown on the graphs. §, §§Statistical differences in expression levels between age-matched 4VCPs and LVCPs, two-tailed paired Student’s *t* test, $p < 0.05$ and 0.01, respectively. Other relevant statistical analyses are stated in “Results”. LVCP and 4VCP choroid plexus of the lateral and fourth ventricle, respectively, Crtx cerebral cortex, MV cerebral microvessels, E19 19-day-old embryo, P2 and P9 2-day-old and 9-day-old, respectively; ad adult

additionally showed a clear decrease of Cld-3 protein level in the CPs of adult animals (Fig. 3a). This reflects the strong and statistically significant down-regulation of Cld-3 mRNA observed between P2 and adult stages (Fig. 1a). IHC analysis showed that the protein is associated with the inter-epithelial junctions of both 4VCP and LVCP in developing animals (Fig. 3b, c, e, f). Cld-3 immunoreactivity was also observed in both CPs in the adult (Fig. 3g), with a lower intensity than in developing animals. The protein was not detected in the choroidal vessels (e.g. arrowheads in b). In contrast, parenchymal vessels were labeled (Fig. 3d), in line with the previously reported Cld-3 immunoreactivity in parenchymal vessels of the adult mouse brain (Wolburg et al. 2003). Cld-3 labeling was however weaker in parenchymal vessels than in the CP epithelium at all stages investigated.

The developmental profile of claudin-2 and -11 expression differs between the choroid plexuses of the lateral and fourth ventricles

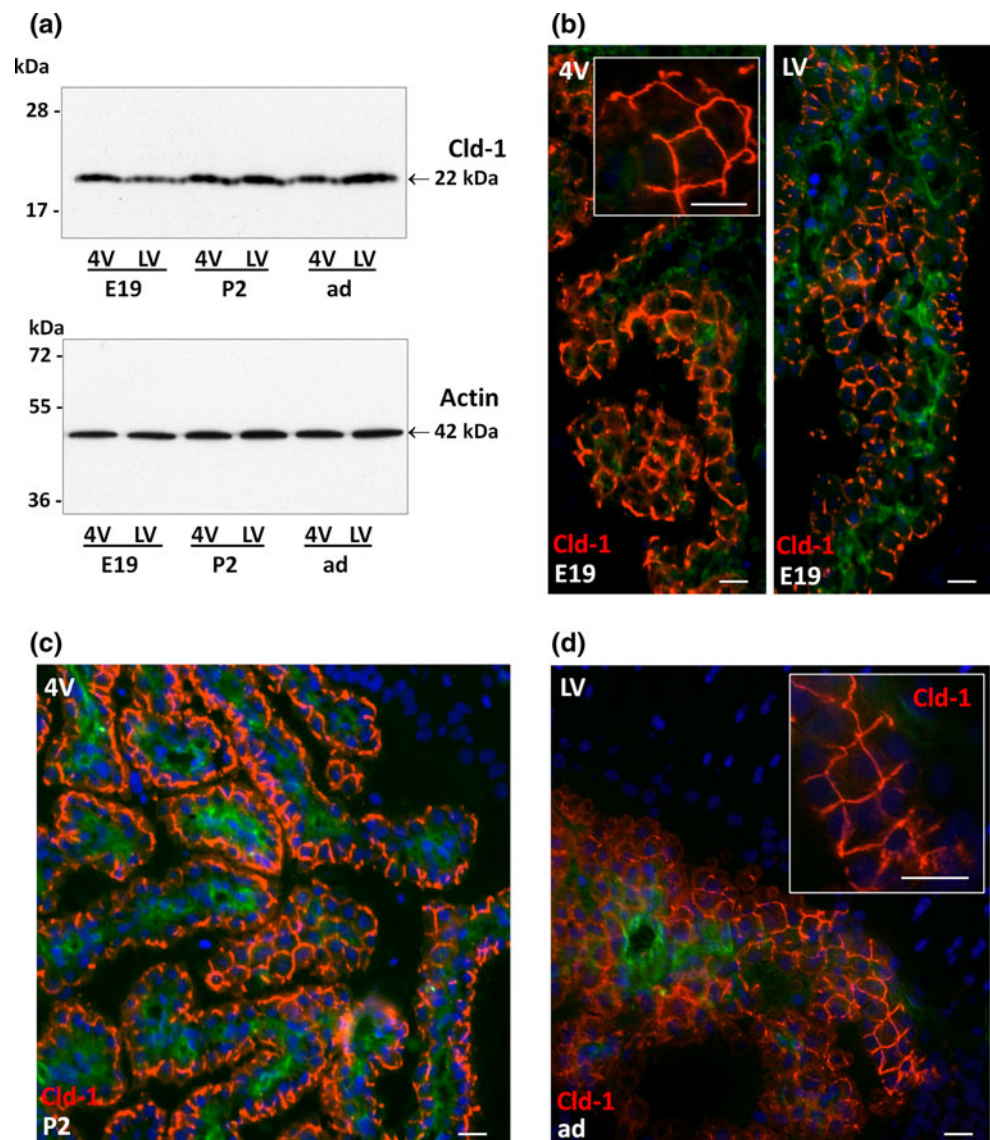
Cld-2 expression largely increased throughout development in the 4VCP. A developmental Cld-2 upregulation also occurred in the LVCP to a lesser extent, as mRNA levels in perinatal stages were already higher in this tissue than in 4VCP (Fig. 1a). These differences between either CPs or stages were reflected at the protein level. Western blot analysis showed a signal in LVCP of E19 rats, which became progressively more intense in older animals. Cld-2



was barely detected in 4VCP from E19 rats, and the band increased in intensity in older animals (Fig. 4a). Cld-2 immunoreactivity was associated with all intercellular

epithelial junctions in LVCP of E19 rats, but displayed a patchy, discontinuous pattern of lower intensity in 4VCP of the same animals (Fig. 4b). The difference between LVCP

Fig. 2 Western blot analysis and cellular distribution of claudin-1 in choroid plexus during rat brain development. **a** Representative Western blot of LVCP and 4VCP dissected from E19, P2, and adult animals (2 µg per lane). Cld-1 protein expression was steady throughout development in both types of plexuses (*upper panel* band at 22 kDa). Actin used as a loading indicator is shown in the *lower panel* (42 kDa band). **b–d** Cld-1 immunoreactivity (*red*) in CPs of the developing and adult brain. A strong signal was associated with epithelial cell membranes of both LVCP and 4VCP in E19 animals (**b left** and *right panel*, respectively). A similar signal was observed at later stages, as illustrated for 4VCP in a P2 animal (**c**), or LVCP in an adult rat (**d**). The *inserts* in **b** and **d** highlight the typical honeycomb pattern of choroidal epithelial cell junctions. Double immunolabeling with the anti-RECA-1 Ab (*green*) allowed visualizing choroidal vessels, and DAPI was used for nuclei staining. *Scale bars* 20 µm. *LV* and *4V* choroid plexus from the lateral and fourth ventricle, respectively, *E19* 19-day-old embryo, *P2* 2-day-old, *ad* adult



and 4VCP was less prominent at P2, as Cld-2 labeling became continuous throughout the TJ network in the latter tissue (Fig. 4c). Cld-2 immunoreactivity was intense and regular in all CPs of P9 and adult rats (Fig. 4d, e). No staining of the MV was observed in the choroidal stroma or the brain parenchyma at any developmental stage.

A mirror image was observed when Cld-11 expression levels were compared between LVCP and 4VCP (Fig. 1b). Cld-11 gene was expressed at a much higher levels in 4VCP than in LVCP at all E19, P2 and P9 stages. In adult animals, Cld-11 expression level decreased in CPs, while it increased largely in the cortex. This likely reflects axonal myelination, Cld-11 being a crucial component of the interlamellar strands in oligodendrocyte myelin sheaths (Morita et al. 1999a). These differences of choroidal expression could not be assessed at the protein level, as a Western blot signal could only be obtained on medulla

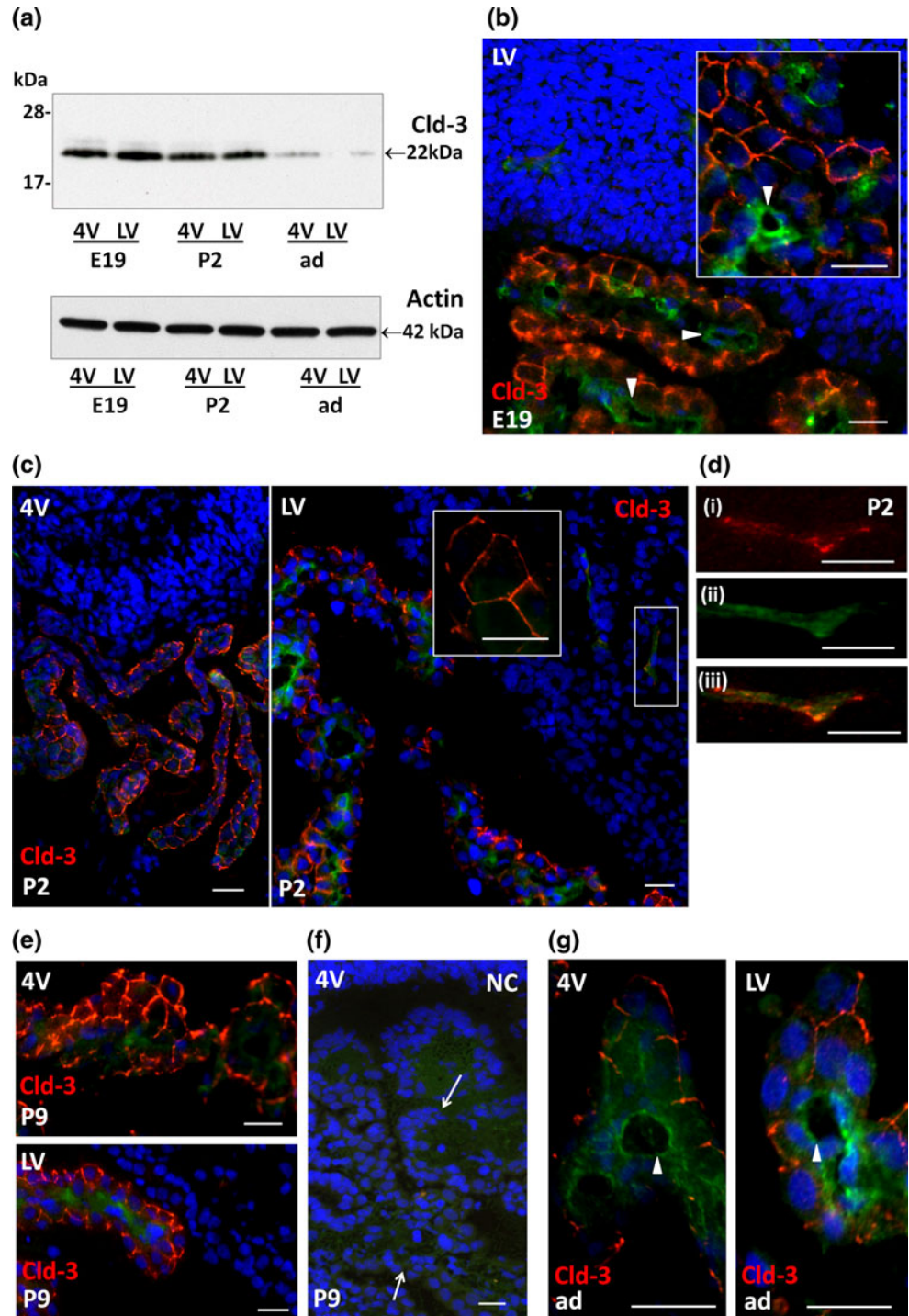
samples from myelinated brains. No other Cld showed such a difference in expression between LVCP and 4VCP.

Claudin-9 and -19 are selectively enriched in choroid plexus epithelial cells

Among the four additional Clds whose mRNAs were selectively enriched in CPs in comparison to the cortex or MV, Cld-6 displayed higher choroidal expression levels at perinatal than at P9 and adult stages, while Cld-22 was expressed more prominently in both CPs from P2 onwards (Fig. 1b). The protein level and cellular localization of these two Clds could not be investigated due to the lack of adequate antibodies. Cld-9 expression levels in CPs increased from E19 to adult stage (Fig. 1b). This profile was also reflected at the protein level in both 4VCP and LVCP as illustrated by the large increase in Cld-9 signal by

Fig. 3 Western blot analysis and cellular distribution of claudin-3 in choroid plexus and cerebral parenchyma during rat brain development.

a Representative Western blot of LVCP and 4VCP dissected from E19, P2, and adult animals (10 µg per lane). Cld-3 protein levels decreased in both types of CP during development (*upper panel* band at 22 kDa). Actin used as a loading indicator is shown in the lower panel (42 kDa band). **b–g** Cld-3 immunoreactivity (*red*) in the developing and adult brain. Double immunolabeling with anti-RECA-1 Ab (*green*) allowed visualizing choroidal and parenchymal vessels (e.g. arrowheads in **b**, **g**), and DAPI was used for nuclei staining. During perinatal stages of development, immunodetection revealed a distinct signal associated with the CP epithelial cell membranes as illustrated for LVCP in E19 (**b**), or in P2 animals (**c**). The *inserts* in **b** and **c** highlight the typical honeycomb pattern of choroidal epithelial cell junctions. The area delimited by the *rectangle* in **c**, is enlarged in **d**, which shows Cld-3 in a parenchymal vessel of the developing brain (*i* Cld-3 (*red*), *ii* RECA-1 (*green*) and *iii* merge staining). Cld-3 immunoreactivity was observed at the epithelial junctions in CPs of P9 animals (**e**), and could still be detected in adult CP (**g**). **f** A negative control (NC), run in the absence of primary antibody, for a P9 animal (*arrow* CP). Scale bars 20 µm. Abbreviations as in Fig. 2



Western blot between P2 and adult animals (Fig. 5a). The immunohistochemical analysis revealed a patchy signal for Cld-9 already at E19, which was associated with the epithelium in both CPs (Fig. 5b). The labeling became continuous at all intercellular epithelial junctions in P2 animals (Fig. 5c, insert), and was also observed throughout the CPs in adult animals (Fig. 5c). It was not found associated with

parenchymal vessels at any stage (e.g. arrowheads in Fig. 5b).

Cld-19 gene level of expression was close to the adult level throughout development as assessed by qRT-PCR (Fig. 1b). The choroidal localization of the protein determined by IHC showed its association with the epithelial junctions in both LVCP and 4VCP at all stages investigated

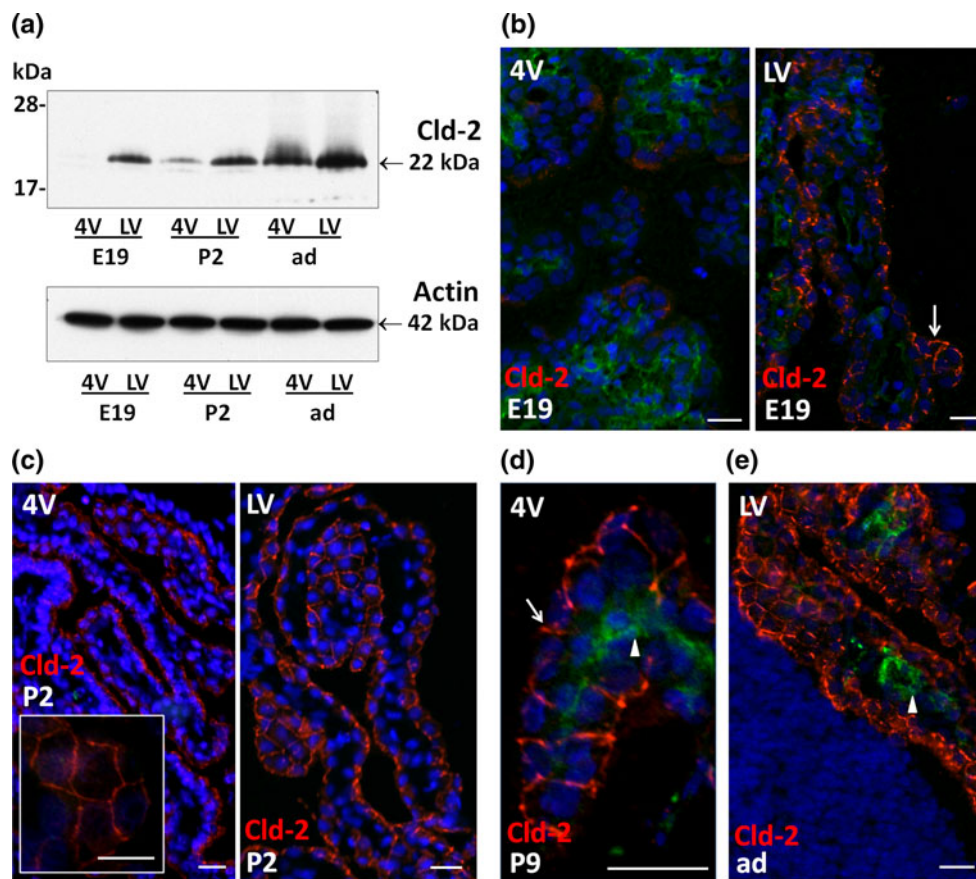


Fig. 4 Differential expression of claudin-2 in choroid plexus during rat brain development. **a** Representative Western blot of LVCP and 4VCP dissected from E19, P2, and adult animals (10 μ g per lane). Cld-2 expression increased in CPs during development, and was distinctively higher in LVCP than in 4VCP of E19 and P2 animals (*upper panel* band at 22 kDa). Actin used as a loading indicator is shown in the *lower panel* (42 kDa band). **b–e** Cld-2 immunoreactivity (*red*) in the developing and adult brain. LVCP and 4VCP sections have been labeled simultaneously and pictures generated with identical camera settings. Cld-2 staining was associated with the

epithelium throughout the LVCP of E19 animals (*arrow*), while the staining in 4VCP was faint and patchy, with large portions of the epithelium remaining unlabeled (**b**). In P2 animals (**c**), the staining was more homogeneous in 4VCP and became continuous between epithelial cells (*insert*), as in the LVCP (*right panel*). The epithelial staining was strong in all CPs at P9 (**d arrow**) and in adult animals (**e**). In **b**, **d**, **e** double immunolabeling with anti-RECA-1 Ab allowed visualizing the choroidal vessels unlabeled by the anti-Cld-2 Ab (*arrowheads*). DAPI was used for nuclei staining. Scale bars 20 μ m. Abbreviations as in Fig. 2

(Fig. 5d–f). Ab neutralization with the immunogen peptide completely abolished the signal (Fig. 5f). Cld-19 immunoreactivity was absent from the choroidal vessels (e.g. arrowheads in Fig. 5f). It was neither detected in the parenchymal vessels nor in the neuropil at any stage of development (data not shown).

Claudin-5, -4, and -16 are specific for the blood–brain barrier in the developing brain

Cld-5 is a well-known landmark of the BBB. As expected, its expression level was high in cerebral MVs isolated from adult as well as from P9 animals. The more than tenfold difference in Cld-5 gene expression between cortex and MV confirms the endothelial specificity of this protein.

In cortical tissue from E19 animals, mRNA expression levels were significantly lower ($p < 0.001$, Tukey's multiple comparison test) than in other developmental stages (Fig. 1c). As IHC revealed a clear labeling of capillaries by anti-Cld-5 antibodies already at this fetal stage of development (Fig. 6a, b), this most likely results from the lower density of the capillary network in the brain of immature rats (Caley and Maxwell 1970). In contrast, qRT-PCR analysis showed low mRNA levels associated with the choroidal tissue. IHC of Cld-5 within this tissue was performed with the monoclonal antibody and showed that the protein is associated with the larger, penetrating vessels in the choroidal stroma. A fainter signal was also observed in some terminal vessel loops, but no signal was associated with the epithelium in our experimental conditions (Fig. 6c, d).

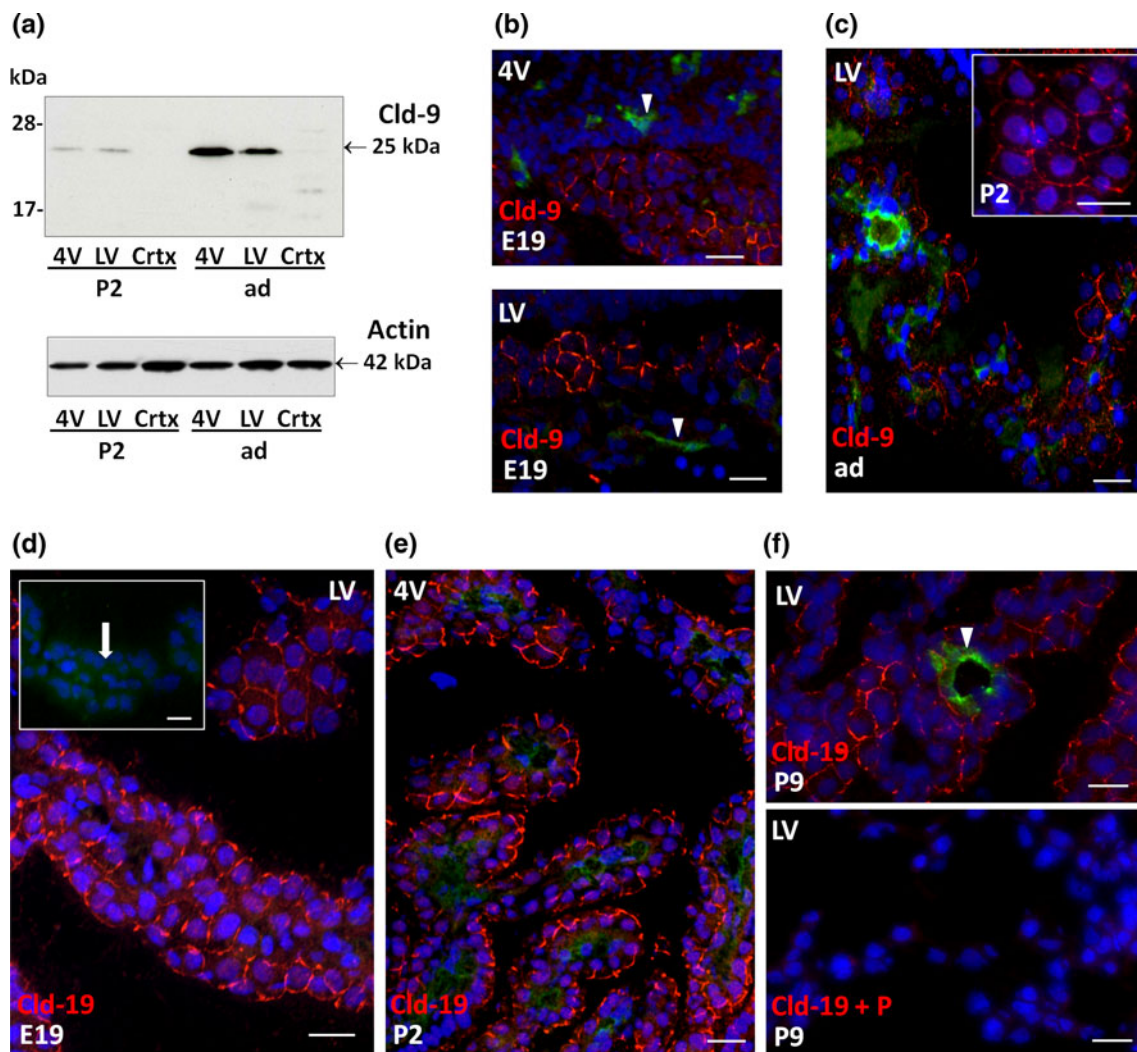


Fig. 5 Detection of claudin-9 and claudin-19 in choroid plexus during rat brain development. **a** Representative Western blot of LVCP, 4VCP and cortex dissected from P2, and adult animals (10 μ g per lane). Cld-9 protein was enriched in both 4V and LV compared to the cortex, and was higher in adult as compared to P2 animals (*upper panel* band at 25 kDa). Actin used as a loading indicator is shown in the *lower panel* (42 kDa band). **b**, **c** Cld-9 immunoreactivity (*red*) in the developing and adult brain. A distinct signal was associated with the CP epithelial cell membrane in selected areas of both LVCP and 4VCP in E19 animals (**b**). The staining was present at all intercellular junctions in P2 animals (*insert c*), and was observed throughout the CPs in adult animals (**c**). It was not associated with parenchymal vessels (*arrowheads*). **d–f** Cld-19 immunoreactivity (*red*) in the

developing and adult brain. Choroid plexus epithelial cell membranes were distinctly labeled in E19 animals (**d**), displaying a typical honeycomb pattern. The *insert* shows a negative control obtained by omitting the primary antibody. The *arrow* localizes the CP. A strong signal was also observed in the epithelium at later stages, as illustrated for 4VCP in P2 (**e**) and LVCP in P9 (**f upper panel**) animals. No choroidal staining was observed when the Ab was preincubated with excess of immunogen peptide (*P*) (**f lower panel**). The signal was absent from the choroidal vessels (*arrowhead f*). In **b**, **c**, **f**, double immunolabeling with anti-RECA-1 Ab allowed visualizing the choroidal vessels. DAPI was used to stain nuclei. Scale bars 20 μ m. *Crtx* cerebral cortex. Other abbreviations as in Fig. 2

In addition, our qRT-PCR data identified Cld-16 and Cld-4 as highly enriched in the capillary fractions of both adult and P9 animals compared to cortical or choroidal tissue. To date, no information could be generated concerning Cld-16 protein level or localization in the brain. Cld-4 mRNA levels were very low compared to Cld-5 levels (Fig. 1c). The presence of Cld-4 protein in this fraction was confirmed by Western blot analysis (Fig. 6e) and by IHC in developing and adult animals (Fig. 6f–h).

Expression of occludin and zonula occludens proteins in barriers of the developing brain

Occludin is a transmembrane TJ component at both the BBB and BCSFB. Accordingly, qRT-PCR showed high expression levels for this TJ protein in all LVCP, 4VCP and MV preparations compared to cortex. Levels did not change throughout development (Fig. 7). Transcripts for the three ZO proteins that bind Clds through their PDZ

domain were found in the CPs throughout development. While the highest expression was seen for ZO-2 with no selectivity among the preparations analyzed, ZO-1 transcript displayed a clear enrichment in the MV preparations, and ZO-3 mRNA, found in both barriers, was selectively enriched in developing CPs, yet at very low levels.

Claudin-1, -2 and -3 are detected at tight junctions of the blood–CSF barrier in human fetal brain

The choroidal expression of the three major Clds highly expressed in the rodent BCSFB, Cld-1, -2 and -3, was investigated by IHC on sections obtained from 13 brains of human fetuses and neonates. Table 1 summarizes the clinical data, and indicates the duration of fixation prior to paraffin embedding of the tissues. HPS (not shown) or hematoxylin (Fig. 8a) staining of the tissue, showed morphological differences between LVCP and 4VCP, especially at the earlier stages investigated. LVCPs were characterized by a markedly enlarged core with an “edematous” appearance and were lined with columnar to cuboidal cells with a clear cytoplasm. Conversely, 4VCPs were composed of a thinner papillary core lined with columnar to cuboidal cells with an eosinophilic cytoplasm. Despite these histological differences, a clear apico-lateral staining typical of intercellular choroidal epithelial junctions was observed for Cld-1 throughout the surface of the epithelium in both LVCP and 4VCP already at 8 weeks of development (WD8) which was the earliest fetal stage analyzed (Fig. 8a). This staining was consistently seen at all developmental stages (Fig. 8; Table 1).

A weak and discontinuous apico-lateral Cld-2 immunoreactivity was associated with the CP epithelium in brain sections obtained from WD8 and -10 (Fig. 8a, inserts). This irregular staining became continuous at later stages (Fig. 8b, c; Table 1). A typical TJ-associated labeling was also observed in the choroidal epithelium of both LVCP and 4VCP for Cld-3. This staining was faint but continuous throughout the epithelium. Its intensity varied to some extent from case to case. This was independent of the gestational age and could be related to the duration of fixation (Table 1). The choroidal specificity of Cld-1, -2 and -3 immunoreactivity was strengthened by the absence of staining of the contiguous neuroependyma. Choroidal vessels (e.g. Fig. 8c, arrowheads), and brain parenchyma were negative for these Clds in all 13 cases investigated.

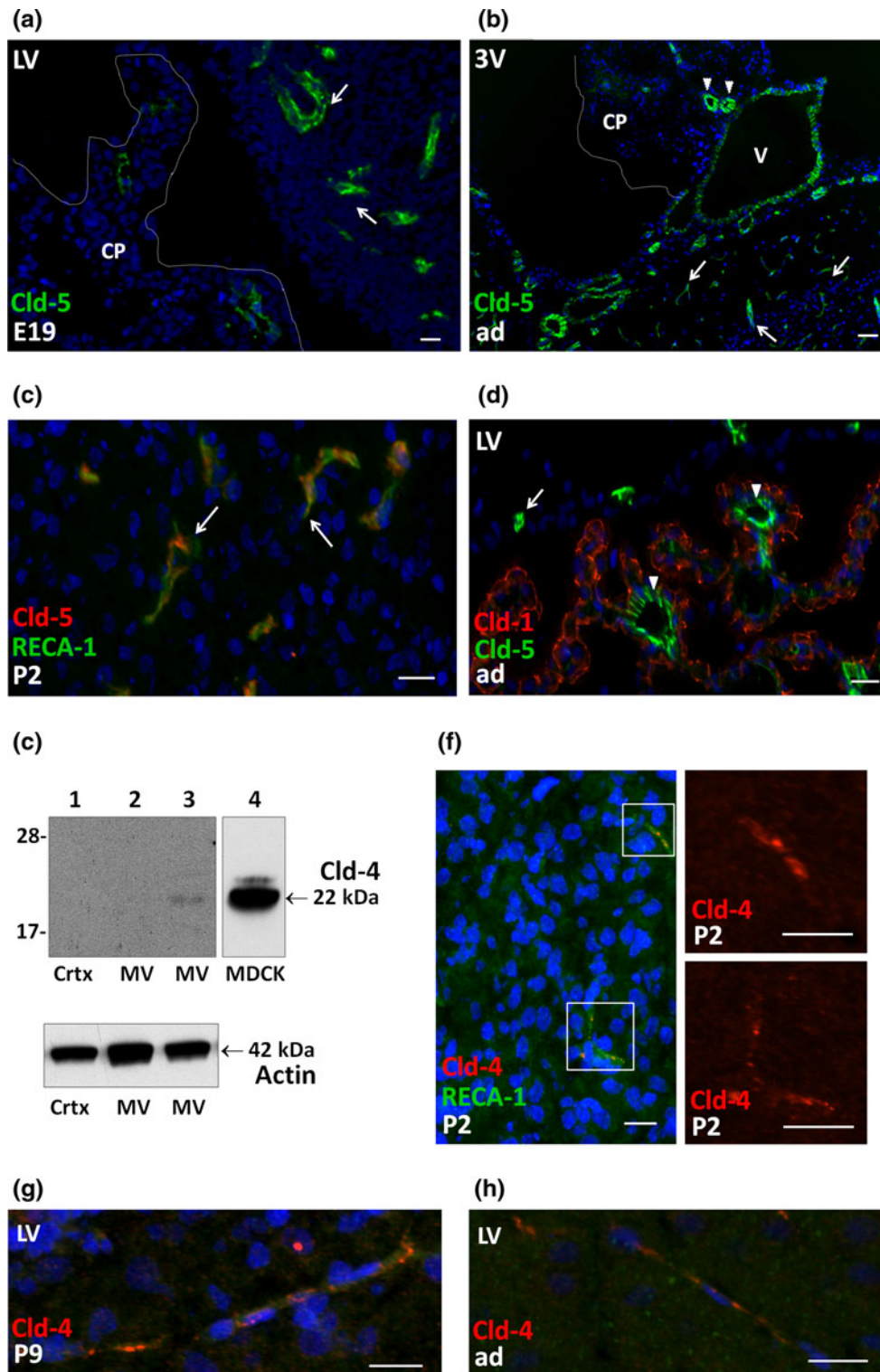
Discussion

Clds are transmembrane proteins that form the basis of TJ strands in both endothelial and epithelial cells. The identity of the main Clds located in TJs of the BCSFB remained so

Fig. 6 Claudin-5 and claudin-4 are expressed in endothelial cells in the developing brain **a–d**. Cld-5 immunoreactivity in the developing and adult brain. Parenchymal vessels are labeled (green) in E19 (arrows **a**) or adult (arrows **b, d**) animals. In **c**, the anti-Cld-5 polyclonal antibody was used to show the colocalization of the TJ protein (red) with the endothelial marker RECA-1 (green) in a P2 animal. In all CPs immunodetection revealed a signal associated with the largest vessels penetrating the choroidal stroma (arrowheads **b, d**), but not with the choroidal epithelium, labeled in red by anti-Cld-1 Ab (**d**). Note that all cisternal vessels such as the vein of Galen are also labeled by anti-Cld-5 Ab. DAPI was used for nuclei staining. **e** Representative Western blot of Cld-4. Brain cortex (lane 1 20 µg) and MV (lanes 2 and 3 40 µg) were isolated from adult animals. Lane 4 was loaded with MDCK (10 µg) as positive control. A low, but specific Cld-4 signal was detected in MV (upper panel lane 3 band at 22 kDa), but not in cortex or in MV when the primary antibody was omitted (lane 2). Actin used as a loading indicator is shown in the lower panel (42 kDa band). Due to the high expression of Cld-4 in MDCK cells, lane 4 was treated separately from the other lanes for HRP detection. **f–h** Cld-4 immunoreactivity (red) in the developing and adult brain. Double immunolabeling with anti-RECA-1Ab (green) allowed visualizing the parenchymal vessels that were positive for Cld-4 in P2 animals (**f** left panel). Enlargements of Cld-4 staining associated with the two vessels are shown in the right panels. **g, h** Parenchymal vessels labeled for Cld-4 in P9 and adult rat brain. DAPI was used for nuclei staining. Scale bars 20 µm. **v** choroid plexus of third ventricle, **CP** choroid plexus tissue, **v** vein of Galen. Other abbreviations as in Fig. 2

far uncertain as the anti-Cld-1 antibody used in previous immunohistochemical investigations was later shown to cross-react with other Clds (Wolburg et al. 2003). By combining qRT-PCR analyses with the use of specific antibodies that discriminate between Cld-1, -2 and -3, we have been able to demonstrate that besides Cld-2, already identified in CP (Lippoldt et al. 2000), both Cld-1 and Cld-3 participate into the molecular structure of junctions between choroidal epithelial cells in the rat BCSFB. Cld-1 displayed the highest expression among all Clds in the CPs. Cld-1, -2, and -3 were highly enriched in both LVCP and 4VCP, compared to brain capillaries or brain tissue, and located at the choroidal epithelial junctions.

In addition to these three proteins, and to Cld-11 previously described in mouse (Wolburg et al. 2001), this work identifies Cld-6, -9, -10, -12, -19, and -22 as additional Clds expressed in the CP. The expression of Cld-6, -9, -19 and -22 was highest in the choroidal tissue compared to MVs and cortex, especially during perinatal stages of development. In line with their involvement in TJ complexes at the BCSFB, immunoreactivity of Cld-9 and -19 was localized at intercellular junctions of the epithelium in both LVCP and 4VCP. The large number of Clds associated with the choroidal tissue at the stage E19, and the concurrent expression of occludin and of ZO proteins necessary for the recruitment of Clds to the tight junction strands (Umeda et al. 2006), are in line with the apparent ability of the epithelial junctions to impede the diffusion of both large and small organic compounds, such as proteins

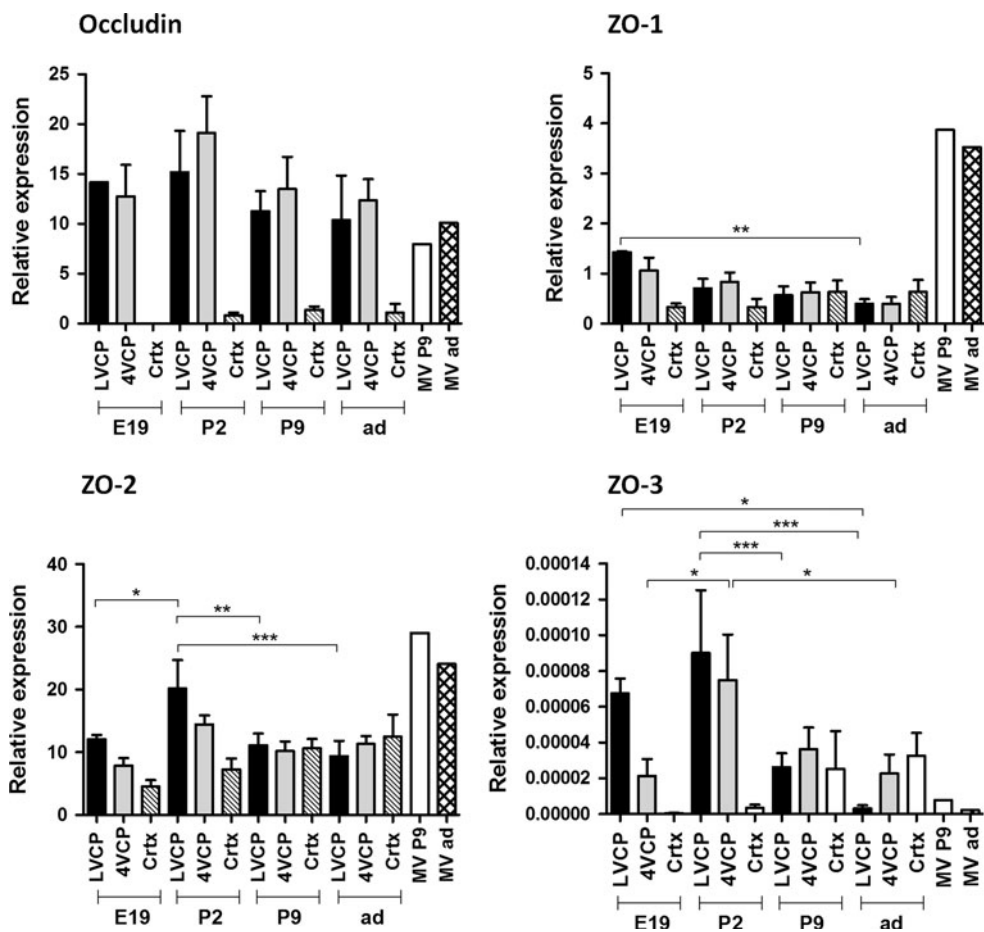


and low molecular weight dextrans at early stages of development in *Monodelphis domestica* (Ek et al. 2003, 2006) and in rat (Johansson et al. 2006). Taken together, these data support the concept that a barrier to paracellular transfer between blood and CSF is essential early during

development (Johansson et al. 2008b; Saunders et al. 1999, 2012).

The sealing property of TJs results from homo- or heterotypic interactions between Clds of adjacent cells, as well as from lateral oligomerization of Clds within each

Fig. 7 Developmental analysis of occludin and zonula occludens protein transcript levels in choroid plexus, brain cortex and cerebral microvessel of the rat. RT-PCR was performed on tissues sampled at four developmental stages. Moderate (ZO-1, ZO-2) to high (occludin) expression levels were found in both CPs and MV. Very low levels of ZO-3 were detected in both tissues. ZO-3, like occludin were distinctively enriched in blood–brain interfaces; see “Results” for a detailed description of the data. Data normalization, data expression, and statistical analysis are as described in Fig. 1

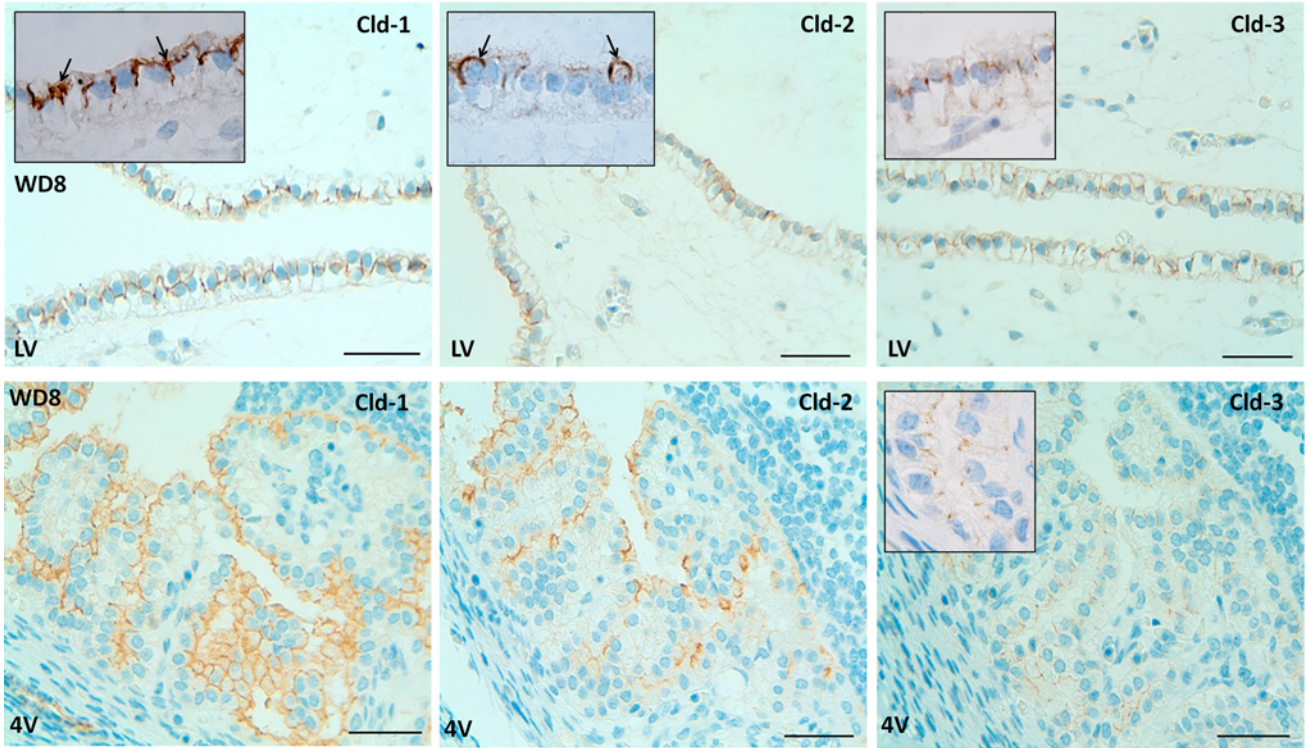


membrane into strands. These proteins contain a short intracellular cytoplasmic amino-terminal sequence followed by a large extracellular loop (EL1), a short intracellular loop, a second extracellular loop (EL2) and a longer C-terminal cytoplasmic tail. EL1 influences charge and ion selectivity (see *infra*), while EL2 is important for both Cld oligomerization and cell–cell adhesion (Colegio et al. 2002; Coyne et al. 2003; Daugherty et al. 2007). The identity and relative proportion of Clds within a TJ complex, and the identity of the different cytoplasmic and accessory proteins with which they interact, determine the degree of tightness of a cellular barrier (Overgaard et al. 2011). It can be low as in the case of the kidney epithelium (Gunzel and Yu 2009) or high as in the microvascular endothelium of the BBB (Huber et al. 2001; Nitta et al. 2003). Clds have been classified into two subcategories. The pore-forming Clds, which include Cld-2, -10, -16, allow the charge-selective paracellular diffusion of inorganic ions, and decrease transcellular electrical resistance. They may also participate in a size-selective diffusion of non-charged molecules. In contrast, the sealing Clds such as Cld-1, -3 -4 -5, -11 restrict the paracellular permeability and are considered as barrier-tightening Clds (Original references listed in Online resource 3. For review, Van

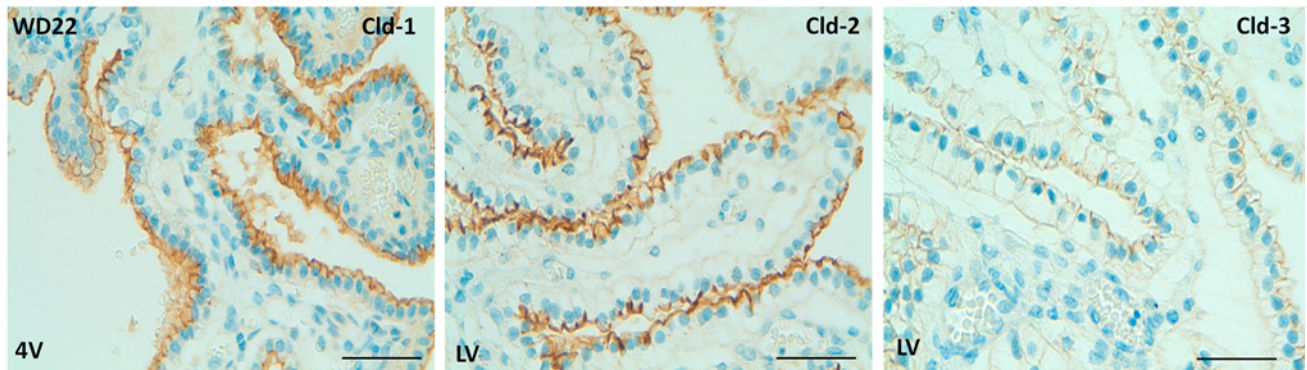
Itallie et al. 2006; Krause et al. 2008; Overgaard et al. 2011; Yu et al. 2009). In CP, the relative proportion of the different Clds forming TJs differs between developing and adult animals, suggesting that the functions supported by these junctions are developmentally regulated. We

Fig. 8 Immunohistochemical detection of claudins in choroid plexuses of developing human brain. Immunoreactivity of Cld-1, -2, and -3 is presented on the left, central, and right panels, respectively, with hematoxylin counterstaining. **a** Staining of a WD8 fetal brain. Cld-1 labeling, observed in both LVCP and 4VCP, was continuous and localized apically at intercellular junctions of the epithelium (arrows in inserted high magnification micrograph). Cld-2 immunoreactivity displayed a similar apical, but patchy pattern in both LVCP and 4VCP. The higher magnification (insert in LVCP) illustrates the discontinuous labeling (arrows). Cld-3 was also detected in the epithelium of both CP (arrows). Inserts are higher magnifications highlighting the continuous staining pattern. **b** Staining of a WD22 fetal brain. Cld-1 immunoreactivity was present at all epithelial junctions (shown in 4VCP). A continuous apical labeling of the epithelium was observed for Cld-2 (LVCP is shown). Cld-3 labeling was faint but continuous in LVCP epithelial cells. **c** Staining of a WD39 fetal brain. A distinct and continuous labeling of the choroidal epithelium was observed for all Cld-1 (shown for LVCP), -2 (shown for 4VCP), and -3. The continuous signal for Cld-3 was only associated with the epithelium (arrows) and not with stromal vessels (arrowheads in LVCP). The insert shows a similar Cld-3 staining for 4VCP. Abbreviations as in Fig. 2. Scale bar 50 μ m

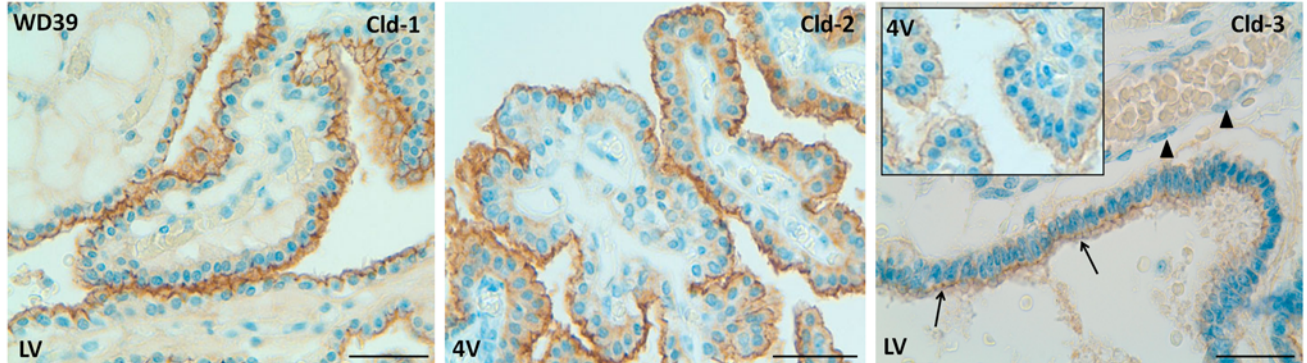
(a)



(b)



(c)



observed in both CPs an increase of Cld-9, -22, and mostly Cld-2 gene expression, confirmed by Western blot for Cld-9 and -2, between the embryonic stage E19 and the later developmental stages. Conversely, the expression of Cld-6 and Cld-3 was significantly down-regulated in adult rats compared to perinatal animals, concomitantly with a decrease in Cld-3 protein level. Cld-3 is considered a sealing component of the TJ towards mono- and divalent ions as well as non-charged small solutes (Milatz et al. 2010), while Cld-2 was described as a monovalent cation-selective pore-forming junctional protein displaying a high selectivity for Na^+ and K^+ (Furuse et al. 2001; Amasheh et al. 2002; Yu 2009). Its overexpression in MDCK cells increases the transfer capacity of tight junctions for small (up to 250 Da) organic compounds (Van Itallie et al. 2008). It was also described as a paracellular water channel (Rosenthal et al. 2010). Thus, the mirror image of Cld-2 and Cld-3 developmental expression profile in the choroidal epithelial monolayer suggests that the BCSFB is actually less permeable to selected ions or small molecular weight compounds in developing brain than in adult.

This CP specific developmental regulation of Clds could be related to the CSF secretory function of this tissue. The choroidal CSF secretion rate increases prominently after birth in mammals (Catala 1997). In adult CSF secretion is driven by the apically located Na^+/K^+ -ATPase and carbonic anhydrase II, which are both up-regulated during perinatal brain development in rat (Johansson et al. 2008a). CSF secretion results from a complex coordinated transport of various inorganic anions and cations across the choroidal epithelial monolayer, leading to transcellular fluxes of Na^+ , Cl^- and HCO_3^- from the blood to the CSF. Our current understanding of CSF secretion implies that only the transfer of K^+ , necessary to provide adequate K^+ levels in the CSF, occurs via the paracellular route (Damkier et al. 2010). Thus, the pore-forming Cld-2, whose upregulation in CP parallels the increased rate of CSF secretion, may be involved in K^+ paracellular movement. Water movement, which is driven by ion exchanges across the choroidal epithelium, was thought to occur transcellularly through aquaporin1 channels. Recently this view was challenged by the phenotypic analysis of aquaporin1 knockout animals. This and other osmolarity data point to mechanisms other than aquaporin-related pathways in CSF water secretion, and revives the paracellular pathway as a route for water transfer from blood to CSF (reviewed in Damkier et al. 2010). In this context a role for Cld-2 in paracellular water movement across the BCSFB, as observed in MDCK cells (Rosenthal et al. 2010) is another appealing hypothesis that could explain the developmental regulation of this Cld.

The selective expression of Cld-19 in choroidal epithelial cells is another common feature that this barrier shares with the kidney epithelium along with a number of

transport systems. In the peripheral organ, Cld-19 associates with Cld-16 in selected areas of the thick ascending limb of the loop of Henle to form pores for cations including Na^+ and the divalent cations Ca^{2+} and Mg^{2+} (Angelow et al. 2007; Hou et al. 2008, 2009). In contrast, in TJ-like structures of peripheral myelinating Schwann cells, Cld-19 acts as a barrier to cations, and thus achieves the electrical sealing of myelin sheaths within the internodal region, which is necessary to maintain saltatory conduction (Miyamoto et al. 2005). In the brain, we found that Cld-16 is localized at the BBB-forming MVs rather than at CPs. Choroidal Cld-19 is therefore more likely to act as a barrier towards Na^+ and divalent cations rather than as a pore-forming Cld. This hypothesis is in accordance with the existence of an unidirectional, energy-dependent blood to CSF Ca^{2+} and Mn^{2+} transport across the CP epithelium (Schmitt et al. 2011), whose efficiency depends on a closed paracellular pathway to these cations. The sealing function of Cld-19 towards selected cations at the choroidal tight junctions yet remains to be experimentally demonstrated, and the capacity of Cld-19 to homo- or heterodimerize with Clds other than Cld-16 needs further investigations.

Like Cld-19 in Schwann cells, Cld-11 fulfills electrical sealing functions in myelinating oligodendrocytes (Morita et al. 1999a). Cl-9 acts as a paracellular permeability barrier towards Na^+ and K^+ in the cochlea (Nakano et al. 2009). Cld-9 and -11 may have similar functions in the choroidal epithelium and, in conjunction with Cld-19, may confer upon the BCSFB junctions a sealed phenotype towards non-specific cation leakage. The reason for the reverse developmental regulation of Cld-9 and Cld-11 remains however to be clarified.

Another unexpected finding was the reverse ratios in LVCP to 4VCP expression levels for Cld-2 and -11 during the perinatal period. Very few differences between the various CPs have been documented, partly because LVCPs are preferentially studied. Our results point to such differences, whose functional significance remains to be determined. Evaluation of the respective contribution of LVCPs and 4VCPs to CSF secretion around birth could support the potential involvement of Cld-2 in CSF secretion.

Overall, the developmental differences in tight junction gene expression that we observed at the BCSFB appear to be necessary for physiological adaptation and/or microenvironmental changes during brain development, rather than reflecting an immaturity of the barrier.

The three most highly expressed Clds (Cld-1, -2 and -3) in rat CPs were also examined by immunohistochemistry in CPs of human fetuses of different gestational stages. Human data paralleled the findings observed in rat. Immunoreactivity of all three Clds was localized at the epithelial tight junctions in both LVCP and 4VCP at all

stages. Cld-1 and -3 staining was already continuous throughout the intercellular regions of the choroidal epithelium from the earliest WD8 stage. This is in accordance with a previous study showing the apical localization of Cld-1 in CP of human embryos (Anstrom et al. 2007). Cld-2 signal displayed a patchy pattern at that early time before it became continuous around WD16. In human as in other mammals, CPs appear in the order of the fourth, then lateral ventricle. Given that they form around the WD 6–7 stage (Shuangshoti and Netsky 1966), our data imply that a restrictive and selective barrier exists in human fetuses between blood and CSF, very rapidly after the CP primordium starts to differentiate. The research focus on Clds has always been on their role in tight junction structure. However, the plethora of Clds revealed by this study, their differential expression in the two types of CP and their age-related regulation suggest that there remain other so far undiscovered functions for some of these Clds.

With respect to TJ proteins at the BBB, we showed that, in addition to the previously reported Cld-5 (Morita et al. 1999b), brain parenchymal MVs selectively express Cld-16, as well as Cld-4 at lower levels. Both Cld-5 and -4 genes, considered as sealing Clds, were expressed in E19 or P2 animals, in line with the observation that the BBB is already impermeable to polar tracers in the developing brain (Ek et al. 2006). We also detected mRNAs for Cld-3, -9, -10, -12 and -22 in MVs prepared from P9 and adult rat brain, in accordance with the previous molecular analysis realized on mouse brain endothelial cells (Nitta et al. 2003; Ohtsuki et al. 2008). Cld-1 was not detected in brain vessels at any stage of development, neither in rat nor in human. This confirms the findings of a previous study performed on human embryos (Anstrom et al. 2007). The significance of the pore-forming Cl-10 and Cl-16 expression at the BBB, characterized by a high transendothelial electrical resistance is unclear.

Much evidence exists for modulation of Clds in response to inflammation, infection or oxidative stress, gathered from in vitro cell cultures or in vivo studies in the adult. Cld-3 was down-regulated in the inflamed BBB in a mouse model of multiple sclerosis (Wolburg et al. 2003), and was shown to be specifically sensitive to H₂O₂ exposure in epithelial gastric cells (Hashimoto et al. 2008). Oxidative stress induced by intracerebral HIV gp120 protein injection in the caudate putamen of rats increased the expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 which in turn induced a loss of Cld-5 immunoreactivity (Louboutin et al. 2010). Clds can also play a role in infectious diseases by mediating toxin deleterious effects or triggering virus cellular entry. A receptor site for *Clostridium perfringens* enterotoxin, present on the EL2 segment of Cld-3 and Cld-4, initiates the process leading to ileal epithelial cell dysfunction and necrosis. Cld-1, and possibly Cld-6 and -9

have been identified as co-receptors interacting with the tetraspanin protein CD81 to mediate the internalization of hepatitis C virus in the liver (Evans et al. 2007; Zheng et al. 2007). This mechanism may hold true for the brain or CSF in which the virus has been found (Wilkinson et al. 2009). Brain damage induced by perinatal injury often involves oxidative stress, inflammation or infection episodes (Dammann and Leviton 1999; Hagberg et al. 2012). An alteration of choroidal epithelial tight junctions triggered by such events would lead to an impairment of the BCSFB and thus of the cerebral homeostasis that is necessary to normal brain development. As perinatal injury can have dramatic consequences for brain development, a careful evaluation of Cld deregulation at blood–brain interfaces is therefore called for.

In summary, the expression pattern of Clds, occludin and zonula occludens proteins in LVCP and 4VCP has revealed a high degree of complexity in the control of the permeability at the BCSFB. The developmental expression profiles indicate an early establishment of this barrier, a finding that was confirmed in human fetuses. Variations in Cld choroidal expression between CPs and during development probably reflect changes in selective blood to CSF transport functions during development, and may be crucial for brain protection, especially in the context of perinatal injuries or exposure to toxins and drugs.

Acknowledgments The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under grant agreement n° HEALTH-F2-2009-241778. We thank Alan S. L. Yu from the Department of Medicine, Division of Nephrology, University of Southern California Keck School of Medicine, Los Angeles, California, who kindly provided the anti-Cld 19 antibody for these studies. We thank Chantal Watrin for her excellent technical help.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

References

- Adinolfi M (1985) The development of the human blood–CSF–brain barrier. *Dev Med Child Neurol* 27:532–537
- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115:4969–4976
- Angelow S, El-Husseini R, Kanzawa SA, Yu AS (2007) Renal localization and function of the tight junction protein, claudin-19. *Am J Physiol Renal Physiol* 293:F166–F177
- Anstrom JA, Thore CR, Moody DM, Brown WR (2007) Immunolocalization of tight junction proteins in blood vessels in human germinal matrix and cortex. *Histochem Cell Biol* 127:205–213

- Balslev Y, Dziegielewska KM, Mollgard K, Saunders NR (1997) Intercellular barriers to and transcellular transfer of albumin in the fetal sheep brain. *Anat Embryol (Berl)* 195:229–236
- Caley DW, Maxwell DS (1970) Development of the blood vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 138:31–47
- Catala M (1997) Carbonic anhydrase activity during development of the choroid plexus in the human fetus. *Childs Nerv Syst* 13:364–368
- Colegio OR, Van Itallie CM, McCrean HJ, Rahner C, Anderson JM (2002) Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C142–C147
- Coyne CB, Gambling TM, Boucher RC, Carson JL, Johnson LG (2003) Role of claudin interactions in airway tight junctional permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L1166–L1178
- Damkier HH, Brown PD, Praetorius J (2010) Epithelial pathways in choroid plexus electrolyte transport. *Physiology (Bethesda)* 25:239–249
- Dammann O, Leviton A (1999) Brain damage in preterm newborns: might enhancement of developmentally regulated endogenous protection open a door for prevention? *Pediatrics* 104:541–550
- Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD, Koval M (2007) Regulation of heterotypic claudin compatibility. *J Biol Chem* 282:30005–30013
- Davson H, Segal MB (1996) *Physiology of the CSF and the blood-brain barriers*. CRC Press, Boca Raton
- Ek CJ, Habgood MD, Dziegielewska KM, Saunders NR (2003) Structural characteristics and barrier properties of the choroid plexuses in developing brain of the opossum (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol* 460:451–464
- Ek CJ, Dziegielewska KM, Stolp H, Saunders NR (2006) Functional effectiveness of the blood-brain barrier to small water-soluble molecules in developing and adult opossum (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol* 496:13–26
- Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM (2007) Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446:801–805
- Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153:263–272
- Gazzin S, Strazielle N, Schmitt C, Fevre-Montange M, Ostrow JD, Tiribelli C, Ghersi-Egea JF (2008) Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCb1 and ABCc1 between blood-brain interfaces. *J Comp Neurol* 510:497–507
- Gunzel D, Yu AS (2009) Function and regulation of claudins in the thick ascending limb of Henle. *Pflugers Arch* 458:77–88
- Habgood MD, Sedgwick JE, Dziegielewska KM, Saunders NR (1992) A developmentally regulated blood-cerebrospinal fluid transfer mechanism for albumin in immature rats. *J Physiol* 456:181–192
- Hagberg H, Gressens P, Mallard C (2012) Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. *Ann Neurol* 71:444–457
- Hashimoto K, Oshima T, Tomita T, Kim Y, Matsumoto T, Joh T, Miwa H (2008) Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3. *Biochem Biophys Res Commun* 376:154–157
- Hou J, Renigunta A, Konrad M, Gomes AS, Schneeberger EE, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA (2008) Claudin-16 and claudin-19 interact and form a cation-selective tight junction complex. *J Clin Invest* 118:619–628
- Hou J, Renigunta A, Gomes AS, Hou M, Paul DL, Waldegger S, Goodenough DA (2009) Claudin-16 and claudin-19 interaction is required for their assembly into tight junctions and for renal reabsorption of magnesium. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:15350–15355
- Huber JD, Egleton RD, Davis TP (2001) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 24:719–725
- Johansson PA, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Liddelov SA, Potter AM, Stolp HB, Saunders NR (2006) Blood-CSF barrier function in the rat embryo. *Eur J Neurosci* 24:65–76
- Johansson P, Dziegielewska K, Saunders N (2008a) Low levels of Na, K-ATPase and carbonic anhydrase II during choroid plexus development suggest limited involvement in early CSF secretion. *Neurosci Lett* 442:77–80
- Johansson PA, Dziegielewska KM, Liddelov SA, Saunders NR (2008b) The blood-CSF barrier explained: when development is not immaturity. *BioEssays* 30:237–248
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE (2008) Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 1778:631–645
- Liddelov SA, Dziegielewska KM, Ek CJ, Johansson PA, Potter AM, Saunders NR (2009) Cellular transfer of macromolecules across the developing choroid plexus of *Monodelphis domestica*. *Eur J Neurosci* 29:253–266
- Lippoldt A, Liebner S, Andbjør B, Kalbacher H, Wolburg H, Haller H, Fuxe K (2000) Organization of choroid plexus epithelial and endothelial cell tight junctions and regulation of claudin-1, -2 and -5 expression by protein kinase C. *NeuroReport* 11:1427–1431
- Louboutin JP, Agrawal L, Reyes BA, Van Bockstaele EJ, Strayer DS (2010) HIV-1 gp120-induced injury to the blood-brain barrier: role of metalloproteinases 2 and 9 and relationship to oxidative stress. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:801–816
- Milatz S, Krug SM, Rosenthal R, Gunzel D, Müller D, Schulzke JD, Amasheh S, Fromm M (2010) Claudin-3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharged solutes. *Biochim Biophys Acta* 1798:2048–2057
- Miyamoto T, Morita K, Takemoto D, Takeuchi K, Kitano Y, Miyakawa T, Nakayama K, Okamura Y, Sasaki H, Miyachi Y, Furuse M, Tsukita S (2005) Tight junctions in Schwann cells of peripheral myelinated axons: a lesson from claudin-19-deficient mice. *J Cell Biol* 169:527–538
- Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S (1999a) Claudin-11/OSP-based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol* 145:579–588
- Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999b) Endothelial claudin: claudin-5/TM6CF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147:185–194
- Nakano Y, Kim SH, Kim HM, Sanneman JD, Zhang Y, Smith RJ, Marcus DC, Wangemann P, Nessler RA, Banfi B (2009) A claudin-9-based ion permeability barrier is essential for hearing. *PLoS Genet* 5:e1000610
- Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, Furuse M, Tsukita S (2003) Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 161:653–660
- Ohtsuki S, Yamaguchi H, Katsukura Y, Asashima T, Terasaki T (2008) mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. *J Neurochem* 104:147–154
- Overgaard CE, Daugherty BL, Mitchell LA, Koval M (2011) Claudins: control of barrier function and regulation in response to oxidant stress. *Antioxid Redox Signal* 15:1179–1193
- Rosenthal R, Milatz S, Krug SM, Oelrich B, Schulzke JD, Amasheh S, Gunzel D, Fromm M (2010) Claudin-2, a component of the tight junction, forms a paracellular water channel. *J Cell Sci* 123:1913–1921
- Saunders NR, Habgood MD, Dziegielewska KM (1999) Barrier mechanisms in the brain, II Immature brain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26:85–91

- Saunders NR, Ek CJ, Habgood MD, Dziegielewska KM (2008) Barriers in the brain: a renaissance? *Trends Neurosci* 31:279–286
- Saunders NR, Liddelow SA, Dziegielewska KM (2012) Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Neuropharmacol* 3:46 [Epub 29 Mar 2012]
- Schmitt C, Strazielle N, Richaud P, Bouron A, Ghersi-Egea JF (2011) Active transport at the blood–CSF barrier contributes to manganese influx into the brain. *J Neurochem* 117:747–756
- Shuangshoti S, Netsky MG (1966) Histogenesis of choroid plexus in man. *Am J Anat* 118:283–316
- Stolp HB, Turmquist C, Dziegielewska KM, Saunders NR, Anthony DC, Molnar Z (2011) Reduced ventricular proliferation in the foetal cortex following maternal inflammation in the mouse. *Brain* 134:3236–3248
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF (1999) Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *J Neurosci* 19:6275–6289
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF (2000) Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 59:561–574
- Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, Furuse K, Sasaki H, Nakayama M, Matsui T, Tsukita S, Furuse M, Tsukita S (2006) ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126:741–754
- Van Itallie CM, Rogan S, Yu A, Vidal LS, Holmes J, Anderson JM (2006) Two splice variants of claudin-10 in the kidney create paracellular pores with different ion selectivities. *Am J Physiol Renal Physiol* 291:F1288–F1299
- Van Itallie CM, Holmes J, Bridges A, Gookin JL, Coccaro MR, Proctor W, Colegio OR, Anderson JM (2008) The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. *J Cell Sci* 121:298–305
- Virgintino D, Errede M, Robertson D, Capobianco C, Girolamo F, Vimercati A, Bertossi M, Roncali L (2004) Immunolocalization of tight junction proteins in the adult and developing human brain. *Histochem Cell Biol* 122:51–59
- Wilkinson J, Radkowski M, Laskus T (2009) Hepatitis C virus neuroinvasion: identification of infected cells. *J Virol* 83:1312–1319
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B (2001) Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci Lett* 307:77–80
- Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Kraus J, Rascher-Eggstein G, Liebner S, Hamm S, Duffner F, Grote EH, Risau W, Engelhardt B (2003) Localization of claudin-3 in tight junctions of the blood–brain barrier is selectively lost during experimental autoimmune encephalomyelitis and human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 105:586–592
- Yu AS (2009) Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based pores. *Ann N Y Acad Sci* 1165:53–57
- Yu AS, Cheng MH, Angelow S, Gunzel D, Kanzawa SA, Schneeberger EE, Fromm M, Coalson RD (2009) Molecular basis for cation selectivity in claudin-2-based paracellular pores: identification of an electrostatic interaction site. *J Gen Physiol* 133:111–127
- Zappaterra MW, Lehtinen MK (2012) The cerebrospinal fluid: regulator of neurogenesis, behavior, and beyond. *Cell Mol Life Sci* [Epub ahead of print]
- Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, Song X, Ding M, Deng H (2007) Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus. *J Virol* 81:12465–12471

Thèse de doctorat de l'Université de Lyon
Ecole doctorale n°476: Neurosciences et Cognition

Caractérisation des fonctions neuroprotectives des interfaces sang-cerveau au cours du développement normal, dans les tumeurs périventriculaires et dans un modèle d'excitotoxicité périnatale.

Alexandre VASILJEVIC

Résumé en français

Les interfaces sang-cerveau comme la barrière hémato-encéphalique (BHE), les plexus choroïdes (PC) ou les organes circumventriculaires (OCV), constituent des barrières physiologiques nécessaires au fonctionnement du système nerveux central. Ces barrières sont à la fois « physiques », constituées de jonctions serrées, et « enzymatiques ». Longtemps considérées comme immatures chez le fœtus, ces barrières sont en réalité présentes précocement au cours du développement. Leurs caractéristiques et leurs propriétés restent peu connues chez l'homme. Nos travaux montrent que les PC expriment, précocement au cours du développement, des protéines de jonction serrée, les claudines (CLDN) 1, 2 et 3 chez le rat et chez l'homme. Cette expression est dynamique au cours du développement avec une apparition progressive de la CLDN2 pouvant avoir un lien avec la sécrétion du liquide céphalo-rachidien. Les CLDN 1 et 3 sont identifiées chez le fœtus humain au niveau de l'organe sous-commissural (OSC), un des OCV. La CLDN5 est exprimée précocement au niveau de la BHE chez le rat et chez l'homme et son expression est altérée dans un modèle d'excitotoxicité néonatale. Nos travaux montrent également que l'analyse du profil des CLDN est utile en pathologie tumorale notamment dans la compréhension et le diagnostic de tumeurs développées à partir des PC ou de l'OSC. Enfin, diverses enzymes antioxydantes et de détoxification dont l'époxyde hydrolase microsomale sont exprimées à 22 semaines d'aménorrhée principalement au niveau des PC du fœtus humain. Ces données suggèrent des capacités de détoxification des PC, d'installation précoce au cours du développement chez l'homme.

Mots-clé : interfaces sang-cerveau ; plexus choroïdes ; claudine ; développement ; tumeurs cérébrales ; détoxification ; excitotoxicité