



# Mécanismes de neuroprotection liés au glutathion dans la barrière sang - liquide céphalorachidien choroïdienne au cours du développement périnatal

Élodie Saudrais

## ► To cite this version:

Élodie Saudrais. Mécanismes de neuroprotection liés au glutathion dans la barrière sang - liquide céphalorachidien choroïdienne au cours du développement périnatal. Neurosciences [q-bio.NC]. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1026 . tel-02171261

**HAL Id: tel-02171261**

**<https://theses.hal.science/tel-02171261>**

Submitted on 2 Jul 2019

**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 : 2019LYSE1026

## **THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON**

opérée au sein de  
**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**École Doctorale N° 476**  
**Neurosciences et Cognition**

**Spécialité du doctorat** : Neurosciences  
**Discipline** : Neurotoxicologie

Soutenue publiquement le 04/03/2019, par :

**Élodie SAUDRAIS**

---

### **Mécanismes de neuroprotection liés au glutathion dans la barrière sang - liquide céphalorachidien choroïdienne au cours du développement périnatal**

---

Devant le jury composé de :

**Luc ZIMMER**

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier  
Université Claude Bernard Lyon 1

Président

**Xavier DECLÈVES**

Professeur des Universités, Praticien Hospitalier  
Université Paris-Descartes – Paris Diderot

Rapporteur

**Brigitte LEININGER-MULLER**

Professeure des Universités  
Université de Lorraine

Rapporteuse

**Nathalie PEREK**

Professeure des Universités  
Université Jean Monnet

Examinatrice

**Jean-François GHERSI-EGEA**

Directeur de Recherche  
INSERM U1028

Directeur de thèse

**Nathalie STRAZIELLE**

Chercheure  
INSERM U1028

Co-directrice de thèse





## REMERCIEMENTS

---

Au Président du Jury,

**Monsieur Luc ZIMMER.** Je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury et de m'honorer de votre présence.

Aux rapporteurs de ce travail,

**Madame Brigitte LEININGER-MULLER** et **Monsieur Xavier DECLÈVES.** Merci d'avoir accepté d'examiner ce travail et de m'honorer de votre présence. Je vous remercie également pour vos remarques judicieuses et vos conseils bienveillants.

À l'examinatrice de ce travail,

**Madame Nathalie PEREK.** Merci d'avoir accepté de participer à ce jury et de m'honorer de votre présence.

À mes directeurs de thèse,

**Monsieur Jean-François GHERSI-EGEA** et **Madame Nathalie STRAZIELLE.** Je vous remercie de m'avoir confié ce sujet de recherche passionnant et de m'avoir guidée pendant ces quatre années. Je vous remercie aussi d'avoir su vous rendre disponibles pour répondre à toutes mes questions, qu'elles concernent les neurosciences, la géographie, les randonnées ou les mots fléchés !

À l'ensemble des **membres de l'équipe FLUID, de la plateforme NGFO et de l'équipe GENDEV** qui ont travaillé sur le site de Laennec.

Je vous remercie de m'avoir accompagnée au quotidien dans ce projet grâce à vos conseils avisés et votre aide technique. Je vous remercie surtout pour votre gentillesse et votre amitié. **Anne**, je te remercie pour ton écoute attentive, tes conseils et ton soutien indéfectible ; je sais déjà que tu vas beaucoup me manquer. **Sandrine**, merci de m'avoir épaulée depuis mes débuts ; je te souhaite le meilleur dans ton nouveau poste que tu as amplement mérité. **Alicia**, je te remercie pour ta gentillesse absolue et espère pouvoir un jour faire notre fameuse balade à Aiguebelette. **Gaétan**, je te remercie d'avoir égayé le laboratoire de biologie moléculaire lorsque j'étais eseuulée au spectro, et de m'avoir aidée pour mes « grands » débuts en biologie moléculaire. **Claire**, merci de m'avoir toujours

prêté une oreille attentive. **Anaïd, Sylvie, Rainui et Florence**, je suis contente d'avoir pu travailler avec vous et vous souhaite le meilleur pour la suite.

Aux **membres de l'équipe SYNATAC**,

**Do, Céline, Marie-Ève, Chantal, Naura, Fabrice et Roger** je vous remercie chaleureusement pour vos conseils, votre aide, votre gentillesse et votre amitié.

À mes chers **co-doctorants des équipes FLUID et SYNATAC** qui ont couru ce marathon avec moi,

**Chloé R., Margaux, Chloé B., Inès, Aude, Laurent, Alanah, Elodie, Maxime**. Je vous remercie d'avoir partagé cette aventure avec moi, et vous souhaite à tous de réussir dans vos nouveaux projets ! **Chloé R.**, je suis contente que nous ayons pu compter l'une sur l'autre dans notre course effrénée aux fameux « résultats ». **Margaux**, je te remercie pour ton urbanité et ta remarquable capacité à relativiser. **Chloé B.**, je te remercie d'avoir été mon rayon de soleil quotidien !

Aux **membres de l'animalerie ALECS conventionnelle**,

**Chloé, Mikaël et Angèle**. Je vous remercie d'avoir accompagné le projet « Nrf2 ».

À mon incroyable **équipe de correcteurs**,

**Muriel, Greg, Marine et Maëva**. Je vous remercie sincèrement d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit avec autant de soin. J'en suis autant touchée qu'impressionnée.

À mes **amis de Lyon** que j'ai rencontrés grâce à cette aventure, et en particulier à **Charlotte** qui est toujours attentive et de bon conseil.

À **ma famille et à mes amis**.

Je vous remercie tous de m'avoir soutenue dans ce projet et d'avoir pris le temps de vous y intéresser. À **mon papa**, qui est le meilleur des confrères. À **ma maman**, qui n'est pas susceptible et à qui je souhaite beaucoup de réussite dans ses nouveaux projets.

À **Vincent**.





## PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES ET COMMUNICATIONS

### Publications dans des journaux à comité de lecture

Koehn, L., Dziegielewska K., Mollgard K., **Saudrais E.**, Strazielle N., Gherzi-Egea J.-F., Saunders N., Habgood M. “Developmental differences in the expression of ABC transporters at rat brain interfaces following chronic xenobiotic exposure.” *En révision, Scientific Reports*.

**Saudrais, E.**, Strazielle N., & Gherzi-Egea J.-F. (2018). “Choroid plexus glutathione peroxidases are instrumental in protecting the brain fluid environment from hydroperoxides during postnatal development.” *The American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 315, 445-456.

Kratzer, I., Strazielle N., **Saudrais E.**, Mönkkönen K., Malleval C., & Gherzi-Egea J.-F. (2018). “Glutathione Conjugation at the Blood-CSF Barrier Efficiently Prevents Exposure of the Developing Brain Fluid Environment to Blood-Borne Reactive Electrophilic Substances.” *The Journal of Neuroscience*, 38(14), 3466-3479.

Gherzi-Egea, J.-F., **Saudrais E.**, & Strazielle N. (2018). “Barriers to Drug Distribution into the Perinatal and Postnatal Brain.” *Pharmaceutical Research*, 35(84), 1-10.

### Communications

**Saudrais, E.**, Koehn L., Silva K., Blondel S., Babikian A., Strazielle N., Gherzi-Egea J.-F. “Pharmaceutical induction of choroidal glutathione-S-transferases improves the neuroprotective functions of the blood-CSF barrier during post-natal development in rat.” *Congrès annuel de la société d’étude des Interfaces Sang-Cerveau*, Paris, novembre 2018 (communication affichée).

**Saudrais, E.**, Strazielle N., & Gherzi-Egea J.-F. “Protection of the cerebrospinal fluid by choroid plexus glutathione peroxidases during rat perinatal development.” *Gordon Research Conference: Barrier of the Central Nervous System*, New London (USA), juin 2018 (communication affichée).

**Saudrais, E.**, Strazielle N., Cavagna S., & Gherzi-Egea J.-F. “Protection of the cerebrospinal fluid by choroidal glutathione peroxidases during perinatal development.” *Congrès annuel de la société d’étude des Interfaces Sang-Cerveau*, Tours, octobre 2017 (communication orale Premier prix de présentation et communication affichée). *Journée scientifique de la SFR Santé Lyon Est*, Lyon, décembre 2017 (communication affichée).

**Saudrais, E.**, Barneoud-Rousset O., Blondel S., Cavagna S., Strazielle N., & Gherzi-Egea J.-F. “Protection of the developing brain: presence of functional detoxifying enzymatic systems at the blood-CSF barrier.” *Symposium on Signal Transduction in the Blood-Brain Barriers*, Copenhagen (DK), septembre 2016 (communication affichée).

**Saudrais, E.,** Silva K., Blondel S., Babikian A., Strazielle N., & Gherzi-Egea J.-F. "Glutathione-dependent detoxifying enzymes of the blood-CSF barrier can be induced through the Nrf-2 pathway to protect the postnatal brain." *SEISC multinational meeting on blood-brain interfaces*, Lyon, octobre 2016 (communication affichée Premier prix de présentation).

**Saudrais, E.,** Kratzer I., Babikian A., Barneoud-Rousset O., Blondel S., Strazielle N., & Gherzi-Egea J.-F. "Glutathione-S-transferases coupled with organic anion transporters form an efficient metabolic barrier at the rat blood- cerebrospinal fluid interface during early stages of post-natal development." *Congrès annuel de la société d'étude des Interfaces Sang-Cerveau*, Paris, octobre 2015 (communication affichée).

## DIRECTEURS, COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

---

Président de l'Université	M. le Professeur Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Didier REVEL
Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe CHEVALIER
Vice-président de la Commission Recherche	M. Fabrice VALLÉE
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

### Composantes santé

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

### Composantes et départements de sciences et technologie

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme C. FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE



Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV
Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. le Professeur J-C PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y. VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. le Professeur E. PERRIN
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

# TABLE DES MATIERES

---

TABLE DES FIGURES .....	7
TABLE DES TABLEAUX.....	11
TABLE DES ABREVIATIONS.....	13
AVANT-PROPOS .....	17
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
1. Handicaps neurodéveloppementaux d'origine périnatale.....	23
1.1. Définitions et données de prévalence .....	23
1.2. Étiologies.....	24
1.2.1. Pathologies périnatales .....	24
1.2.2. Stress oxydant .....	25
1.2.3. Stress toxique.....	26
1.3. Traitements pédiatriques .....	28
2. Principaux mécanismes de protection du cerveau .....	31
2.1. Liquide céphalorachidien .....	31
2.1.1. Synthèse plexuelle et extra-plexuelle .....	31
2.1.2. Composition.....	35
2.1.3. Circulation .....	36
2.1.3.1. Système ventriculaire et espaces sous-arachnoïdiens .....	36
2.1.3.2. Échanges liquide céphalorachidien – liquide interstitiel cérébral.....	42
2.1.4. Rôles du liquide céphalorachidien .....	46
2.2. Interfaces sang-cerveau .....	48
2.2.1. Découverte .....	48
2.2.2. Présentation générale .....	52
2.2.2.1. Localisation des différentes interfaces sang-cerveau .....	52
2.2.2.2. Caractéristiques principales .....	56
2.2.3. Barrière hémato-encéphalique .....	58
2.2.3.1. Localisation et surface d'échange .....	58
2.2.3.2. Unité neurovasculaire .....	59
2.2.3.3. Principaux mécanismes de barrière.....	67

2.2.4. Barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne .....	75
2.2.4.1. Localisation et surface d'échange.....	75
2.2.4.2. Structure.....	76
2.2.4.3. Principaux mécanismes de barrière .....	80
3. Mécanismes de neuroprotection choroïdiens liés au glutathion .....	85
3.1. Glutathion.....	85
3.1.1. Fonctions .....	85
3.1.2. Répartition tissulaire et concentrations cellulaires .....	86
3.1.3. Métabolisme .....	87
3.1.3.1. Synthèse.....	87
3.1.3.2. Recyclage.....	89
3.1.3.3. Export .....	89
3.2. Glutathion peroxydases et glutathion réductase.....	91
3.2.1. Isoenzymes et structures.....	91
3.2.2. Fonctions principales.....	93
3.2.1. Répartition tissulaire et cellulaire, et activité au sein du système nerveux central .....	96
3.3. Glutathion transférases.....	98
3.3.1. Classes d'isoenzymes et fonctions .....	98
3.3.1.1. Glutathion transférases cytosoliques .....	98
3.3.1.2. Glutathion transférases mitochondriales.....	101
3.3.1.3. MAPEG .....	101
3.3.2. Répartition tissulaire et cellulaire, et activité au sein du système nerveux central .....	101
3.3.3. Rôle des glutathion transférases choroïdiennes dans la formation d'une barrière métabolique.....	103
3.3.4. Induction des glutathion transférases de classes Alpha, Mu et Pi.....	103
OBJECTIFS DE THESE.....	111
MATERIELS & METHODES.....	115
1. Expérimentations <i>in vivo</i> .....	117
1.1. Éthique .....	117
1.2. Animaux.....	117

1.2.1. Rats Sprague Dawley commerciaux .....	117
1.2.2. Rats Sprague Dawley <i>Nrf2</i> <sup>-/-</sup> .....	118
1.2.3. Rats Sprague Dawley présentant une réduction de la quantité en glutathion choroïdien réduit.....	119
1.3. Prélèvements .....	120
1.3.1. Tissus .....	120
1.3.2. Liquide céphalorachidien.....	120
1.4. Mesures de perméabilité sang – liquide céphalorachidien .....	121
2. Expérimentations <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> .....	122
2.1. Mesure de la capacité de détoxification du peroxyde d'hydrogène par les plexus choroïdes <i>ex vivo</i> .....	122
2.2. Culture primaire de cellules épithéliales choroïdiennes.....	123
2.2.1. Description.....	123
2.2.2. Détoxification du monochlorobimane et mesure de perméabilité .....	124
2.2.3. Détoxification du peroxyde d'hydrogène et mesure de perméabilité .....	124
3. Biochimie et immunohistologie.....	126
3.1. Enzymologie.....	126
3.1.1. Glutathion transférases .....	126
3.1.2. Glutathion peroxydases .....	127
3.1.3. Glutathion réductase .....	128
3.2. Western-blot .....	128
3.3. Immunohistofluorescence.....	129
4. Méthodes analytiques .....	132
4.1. Dosage du peroxyde d'hydrogène .....	132
4.2. Chromatographie liquide à haute performance .....	132
5. Statistiques .....	134
RESULTATS & DISCUSSIONS .....	135
1. Glutathion peroxydases choroïdiennes : protection de l'environnement liquidien cérébral envers les hydroperoxydes au cours de la période périnatale .....	137
1.1. Résultats .....	137

1.1.1. Description du système antioxydant choroïdien dépendant des glutathion peroxydases et de la glutathion réductase .....	137
1.1.1.1. Activités enzymatiques.....	137
1.1.1.2. Expression protéique et localisation cellulaire des isoenzymes glutathion peroxydases 1 et 4, et de la glutathion réductase.....	140
1.1.2. Efficacité du système antioxydant choroïdien dépendant des glutathion peroxydases .....	143
1.1.2.1. Capacité des plexus choroïdes isolés à inactiver le peroxyde d'hydrogène .....	143
1.1.2.2. Rôle des glutathion peroxydases dans l'inactivation du peroxyde d'hydrogène par les cellules épithéliales choroïdiennes <i>in vitro</i> .....	145
1.1.2.3. Barrière enzymatique choroïdienne entre le sang et le liquide céphalorachidien envers le peroxyde d'hydrogène <i>in vitro</i> .....	153
1.2. Discussion .....	155
2. Glutathion transférases choroïdiennes : protection de l'environnement liquidien cérébral envers les xénobiotiques circulant dans le sang au cours de la période périnatale.....	161
2.1. Résultats .....	161
2.1.1. Description du système de détoxification choroïdien dépendant des glutathion transférases.....	161
2.1.1.1. Activités enzymatiques.....	161
2.1.1.2. Expressions protéiques des isoenzymes de glutathion transférases .....	164
2.1.2. Efficacité du système de détoxification choroïdien dépendant des glutathion transférases.....	165
2.1.2.1. Perméabilité de la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne au monochlorobimane <i>in vitro</i> .....	165
2.1.2.1. Perméabilité de la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne au chlorodinitrobenzène <i>in vivo</i> .....	168
2.1.3. Induction des mécanismes de barrière choroïdiens liés au glutathion au cours de la période périnatale .....	172
2.1.3.1. Activité glutathion transférase .....	172
2.1.3.2. Effets de l'induction des glutathion transférases choroïdiennes par le diméthylfumarate sur les propriétés de neuroprotection de la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne <i>in vivo</i> .....	174

2.1.3.3. Implication de la voie du <i>Nuclear factor erytroid-2-related factor</i> 2 dans l'induction des glutathion transférase choréïdiennes par le diméthylfumarate .....	175
2.2. Discussion .....	178
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES.....	187
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	197
ANNEXES .....	225
1. Articles relatifs à ce travail de thèse .....	1
2. Autres articles .....	1



## TABLE DES FIGURES

---

Figure 1   Transporteurs et canaux des cellules épithéliales choroïdiennes impliqués dans la sécrétion du liquide céphalorachidien. ....	32
Figure 2   Production horaire moyenne de liquide céphalorachidien chez l'enfant en fonction de l'âge (A) et du poids corporel (B).....	35
Figure 3   Système de circulation du liquide céphalorachidien (LCR).....	37
Figure 4   Système ventriculaire cérébral. ....	38
Figure 5   Localisation des granulations arachnoïdiennes de Pacchioni.....	39
Figure 6   Drainage veineux lymphatique du liquide céphalorachidien chez l'homme adulte.....	40
Figure 7   Hypothèses concernant la circulation du liquide interstitiel cérébral et/ ou du liquide céphalorachidien à travers le parenchyme cérébral. ....	42
Figure 8   Représentation schématique du système glymphatique. ....	45
Figure 9   Expérimentations de Goldmann avec le bleu Trypan.....	49
Figure 10   Expérimentations de Wislocki avec le bleu trypan. ....	50
Figure 11   Représentation schématique des principales interfaces sang-cerveau chez l'adulte.....	53
Figure 12   Principe général du métabolisme des xénobiotiques.....	57
Figure 13   Schéma d'une portion de vaisseau sanguin cérébral, de l'artériole à la veinule afférente. ....	60
Figure 14   Schéma simplifié de la composition moléculaire des jonctions liant les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique.....	62
Figure 15   Illustration schématique de la zonation cellulaire au sein de l'arbre artérioveineux cérébral.....	64
Figure 16   Dysfonction de la barrière hémato-encéphalique chez les embryons de souris claudine 5 (Cldn5) déficientes. ....	68
Figure 17   Représentation schématique des principaux transporteurs d'efflux multispécifiques de la barrière hémato-encéphalique ( <i>gauche</i> ) et de la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne ( <i>droite</i> ) impliqués dans la neuroprotection.....	71
Figure 18   Ultrastructure du plexus choroïde. ....	78
Figure 19   Microscopie électronique de l'épithélium choroïdien humain montrant les cellules « claires » et « foncées ».....	79



## Table des Figures

Figure 20   Représentation tridimensionnelle du réseau sanguin irriguant une villosité choroïdienne. ....	79
Figure 21   Images de microscopie électronique à balayage de la surface d'un plexus choroïde latéral de singe mâle adulte ( <i>Cebus apella apella</i> ) montrant des cellules de Kolmer. ....	80
Figure 22   Structure chimique du glutathion réduit et du glutathion oxydé. ....	88
Figure 23   Synthèse et métabolisme du glutathion. ....	90
Figure 24   Couplage entre la réduction des hydroperoxydes en alcool par les glutathion peroxydases (GPX) et le recyclage du glutathion oxydé en glutathion réduit par la glutathion réductase (GR). ....	91
Figure 25   Vue générale de la distribution de l'isoenzyme glutathion peroxydase 1 au sein du système nerveux central chez la souris adulte. ....	97
Figure 26   Réaction de conjugaison au glutathion catalysée par les glutathion transférases. ....	99
Figure 27   Modèle schématique de la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne dépendante des glutathion transférases. ....	103
Figure 28   Effet de différents xénobiotiques sur l'expression protéique des sous-unités de glutathion transférases chez le rat. ....	104
Figure 29   Mécanisme d'induction des récepteurs nucléaires <i>constitutive androstane receptor</i> , <i>pregnane X receptor</i> et <i>peroxisome proliferator activated receptor-γ</i> . ....	106
Figure 30   Mécanisme d'induction du récepteur aux aryl hydrocarbures. ....	107
Figure 31   Mécanisme d'induction du Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2. ....	109
Figure 32   Représentation schématique de la culture primaire de cellules épithéliales choroïdiennes de rat en système bicompartimental. ....	123
Figure 33   Dosage de l'activité glutathion transférase. ....	126
Figure 34   Dosage des activités glutathion peroxydase et glutathion réductase. ....	127
Figure 35   Dosage du peroxyde d'hydrogène par la méthode du xylénol orange. ....	132
Figure 36   Activités glutathion peroxydase dans les tissus cérébraux et dans le foie chez le rat au cours du développement postnatal. ....	138
Figure 37   Activités glutathion réductase dans les tissus cérébraux et dans le foie chez le rat au cours du développement postnatal. ....	139
Figure 38   Analyse par Western-blot de l'expression protéique de la glutathion peroxydase 1 (Gpx1) et de la glutathion réductase (Gr) dans les tissus cérébraux et dans le foie chez le rat au cours du développement postnatal. ....	140

Figure 39   Détection par immunohistofluorescence des isoenzymes glutathion peroxidase 1 et glutathion peroxydase 4 dans les plexus choroïdes chez le rat de 2 jours postnatal. ....	142
Figure 40   Détoxification du peroxyde d'hydrogène par des plexus choroïdes isolés de rats de deux jours. ....	143
Figure 41   Cinétique d'élimination du peroxyde d'hydrogène par les cellules épithéliales choroïdiennes de rats. ....	150
Figure 42   Effets de l'inhibition de la catalase et des glutathion peroxydases sur l'élimination, le passage et la toxicité du peroxyde d'hydrogène dans la barrière sang – liquide céphalorachidien. ....	152
Figure 43   Activités glutathion transférase dans les tissus cérébraux et dans le foie chez le rat au cours du développement postnatal.....	162
Figure 44   Analyse par Western-blot de l'expression protéique de différentes sous-unités de glutathion transférase dans les tissus cérébraux et dans le foie chez le rat au cours du développement postnatal.....	164
Figure 45   Les cellules épithéliales choroïdiennes en culture forment une barrière prévenant le passage du monochlorobimane du compartiment basolatéral au compartiment apical.....	166
Figure 46   Les cellules épithéliales choroïdiennes en culture forment une barrière enzymatique. ....	167
Figure 47   Caractérisation des animaux ayant une diminution de la quantité de glutathion réduit choroïdien.....	169
Figure 48   Efficacité de la barrière enzymatique choroïdienne dépendante du glutathion lors d'une exposition toxique au 1,2-dichloro-4-nitrobenzène chez le rat au stade postnatal. ....	171
Figure 49   Effets de différentes molécules pharmacologiques sur l'activité spécifique glutathion transférase choroïdienne chez le rat au stade postnatal. ....	173
Figure 50   Effet du diméthylfumarate sur la perméabilité de la barrière enzymatique choroïdienne au 1,2-dichloro-4-nitrobenzène chez le rat au stade postnatal.....	174
Figure 51   Analyse par Western-blot de l'expression protéique du <i>Nuclear factor erytroid-2-related factor 2</i> (Nrf2) dans les tissus choroïdiens du rat au cours du développement postnatal.....	175
Figure 52   Effet du diméthylfumarate sur la localisation cellulaire du <i>Nuclear factor erytroid-2-related factor 2</i> dans le plexus choroïde du 4 <sup>ème</sup> ventricule chez le rat au cours du développement postnatal.....	176
Figure 53   Possibles mécanismes d'action du diméthylfumarate et voies de signalisation intracellulaires impliquées. ....	183



## TABLE DES TABLEAUX

---

Tableau 1   Exemples de toxiques neurodéveloppementaux exogènes. ....	27
Tableau 2   Composition du sang et du liquide céphalorachidien chez l'homme adulte.	36
Tableau 3   Analyse comparative de l'expression développementale des transporteurs d'efflux entre la barrière hémato-encéphalique et la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne. ....	72
Tableau 4   Rôles du glutathion. ....	85
Tableau 5   Noms, caractéristiques structurales, substrats et localisations des différentes isoenzymes de glutathion peroxydases. ....	92
Tableau 6   Exemples de substrats des différentes familles de glutathion transférases.	100
Tableau 7   Anticorps primaires utilisés. ....	129
Tableau 8   Anticorps secondaires utilisés. ....	130
Tableau 9   Rapport entre les activités spécifiques glutathion peroxydase mesurées dans les plexus choroïdes et dans le cortex cérébral chez le rat au cours du développement postnatal. ....	139
Tableau 10   Paramètres régissant l'élimination du peroxyde d'hydrogène par les plexus choroïdes <i>ex vivo</i> (essai) et <i>in vivo</i> (extrapolation). ....	145
Tableau 11   Absence d'élimination du peroxyde d'hydrogène par le milieu préconditionné des cellules épithéliales choroïdiennes. ....	147
Tableau 12   Demi-vies d'élimination et vitesses d'élimination du peroxyde d'hydrogène dans les cellules épithéliales choroïdiennes. ....	149
Tableau 13   Inhibition de l'activité glutathion transférase choroïdienne envers le 1,2-dichloro-4-nitrobenzène en présence de toxiques environnementaux et de molécules pharmacologiques. ....	163



## TABLE DES ABREVIATIONS

---

3-AT	: 3-aminotriazole
ABC	: ATP-binding cassette
ADN	: Acide désoxyribonucléique
AHR	: Récepteur aux aryl hydrocarbones ( <i>aryl hydrocarbone receptor</i> )
AMM	: Autorisation de mise sur le marché
AQP	: Aquaporine
ARE	: <i>Antioxydant response element</i>
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ARNT	: AHR nuclear translocator
ATP	: Adénosine triphosphate
BHE	: Barrière hémato-encéphalique
BSA	: Albumine de sérum bovin ( <i>bovine serum albumine</i> )
BSO	: DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine
CAR	: Récepteur constitutif des androstanes ( <i>constitutive androstane receptor</i> )
CDNB	: 1-choro-2,4-dinitrobenzène
CLDN	: Claudine
CLHP	: Chromatographie liquide à haute performance
CYP	: Cytochrome P450
DAS	: Diallyl sulfide
DMF	: Diméthylfumarate
EMA	: Agence européenne des médicaments ( <i>European medicines agency</i> )
EOPS	: Exempt d'organisme pathogène spécifique
ERO	: Espèce(s) réactive(s) de l'oxygène
FDA	: <i>Food and drug administration</i>
GPX	: Glutathion peroxydase(s)
GR	: Glutathion réductase
GSH	: Glutathion réduit
GSSG	: Glutathion oxydé

## Table des Abréviations

GST : Glutathion transférase(s)

HBSS : *Hanks' Balanced Salt Solution*

Inserm : Institut national de la santé et de la recherche médicale

IRM : Imagerie à résonance magnétique

JAM : Junctional adhesion molecule

Keap1 : *Kealch-like ECH-associated protein 1*

KO : *knock out*

LCR : liquide céphalorachidien

MAO : monoamines oxidase(s)

MCB : monochlorobimane

NRF2 : *Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2*

NRFBK : *Nuclear factor-kappa B*

P1 : un jour postnatal

P2 : deux jours postnatal

P3 : trois jours postnatal

P4 : quatre jours postnatal

P5 : cinq jours postnatal

P7 : sept jours postnatal

P17 : 17 jours postnatal

P35 : 35 jours postnatal

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*)

PPARG : *Peroxisome proliferator activated receptor- $\gamma$*

PXR : *Pregnane X receptor*

qRT-PCR : Réaction en chaîne par polymérase (*reverse transcription polymerase chain reaction*)

Reca1 : *Rat endothelial cell antigen 1*

RH : Ringer HEPES

RNA-seq : Séquencage de l'ARN

S5 : 5 semaines

SD : Sprague Dawley

SF : Sulforaphane

*Single cell* – RNAseq : Séquencage ARN sur cellule unique

SLC : *Solute carrier transporters*

SLCO : *Solute carrier transporters, organic anion transporter family*

SNC : Système nerveux central

SULT : Sulfotransférase

TCPOBOP : 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)]benzène pregnenolone 16 $\alpha$ -carbonitrile

Tlr : Récepteurs *Toll-like*

UDP : Uridine diphosphate

UGT : UDP-glucuronosyltransférase

WT : *Wild type*

XRE : *Xenobiotic response element*





## AVANT-PROPOS

---



Le cerveau est le centre du système nerveux. Il contrôle l'ensemble de nos mouvements, de nos émotions, de nos pensées et régule des fonctions involontaires comme la respiration ou le métabolisme. Le cerveau agit par l'intermédiaire d'un réseau cellulaire formé de milliards de neurones. Ces cellules nerveuses communiquent entre elles par des signaux électrochimiques, appelés influx nerveux, qui résultent de mouvements ioniques fins à travers les membranes neuronales. La régulation précise de l'environnement liquidien du cerveau, appelée **homéostasie cérébrale**, est donc cruciale pour permettre une bonne signalisation neuronale. L'homéostasie cérébrale est notamment assurée par l'action de plusieurs barrières cellulaires à perméabilité sélective, appelées **interfaces sang-cerveau**, qui contrôlent les échanges entre le sang et le système nerveux central (SNC). Ces interfaces sang-cerveau limitent également l'entrée dans le compartiment cérébral de **composés toxiques** circulant dans le sang pouvant avoir une action délétère directe sur les cellules neurales. Les caractéristiques et propriétés de ces interfaces sang-cerveau évoluent du développement jusqu'à l'âge adulte, ce qui permettrait de répondre aux besoins physiologiques spécifiques de chaque stade de la vie.

Certains **stress de type oxydant, inflammatoire/infectieux ou toxique** (endogène, médicamenteux ou environnemental) sont susceptibles de perturber l'activité cérébrale. Au cours de la **période périnatale**, de tels stress peuvent nuire au développement du cerveau, encore en pleine maturation. Des **pathologies périnatales** comme l'hyperbilirubinémie (jaunisse du nourrisson), l'inflammation, l'hypoxie-ischémie du nourrisson, ou les intoxications médicamenteuses et environnementales sont ainsi à l'origine de troubles de la synaptogenèse, de la myélinisation et de l'organisation des réseaux neuronaux.

Notre hypothèse est que les interfaces sang-cerveau limitent les effets délétères centraux de ces événements pathologiques périnataux. Des séquelles neurologiques durables peuvent néanmoins apparaître lorsque les capacités de protection de ces interfaces sont dépassées ou que leur fonctionnement est altéré.

Ce travail de thèse s'inscrit dans la caractérisation des mécanismes neuroprotecteurs siégeant au sein des interfaces sang-cerveau efficaces dès le stade périnatal, et dans

l'identification des voies d'induction capables d'activer ces mécanismes chez le nourrisson et l'enfant. Mes recherches permettront de trouver les clés nécessaires au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour prévenir les déficiences neurologiques d'origine périnatale.

## INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE



## 1. Handicaps neurodéveloppementaux d'origine périnatale

### 1.1. Définitions et données de prévalence

L'Organisation mondiale de la santé a défini le **handicap** comme « les déficiences, les limitations d'activités ou les restrictions de participation » (OMS, 2001). Le handicap peut être moteur, sensoriel, intellectuel, comportemental, psychiatrique ou multiple.

Le handicap touche près de 95 millions d'enfants âgés de 0 à 14 ans (5,1 %) à travers le monde, parmi lesquels 13 millions (0,7 %) présentent un handicap sévère (OMS, 2011). La majorité des **handicaps de l'enfant** résulterait d'événements pathologiques survenant avant la première année de vie. En fonction de la période de survenue de l'anomalie à l'origine du handicap, on distingue les handicaps d'origine pré-, péri- et postnatale (Inserm, 2004b). Il existe également des handicaps idiopathiques, qui ne peuvent être reliés à aucun événement pathologique précis survenu au cours de ces périodes de développement. La définition des périodes pré-, péri- et postnatale, et donc des différents types de handicaps, diffèrent parfois selon les auteurs. Il convient donc de les redéfinir ici (Inserm, 2004b) :

- > Les **handicaps d'origine prénatale** trouvent leur étiologie entre la conception et la 28<sup>ème</sup> semaine de gestation. Ces handicaps peuvent être dus à des anomalies chromosomiques (e.g. syndrome de Down), génétiques ou à des embryofœtopathies infectieuses de survenue précoce (e.g. toxoplasmose).
- > La période périnatale, aussi appelée péri-néonatale, est la période comprise entre la 29<sup>ème</sup> semaine de grossesse et le 28<sup>ème</sup> jour de vie de l'enfant. Les **handicaps d'origine périnatale** peuvent résulter de l'exposition du fœtus ou du nourrisson à des stress oxydants (e.g. hypoxie-ischémie du nourrisson), inflammatoires, infectieux, toxiques (e.g. bilirubine endogène, méthylmercure) ou encore médicamenteux (e.g. médicaments antiépileptiques), communément regroupés sous le terme de **pathologies périnatales** (ou événements pathologiques de la période périnatale).



- > Les **handicaps d'origine postnatale** se rapportent à des événements survenus après le 28<sup>ème</sup> jour de vie de l'enfant. Il peut s'agir d'infections, de tumeurs ou de traumatismes par exemple.

En France, 1 % des enfants âgés de 7 à 8 ans sont porteurs d'un handicap sévère, qui dans la moitié des cas est d'origine périnatale (Inserm, 2004a). La majorité des handicaps d'origine périnatale sont de type **neurodéveloppementaux**, c'est-à-dire que la pathologie périnatale à l'origine du handicap a perturbé le développement cérébral. Ces handicaps neurodéveloppementaux d'origine périnatale incluent notamment les paralysies cérébrales, l'épilepsie, les déficiences intellectuelles et sensorielles, et les autismes.

Les pathologies périnatales à composante inflammatoire pourraient également avoir un rôle important dans l'apparition de **maladies psychiatriques et neurodégénératives chez l'adulte** (e.g. schizophrénie, Alzheimer, Parkinson, sclérose en plaques) (Stolp & Dziegielewska, 2009; Stolp et al., 2013). L'inflammation périnatale pourrait augmenter la susceptibilité cérébrale aux médicaments, aux toxiques, et même au processus physiologique du vieillissement, en induisant la mort de cellules neurales à des périodes critiques du développement cérébral, ou en altérant de façon durable les fonctions des interfaces sang-cerveau.

## 1.2. Étiologies

### 1.2.1. Pathologies périnatales

L'origine du handicap de l'enfant est souvent difficile à déterminer, elle n'est retrouvée que dans un tiers des cas environ (RHEOP, 2017). Mieux connaître l'étiologie des handicaps neurodéveloppementaux est pourtant nécessaire au développement de mesures et traitements prophylactiques permettant de limiter l'apparition de ces séquelles neurologiques durables.

Selon l'expertise *Déficiences ou handicaps d'origine périnatale* publiée en 2004 par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), les principales pathologies périnatales à l'origine de handicap sont les suivantes (Inserm, 2004a) :

- > prématurité (séquelles liées à l'âge gestationnel et au poids de naissance, aux complications de la prématurité, essentiellement des lésions cérébrales, et des dysplasies broncho-pulmonaires) ;
- > retard de croissance pré- et postnatale ;
- > gémellité (surtout les jumeaux monochondriaux) ;
- > asphyxie périnatale ;
- > fœtopathies toxiques (e.g. alcool, drogues, tabac, certains médicaments) ;
- > infections périnatales (e.g. méningo-encéphalites, chorioamniotites) ;
- > accidents neurologiques divers (e.g. accident vasculaire cérébral, traumatisme, hémorragie intracrânienne spontanée ou traumatique).

L'impact individuel de chacun de ces facteurs de risque est difficile à évaluer. En effet, l'origine du handicap est souvent **multifactorielle**. Par exemple, la plupart des enfants présentant une paralysie cérébrale des suites d'une infection périnatale avaient également souffert d'une asphyxie périnatale (Inserm, 2004a).

Ces pathologies périnatales, bien que variées, sont toutes liées à un **stress oxydant, inflammatoire/infectieux ou toxique** (endogène, environnemental ou médicamenteux). Ce travail de thèse s'intéresse principalement aux composantes oxydantes et toxiques des pathologies périnatales.

### 1.2.2. Stress oxydant

Le **stress oxydant** correspond à un déséquilibre entre la production d'espèces pro-oxydantes<sup>1</sup> et la capacité antioxydante des mécanismes de défense de l'organisme. Ce stress, à l'origine de dommages cellulaires importants (cassures des brins d'ADN, peroxydation lipidique, modifications protéiques), peut être généré par des **sources exogènes ou endogènes**. Les sources exogènes de stress oxydant sont nombreuses : pollution atmosphérique, fumée de cigarette, alcool, métaux lourds (e.g. plomb), certains médicaments (e.g. cyclosporine, gentamycine), alimentation (e.g. viandes fumées, huiles

---

<sup>1</sup> Espèces pro-oxydantes : Également appelées « espèces réactives de l'oxygène et de l'azote », elles désignent les radicaux-libres (e.g. anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , radical hydroxyl  $OH^{\cdot}$ , oxyde nitrique  $NO^{\cdot}$ ) et les molécules oxygénées non radicalaires (e.g. peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$ , peroxydes lipidiques).

de friture)... Les sources endogènes de stress oxydant sont par exemple une inflammation, une infection, une ischémie, ou un exercice physique excessif.

Les enfants prématurés et les nouveau-nés, du fait de leurs caractéristiques physiologiques, sont plus susceptibles que les adultes d'être sujets au stress oxydant (Ozsurekci & Aykac, 2016; Perrone et al., 2015). Ils présentent notamment des défenses antioxydantes relativement réduites (e.g. vitamine E,  $\beta$ -carotène) et un taux de fer libre plasmatique plus élevé pouvant amplifier le stress oxydant (réaction de Fenton).

Le stress oxydant serait impliqué dans la physiopathologie de nombreuses pathologies périnatales telles que l'hypoxie-ischémie du nourrisson ou l'entérocolite nécrosante (Gitto et al., 2002; Ozsurekci & Aykac, 2016). Le cerveau en développement est particulièrement sensible à ce stress : il est relativement déficient en enzymes antioxydantes et les membranes neuronales sont riches en acides gras polyinsaturés (aisément oxydables) (Buonocore Giuseppe et al., 2001; Perrone et al., 2015).

### 1.2.3. Stress toxique

Le stress toxique peut être généré par une multitude de **composés chimiques, exogènes ou endogènes**. Chaque composé chimique (ou famille de composé chimique) a son propre mode d'action. Le stress toxique est donc particulièrement difficile à prédire et à traiter.

Le *Tableau 1* présente quelques exemples de composés chimiques exogènes mis en cause ou suspectés dans l'apparition de troubles neurodéveloppementaux et neurologiques après exposition *in utero* ou au cours de l'enfance (Giordano & Costa, 2012). Ces composés toxiques peuvent notamment être des **polluants environnementaux**. Un exemple historique marquant est le méthylmercure qui est lié à l'apparition de la maladie de Minamata. Au milieu du XX<sup>ème</sup> siècle, la consommation par des femmes enceintes de poissons contaminés au méthylmercure dans la baie de Minamata (Japon) a conduit à la naissance de très nombreux enfants présentant des troubles neurodéveloppementaux importants (parésie spastique, retard mental, dyskinésie, convulsions, troubles de la parole). Le mécanisme d'action toxique du

méthylmercure est lié à sa grande affinité pour les groupements thiol de nombreuses protéines et enzymes, ce qui impacte de multiples processus cellulaires (e.g. apoptose, prolifération cellulaire, migration neuronale) (Giordano & Costa, 2012). Actuellement, l'impact des pesticides sur le développement cérébral est beaucoup étudié et largement débattu (Burns et al., 2013; Inserm, 2013; Roberts et al., 2018). L'exposition à ces produits phytosanitaires pourrait être à l'origine de troubles comportementaux (e.g. troubles de l'attention, autisme), augmenterait le risque de tumeurs cérébrales de l'enfant, et sensibiliserait le cerveau à des stress ultérieurs (Inserm, 2013; Roberts et al., 2018).

**Tableau 1 | Exemples de toxiques neurodéveloppementaux exogènes.**

Catégorie	Composé	Indice de neurotoxicité développementale	
		Animal	Humain
<b>Métal</b>	Méthylmercure	+++++	+++++
	Plomb	+++++	+++++
	Manganèse	+++	+++
	Arsenic	+++	++
<b>Solvant</b>	Éthanol	+++++	+++++
	Toluène	++++	+++++
<b>Pesticides</b>	Organophosphorés (variés)	++	++
	Organochlorés (e.g. DDT, dieldrine)	+	--
	Herbicides (e.g. paraquat)	+	--
	Fongicides (e.g. manèbe)	+	--
<b>Autres contaminants</b>	PCB	++++	+++
	PBDE	+++	+
	Phtalates	++	++
	Bisphenol A	++	--
	PFOS/PFOA	+	--
<b>Toxines naturelles</b>	Acide domoïque	++	--
<b>Médicaments</b>	Anti-épileptiques	++++	++++
<b>Stupéfiants</b>	Cocaïne	++	++

Les symboles (+ et -) ont été attribués arbitrairement par les auteurs.

Abréviations : DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane, PBDE : polybromodiphényléther, PCB : polychlorobiphényle, PFOS : perfluorooctane sulfonate, PFOA : acide de perfluorooctane.

D'après (Giordano & Costa, 2012).

Les **substances psychoactives à usage récréatif** (e.g. alcool, cocaïne) et les **médicaments** (e.g. anesthésiques, antiépileptiques) peuvent également être à l'origine de troubles neurodéveloppementaux. Par exemple, l'exposition prénatale à l'alcool peut engendrer le syndrome d'alcoolisation fœtale (dysmorphie cranio-faciale, hypotrophie

statur pondérale, malformations osseuses et viscérales, anomalies psychomotrices, retard mental léger, troubles du comportement). L'alcool entraînerait une apoptose neuronale, un dysfonctionnement des cellules gliales du fœtus ainsi que des anomalies placentaires (e.g. diminution du flux sanguin, réduction du transfert de nutriments) (Sapin, 2008).

Certains composés endogènes peuvent également générer des stress toxiques. Par exemple, la bilirubine, produit de dégradation de l'hémoglobine, est neurotoxique à forte concentration.

### 1.3. Traitements pédiatriques

De façon générale, l'arsenal thérapeutique disponible en pédiatrie est très limité. Non seulement peu de médicaments sont développés pour répondre aux besoins spécifiques de la population pédiatrique, mais en plus les médicaments destinés à la population générale (15 à 75 ans) sont très souvent contre-indiqués dans la population pédiatrique (Gherzi-Egea, Saudrais, et al., 2018). En effet, l'autorisation de mise sur le marché (AMM) de la plupart des médicaments ne comporte que peu ou pas d'informations précises sur l'efficacité, la sécurité, la pharmacocinétique et la pharmacodynamie de ces traitements chez l'enfant. Ce manque d'information concerne également les traitements prescrits aux femmes enceintes et allaitantes.

Par manque d'alternatives thérapeutiques, la **prescription de médicaments hors des spécifications prévues par leurs AMM** est courante chez les enfants et les femmes enceintes. Ces prescriptions correspondent à l'usage d'un médicament pour une indication autre que celle(s) fixée(s) par son AMM, par une voie d'administration ou avec un dosage (inférieur ou supérieur) différents de ceux recommandés, ou encore au non-respect de l'âge minimal ou des contre-indications. Les prescriptions hors-AMM concernent 45 à 60 % des médicaments prescrits en pédiatrie en Europe ; elles sont particulièrement fréquentes chez les prématurés (90 %) et les enfants en état critique admis en unité de soins intensifs (EMA, 2010).

La population pédiatrique présente pourtant des caractéristiques spécifiques qui rendent extrêmement délicate l'extrapolation des données obtenues chez l'adulte (Autret-Leca, 2010; Elzagallaai et al., 2017; Ghersi-Egea, Saudrais, et al., 2018). Les caractéristiques pharmacocinétiques de l'enfant, détaillées ci-après, illustrent bien la difficulté de ces adaptations posologiques. L'étape d'**absorption** après administration par voie orale, percutanée, pulmonaire ou intramusculaire, est différente chez les enfants et en particulier chez les nouveau-nés. Par exemple, leur surface cutanée est proportionnellement supérieure à celle de l'adulte et leur épiderme est plus fin, ce qui augmente significativement l'absorption percutanée et donc le risque de surdosage. Le volume de **distribution** est globalement plus large chez l'enfant. La concentration plasmatique en albumine est par exemple inférieure chez les nouveau-nés, ce qui induit une sensibilité accrue aux médicaments fortement liés aux protéines (e.g. sulfamides, ceftriaxone). Les interfaces sang-cerveau, qui contrôlent la distribution cérébrale de nombreux médicaments, présentent des caractéristiques développementales différentes de celles de l'adulte (Ghersi-Egea, Saudrais, et al., 2018). L'étape de **métabolisation** se fait par des enzymes dont l'expression et l'activité évoluent de façon importante au cours du développement. Par exemple, le paracétamol est uniquement métabolisé par la sulfotransférase à la naissance puisque la glucuronyl transférase est immature ; la demi-vie du paracétamol est augmentée ce qui nécessite l'espacement des prises. Concernant la phase d'**élimination**, la fonction rénale (filtration glomérulaire, sécrétion tubulaire) n'est mature qu'après 1 an (Elzagallaai et al., 2017).

La prescription de médicaments hors-AMM en pédiatrie et chez la femme enceinte augmente inévitablement le risque de développer des effets indésirables (Bellis et al., 2013; EMEA, 2004; Smyth et al., 2012). Ce risque dépend du type et du nombre de médicaments administrés, ce qui explique la prévalence élevée d'effets indésirables chez les enfants hospitalisés, souvent polymédiqués (10 %). Récemment, l'utilisation du valproate (Dépakine®) chez les femmes enceintes atteintes d'épilepsie a par exemple été reliée à un nombre important de malformations congénitales sévères.

Afin de combler ce vide thérapeutique, la *Food and drug administration* (FDA) et l'Agence européenne des médicaments (*European medicines agency*, EMA) encouragent

les sociétés pharmaceutiques à communiquer l'ensemble des données qui permettraient de mieux prédire l'efficacité et la sécurité des médicaments existants dans la population pédiatrique, ou à mener des études pédiatriques spécifiques si nécessaire. L'EMA a également créé le *Règlement pédiatrique européen* qui vise à faciliter le développement et l'accessibilité des médicaments à usage pédiatrique.

Malgré l'incidence importante des handicaps neurodéveloppementaux d'origine périnatale, les cliniciens ne disposent encore que de peu d'alternatives thérapeutiques pour traiter les pathologies périnatales. Le cas de l'encéphalopathie hypoxique-ischémique du nourrisson est un bon exemple de cette situation. Cette encéphalopathie, qui résulte d'une asphyxie fœtale par réduction de l'apport de sang ombilical, est la cause la plus importante de mortalité et de déficiences neurologiques chez les nouveau-nés à travers le monde (Millar et al., 2017). Dans les pays développés, son incidence est de 0,5 à 6 ‰ des naissances vivantes (Truttmann et al., 2012). Pourtant, le seul traitement actuellement préconisé pour limiter les dommages cérébraux de l'asphyxie fœtale est une hypothermie (33 °C) de la tête ou du corps entier. Même si cette méthode a permis de réduire significativement le taux de mortalité et de déficiences neurologiques, son efficacité pourrait être améliorée par l'utilisation conjointe d'autres thérapies. L'utilisation de molécules antioxydantes (N-acétylcystéine, allopurinol) a par exemple montré des résultats encourageants sur des modèles animaux d'hypoxie-ischémie (Millar et al., 2017). L'hypoxie-ischémie du nourrisson a fait l'objet d'une cinquantaine d'essais cliniques chez l'homme, dont une trentaine sont actuellement en cours (NIH, 2018).

## 2. Principaux mécanismes de protection du cerveau

Au sein du SNC, plusieurs mécanismes participent au maintien de l'homéostasie cérébrale et à l'élimination des toxiques endogènes ou exogènes. Tout d'abord, les **cellules de la macroglie** (astrocytes et oligodendrocytes) régulent localement la composition du liquide interstitiel cérébral. Les astrocytes participent activement au maintien de l'homéostasie cérébrale : ils régulent le pH du milieu interstitiel grâce à l'anhydrase carbonique, assurent la recapture et le recyclage du glutamate excitotoxique au niveau synaptique, et évacuent les ions  $K^+$  afin d'éviter le phénomène d'hyperexcitabilité neuronale (Bélanger & Magistretti, 2009). Les astrocytes sont aussi capables de protéger les neurones du stress oxydant grâce à leurs fortes activités enzymatiques antioxydantes (Desagher et al., 1996; Dringen et al., 2005). À l'instar des astrocytes, les oligodendrocytes participent à la régulation des taux extracellulaires de  $K^+$  et à la protection envers le stress oxydant (Allen & Lyons, 2018; Baud et al., 2004). La **circulation et le renouvellement du liquide interstitiel et plus largement du liquide céphalorachidien (LCR)** permet de drainer hors du SNC les composés toxiques et les déchets issus du métabolisme des cellules neurales. Enfin, des barrières cellulaires, communément appelées **interfaces sang-cerveau**, contrôlent l'ensemble des échanges entre le sang, le parenchyme cérébral et le LCR. Ces interfaces régulent les flux ioniques, permettent l'apport de nutriments, éliminent les déchets issus du métabolisme des cellules cérébrales et limitent également l'entrée dans le SNC de nombreuses substances exogènes dont des médicaments et des agents potentiellement neurotoxiques. Le rôle de la circulation du LCR et des interfaces sang-cerveau dans la neuroprotection est détaillé ci-après.

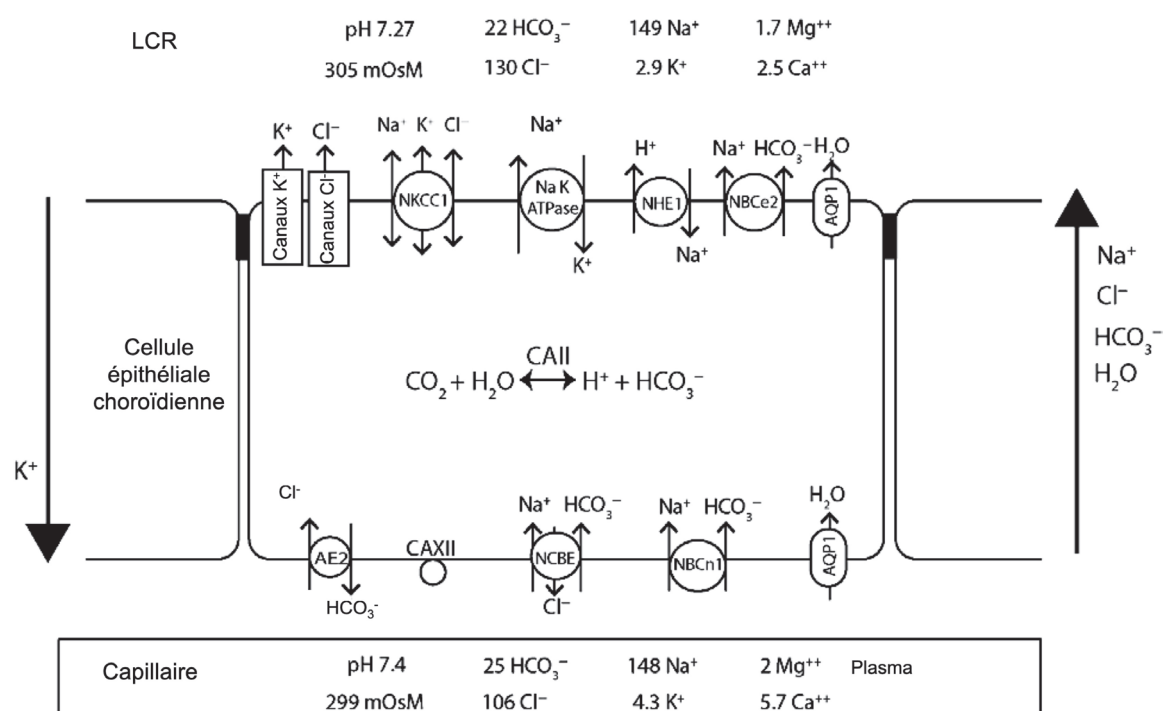
### 2.1. Liquide céphalorachidien

#### 2.1.1. Synthèse plexuelle et extra-plexuelle

Le LCR est principalement produit par les plexus choroïdes et en moindre mesure par des sources extra-choroïdiennes. La part exacte de chacune de ces deux composantes, plexuelle et extra-plexuelle, est cependant difficile à évaluer. Une revue approfondie de



la littérature réalisée par Hugh Davson et Malcolm Segal suggère que plus de 90 % du LCR serait d'origine plexuelle (Davson & Segal, 1996). Récemment, Stephen Hladky et Margery Barrand ont réétudié ces données : la production extra-plexuelle de LCR aurait été mal évaluée du fait de nombreuses limitations techniques et de mauvaises conceptions expérimentales, et son estimation nécessiterait de nouvelles investigations (Hladky & Barrand, 2014). Les valeurs de production indiquées ci-dessous sont donc données à titre indicatif, et à considérer avec précaution.



**Figure 1 | Transporteurs et canaux des cellules épithéliales choroïdiennes impliqués dans la sécrétion du liquide céphalorachidien.**

La sécrétion du liquide céphalorachidien (LCR) par les cellules épithéliales choroïdiennes fait intervenir de nombreux transporteurs ioniques. Les principaux ions transportés du sang vers le LCR sont les ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  et  $\text{HCO}_3^-$  ; l'ion  $\text{K}^+$  est transporté dans la direction opposée. La sécrétion du LCR repose sur l'activité de la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ ATPase}$ , localisée au pôle apical, qui pompe activement les ions  $\text{Na}^+$  de la cellule vers le LCR en échange d'ions  $\text{K}^+$ . Ce mouvement produit un gradient d'ions  $\text{Na}^+$  qui permet d'activer les transporteurs actifs secondaires. Au pôle basolatéral, l'ion  $\text{Na}^+$  est importé dans la cellule par l'échangeur  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$   $\text{Na}^+$ -dépendant  $\text{NCBE}/\text{NBCn2}$  ( $\text{SLC4A10}$ ) dont la stœchiométrie exacte n'est pas encore connue. Le rôle du cotransporteur  $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$   $\text{NBCn1}$  ( $\text{SLC4A7}$ ) dans la sécrétion du LCR n'est pas connu. Les cellules épithéliales choroïdiennes expriment les anhydrases carboniques II et XII qui produisent les ions  $\text{H}^+$  et  $\text{HCO}_3^-$  à partir d' $\text{H}_2\text{O}$  et de  $\text{CO}_2$ . Au niveau apical, l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{H}^+$   $\text{NHE1}$  ( $\text{SLC9A1}$ ) et le cotransporteur  $\text{Na}^+:\text{HCO}_3^-$   $\text{NBCe2}$  ( $\text{SLC4A5}$ ) sont impliqués dans la régulation

du pH du LCR. Le cotransporteur  $\text{Na}^+:\text{K}^+:\text{Cl}^-$  NKCC1 (SLC12A2) est localisé au pôle apical, mais la direction du transport ionique de ce transporteur n'est pas complètement élucidée. La majorité des ions  $\text{K}^+$  importés dans les cellules épithéliales choroïdiennes par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase retournent dans le LCR via les canaux potassiques KIR ou KV, ou via le cotransporteur  $\text{K}^+:\text{Cl}^-$  KCC4. Malgré ce recyclage, on peut observer un flux net d'ions  $\text{K}^+$  du LCR vers le sang. Au pôle basolatéral, l'ion  $\text{K}^+$  est excrété dans le sang par le cotransporteur  $\text{K}^+:\text{Cl}^-$  KCC3 (*non représenté*). L'ion  $\text{Cl}^-$  est importé du sang par l'échangeur basolatéral  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  AE2. Au pôle apical, le  $\text{Cl}^-$  est excrété dans le LCR par des canaux anioniques CLIR, qui peuvent également excréter les ions  $\text{HCO}_3^-$ . Les cellules épithéliales choroïdiennes sont également la voie d'entrée majoritaire des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le système nerveux central. Le mécanisme exact impliqué dans ce mouvement calcique n'est pas connu. Ces mouvements ioniques créent un gradient osmotique de faible intensité, qui rend peu probable le passage de l'eau à travers des canaux aqueux. Le canal AQP1 a cependant été localisé aux pôles basolatéral (faible expression) et apical des cellules épithéliales choroïdiennes (Praetorius & Damkier, 2017). Plus probablement, l'eau nécessaire à la formation du LCR pourrait utiliser le cotransporteur apical KCC, ou passer par voie paracellulaire via la protéine de jonction Cldn2 (Gherzi-Egea, Strazielle, et al., 2018).

Les concentrations ioniques (mM), le pH et l'osmolarité ( $\text{mOsM} \cdot \text{kg H}_2\text{O}^{-1}$ ) du LCR et du plasma présentés dans cette figure ont été mesurés chez le lapin.

Modifié d'après (Gherzi-Egea & Damkier, 2017).

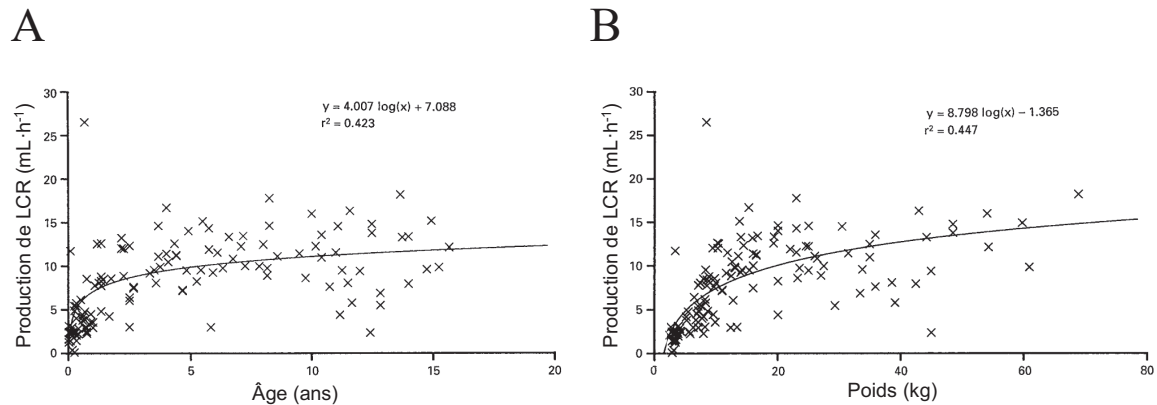
Les **plexus choroïdes** sont des structures hautement vascularisées qui font saillie dans les différents ventricules cérébraux. Ils sont formés d'un stroma conjonctif, riche en vaisseaux sanguins fenêtrés, entouré par une monocouche continue de cellules épithéliales cubiques polarisées. Les cellules épithéliales choroïdiennes sécrètent à leur pôle apical le LCR, synthétisé à partir du plasma. Le LCR n'est cependant pas un ultrafiltrat plasmatique : il résulte d'un véritable processus de sécrétion actif opéré par les cellules épithéliales choroïdiennes, qui a en grande partie été élucidé par des expérimentations réalisées chez l'animal. Le modèle de sécrétion proposé par Helle Damkier et Jeppe Praetorius est détaillé dans la *Figure 1* (Gherzi-Egea & Damkier, 2017; Praetorius & Damkier, 2017). Chez les mammifères adultes, la production choroïdienne de LCR, mesurée par perfusion ventriculo-cisternale, serait de l'ordre de 0,4 à 0,9  $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de tissu choroïdien (Davson & Segal, 1996). Chez l'homme adulte, les valeurs de vitesse de production du LCR trouvées dans la littérature sont variées. Ce paramètre a en effet été mesuré de multiples façons, sur des cohortes de patients aux caractéristiques différentes. Les premières valeurs ont été apportées par Rubin et collaborateurs, qui estimèrent cette vitesse à 0,37  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$  soit 530  $\text{mL} \cdot \text{j}^{-1}$  en utilisant la

dérivation ventriculo-cisternale sur un groupe de 3 patients d'âges variés (12, 14 et 50 ans) (Rubin et al., 1966). À titre de comparaison, Christer Nilsson et collaborateurs calculèrent une production journalière (attribuée aux plexus choroïdes des ventricules latéraux et du 3<sup>ème</sup> ventricule) de  $650 \pm 60$  mL à partir de l'imagerie à résonnance magnétique (N=6, 25 à 32 ans) (Nilsson et al., 1992). Chez le nouveau-né et le jeune enfant, la vitesse de production du LCR est plus faible que chez l'adulte : de 0,11 à  $0,14 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , soit 160 à  $200 \text{ mL} \cdot \text{j}^{-1}$  en fonction des auteurs (Drake et al., 1991; Yasuda et al., 2002). Une étude plus ancienne évalue cette production à  $0,35 \pm 0,02 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $500 \pm 30 \text{ mL} \cdot \text{j}^{-1}$ ), mais l'âge moyen des enfants était plus élevé (8,3 ans) et leur nombre plus restreint (n = 12) (Cutler et al., 1968).

Une partie du LCR provient du **liquide interstitiel cérébral** produit par des sources extra-plexuelles. En effet, le volume interstitiel cérébral restant globalement constant en situation physiologique, la production continue de liquide interstitiel cérébral induit le mouvement de ce liquide vers les espaces ventriculaires et sous-arachnoïdiens (Cserr et al., 1986) (*cf* 2.1.3.2). Il existe plusieurs sources de liquide interstitiel cérébral. Tout d'abord, le métabolisme des cellules cérébrales produirait  $\sim 28 \text{ pL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de tissu<sup>-1</sup>, soit environ  $40 \text{ mL} \cdot \text{j}^{-1}$  pour un cerveau de 1 kg (Abbott, 2004). La **respiration cellulaire** (glycolyse, cycle de Krebs) produit en effet de l'eau et du CO<sub>2</sub> à partir du glucose. Par ailleurs, les **cellules endothéliales des capillaires cérébraux** sont aussi capables de sécréter du liquide interstitiel cérébral (Gherzi-Egea & Damkier, 2017; Mokgokong et al., 2014). Leur capacité de production serait cependant cent fois inférieure à celle des cellules épithéliales choroïdiennes (Abbott, 2004).

Le volume total du système de circulation du LCR étant d'environ 160 mL chez l'homme adulte, on retiendra que la production du LCR (plexuelle et extra-plexuelle) permet au minimum son renouvellement complet 3 à 6 fois par jour (Davson & Segal, 1996). Il est à noter que ces valeurs moyennes reflètent assez mal les importantes variations inter- et intra-individuelles observées chez l'homme. La production de LCR est par exemple plus faible chez les femmes, ce qui est visible dès les stades précoces de développement postnatal (Drake et al., 1991; Yasuda et al., 2002). Chez l'enfant, la production du LCR est corrélée positivement avec le poids et l'âge de l'enfant (*Figure*

2). Enfin, chez l'enfant comme chez l'adulte, la vitesse de production du LCR peut varier de façon importante au cours de la journée ; elle est par exemple favorisée par l'activité physique et le sommeil (Drake et al., 1991; Nilsson et al., 1992).



**Figure 2 | Production horaire moyenne de liquide céphalorachidien chez l'enfant en fonction de l'âge (A) et du poids corporel (B).**

La production horaire de liquide céphalorachidien (LCR) ( $\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$ ) a été mesurée sur des enfants de 0 à 16 ans (moyenne 4,6 ans,  $N=130$ ) présentant une hydrocéphalie et traités par dérivation ventriculaire cérébrale externe.

Il est à noter que l'hydrocéphalie n'est généralement pas due à une modification de la vitesse de production du LCR, mais plutôt à un défaut d'élimination.

D'après (Yasuda et al., 2002).

### 2.1.2. Composition

Les compositions du LCR et du sang de l'homme adulte sont détaillées dans le *Tableau 2*. Les concentrations du LCR en ions sodium, chlorure, bicarbonate et magnésium sont supérieures à celle du plasma, alors que la concentration en ions potassium est inférieure (Thrane et al., 2014). Le LCR ne compte que  $0,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  de protéines (principalement l'albumine et la transthyrétine) et  $1 \text{ mM}$  d'acides aminés contre respectivement  $70 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  et  $9 \text{ mM}$  dans le sang. Le LCR présente également un niveau de glucose plus faible que le sang et une très faible quantité de cellules ( $< 1$  à  $5$  cellules par  $\mu\text{L}$ ). Chez le nouveau-né, la protéinorachie est plus élevée ( $\sim 0,9 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) ; elle diminue progressivement pour atteindre les valeurs de l'adulte autour de 3 mois (Noureldein et al., 2018; Prajapati et al., 2015; Shah et al., 2011). La glycorachie est en revanche plus faible ( $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) (Noureldein et al., 2018; Prajapati et al., 2015).

Tableau 2 | Composition du sang et du liquide céphalorachidien chez l'homme adulte.

	Sang	Liquide céphalorachidien
Eau (%)	93	99
Sodium (mM)	138	155
Chlore (mM)	102	125
Potassium (mM)	4,5	3-4
Bicarbonate (mM)	23	28
Acides aminés (mM)	9	1
Protéines (mg·mL <sup>-1</sup> )	70,0	0,4
Glucose (mM)	5	3-4
Calcium (mM)	1,5	1,5-2
Magnésium (mM)	0,5	0,9-1,3
pH	7,40	7,38

D'après (Thrane et al., 2014).

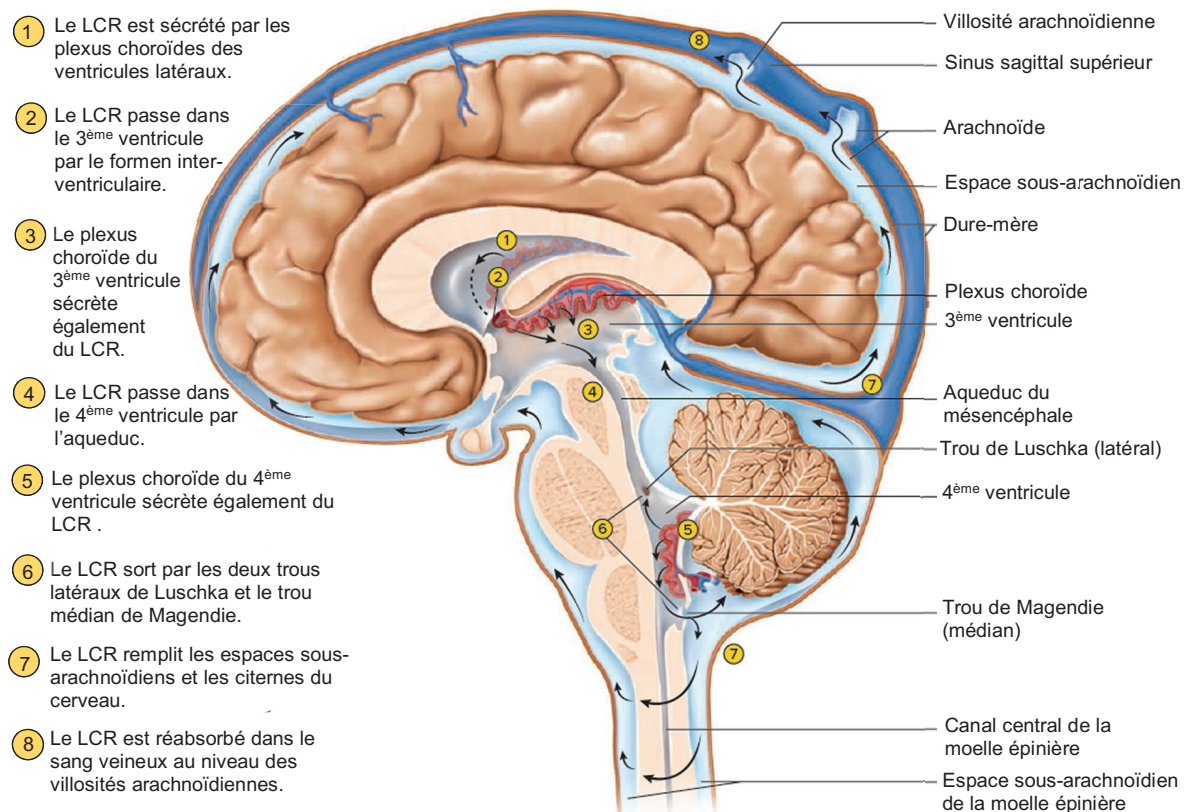
### 2.1.3. Circulation

#### 2.1.3.1. Système ventriculaire et espaces sous-arachnoïdiens

##### *Description*

Le cerveau est un organe creux qui comporte quatre cavités ventriculaires dans lesquelles les plexus choroïdes sécrètent le LCR. Globalement, le LCR circule à travers ce **système ventriculaire** avant de rejoindre les **espaces sous-arachnoïdiens**, les **citernes du crâne** et l'**espace sous-arachnoïdien la moelle épinière** à partir desquels il est résorbé par les systèmes veineux et lymphatique (*Figure 3*). Chez l'homme adulte, le volume total de LCR (système ventriculaire et espaces sous-arachnoïdiens) est de 140 à 170 mL selon les individus et les auteurs (Davson & Segal, 1996). Chez le nouveau-né et l'enfant, ce volume peut respectivement être estimé à 45 et 90 mL (Cutler et al., 1968; Hüppi et al., 1998; Rochette et al., 2016). Le volume de LCR cérébral (système ventriculaire, espaces sous-arachnoïdien et citernes du crâne) représente 10 % du volume crânien total, chez l'adulte comme le nouveau-né (Davson & Segal, 1996; Hüppi et al., 1998). Cette proportion est plus importante aux stades précoces de développement cérébral : une étude réalisée par imagerie à résonance magnétique (IRM) quantitative a montré que le LCR représente près de 15 % du volume crânien total chez le fœtus à 28 semaines de développement (Hüppi et al., 1998). Ces observations ont été corroborées par des études réalisées chez l'animal. Une analyse morphométrique réalisée à partir de coupes de cerveau de rat a par exemple montré que la part du volume crânien occupé par

le LCR évolue de  $28,1 \pm 2,7$  à  $9,9 \pm 0,5$  % entre le 19<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire et le 9<sup>ème</sup> jour postnatal (Gherzi-Egea et al., 2015).



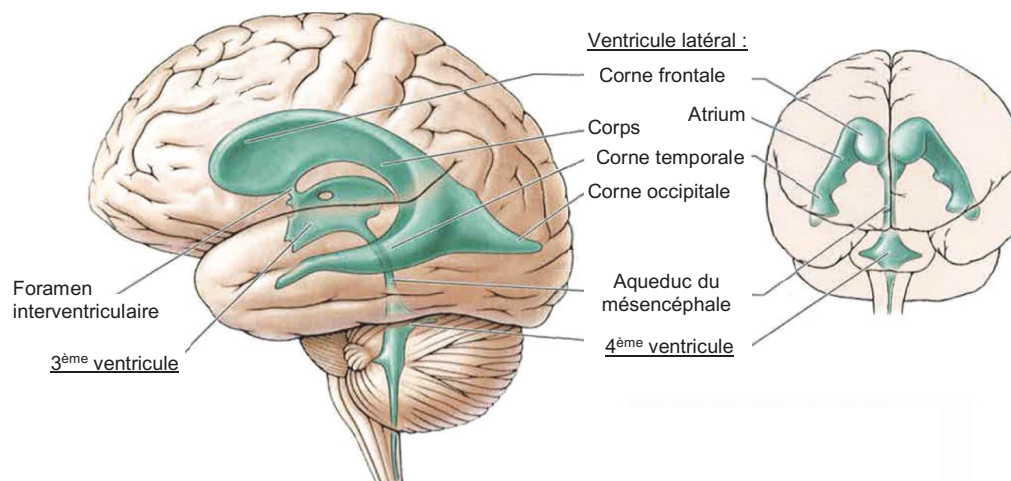
**Figure 3 | Système de circulation du liquide céphalo-rachidien (LCR).**

D'après (Wise & Saladin, 2017).

Le système ventriculaire est représenté dans la *Figure 4* et détaillé ci-après. Les deux **ventricules** latéraux occupent de façon symétrique le centre de chacun des deux hémisphères cérébraux. Le corps de ces ventricules est doté de 3 extensions : une corne frontale, une corne occipitale et une corne temporale. Chaque ventricule latéral est occupé par un plexus choroïde, qui s'étend du corps ventriculaire à la corne temporale. Les deux ventricules latéraux sont reliés au 3<sup>ème</sup> ventricule, plus étroit, par les foramens interventriculaires anciennement appelés trous de Monro. À ce niveau, les plexus choroïdes des ventricules latéraux communiquent avec le plexus choroïde du 3<sup>ème</sup> ventricule qui est accolé au toit du 3<sup>ème</sup> ventricule. Les parois dorsale et ventrale du 3<sup>ème</sup>



ventricule se rejoignent ensuite pour former l'aqueduc du mésencéphale, ou aqueduc de Sylvius. Cet aqueduc relie le 3<sup>ème</sup> ventricule au 4<sup>ème</sup> ventricule, situé entre le pont et la base du cervelet. Le 4<sup>ème</sup> ventricule présente des extensions latérales qui s'étendent de part et d'autre du pont. Ce ventricule est connecté aux espaces sous-arachnoïdiens par le trou de Magendie (ouverture médiane) et les deux trous de Luschka (ouvertures latérales, aux extrémités des récessus). Le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, indépendant des autres plexus choroïdes, est apposé au plafond du 4<sup>ème</sup> ventricule qu'il traverse en totalité pour ressortir au niveau du trou de Magendie et des deux trous latéraux de Luschka. Chez l'adulte, le volume total du système ventriculaire est de 24 à 37 mL selon les auteurs (Davson & Segal, 1996; Last & Tompsett, 1953; Wyper et al., 1979). Le volume ventriculaire est légèrement plus faible chez les femmes, chez qui les corps des ventricules latéraux sont plus fins (Last & Tompsett, 1953).

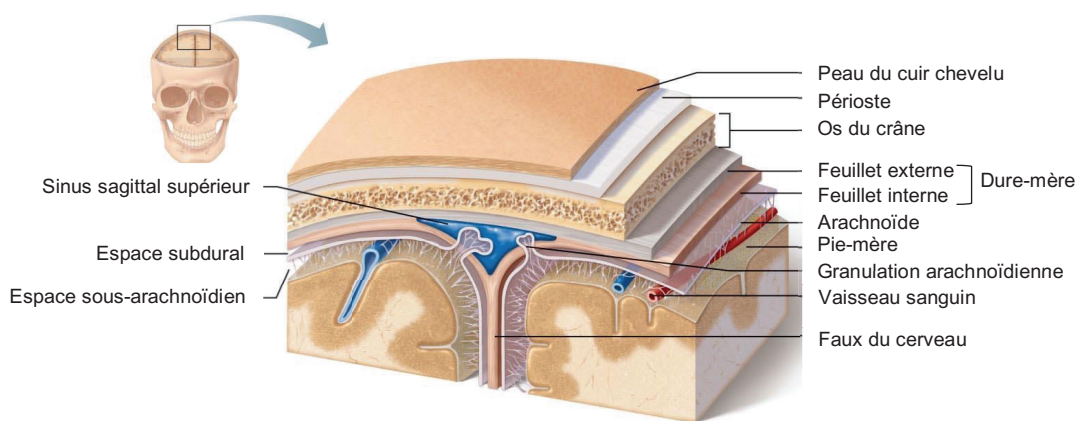


**Figure 4 | Système ventriculaire cérébral.**

D'après (Wise & Saladin, 2017).

Les **espaces sous-arachnoïdiens** sont situés entre l'arachnoïde et la pie-mère ; ils se situent à la surface des hémisphères cérébraux, ainsi qu'au niveau des citernes sous-arachnoïdiennes, et le long de la moelle épinière. Les citernes sont des dilatations de l'espace sous-arachnoïdien. La citerne sous-arachnoïdienne la plus importante, appelée *cisterna magna* ou citerne cérébello-médullaire, est reliée au 4<sup>ème</sup> ventricule par le trou de Magendie.

À partir des espaces sous-arachnoïdiens, le LCR peut être résorbé dans le sang veineux au niveau des **granulations arachnoïdiennes de Pacchioni** (*Figure 5*). Ces granulations, ou villosités, sont des protrusions de la méninge arachnoïdienne qui traversent la dure-mère pour s'insinuer dans les sinus veineux. Ces villosités fonctionnent comme des valves unidirectionnelles : elles permettent le passage du LCR lorsque sa pression hydrostatique est supérieure à celle du sang veineux.

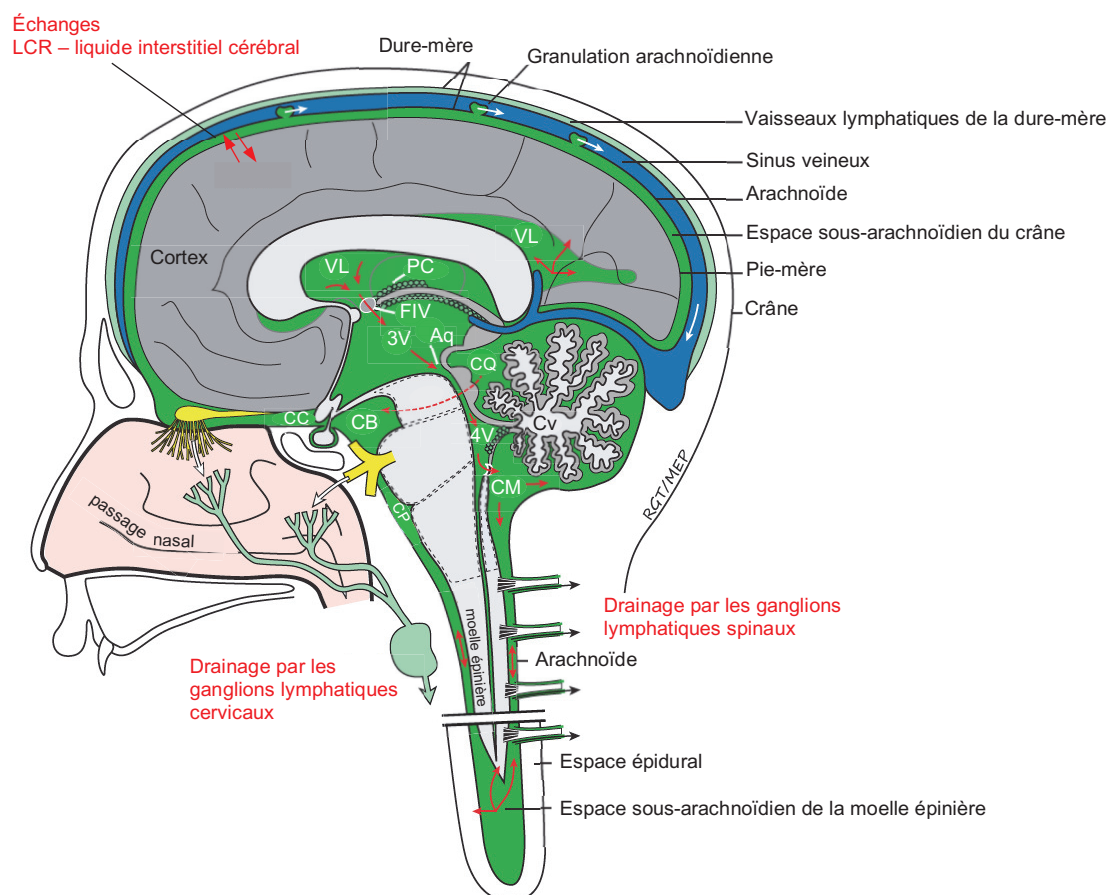


**Figure 5 | Localisation des granulations arachnoïdiennes de Pacchioni.**

D'après (Wise & Saladin, 2017).

Bien que le **système lymphatique** n'irrigue pas à proprement parler le SNC, il constitue une voie de drainage pour le LCR (*Figure 6*) (Absinta et al., 2017; Cserr et al., 1992; Louveau et al., 2015; Weed, 1914; Weller et al., 2009). Des études réalisées chez l'animal ont montré que le LCR sous-arachnoïdien peut être capté par les vaisseaux lymphatiques longeant les vaisseaux sanguins de la dure-mère et certains nerfs crâniens (olfactif, optique, trijumeau, auditif, glossopharyngien, vague, accessoire) pour être éliminé par les ganglions lymphatiques cervicaux (Cserr et al., 1992; Qiaoli Ma et al., 2017). Le LCR présent dans l'espace sous-arachnoïdien de la moelle épinière peut quant à lui être drainé par les vaisseaux lymphatiques des nerfs spinaux et être résorbé dans les ganglions lymphatiques correspondants.





**Figure 6 | Drainage veineux lymphatique du liquide céphalo-rachidien chez l'homme adulte.**

Le liquide céphalo-rachidien (LCR, vert) est principalement produit par les plexus choroïdes siégeant au sein des ventricules cérébraux. Après avoir parcouru le système ventriculaire interne du cerveau (*flèches rouges*), le LCR se retrouve dans les espaces sous-arachnoïdiens du crâne et de la moelle épinière. À partir de l'espace sous-arachnoïdien du crâne, le LCR peut être drainé par le sang veineux au niveau des villosités arachnoïdiennes (ou granulations arachnoïdiennes de Pacchioni), ou par les vaisseaux lymphatiques longeant les sinus veineux de la dure-mère (*flèches blanches ou noires*). Le LCR peut aussi être drainé par les vaisseaux lymphatiques longeant les nerfs olfactif, optique, trijumeau, facial et auditif jusqu'aux ganglions lymphatiques cervicaux (*flèches blanches*). Le réseau lymphatique qui longe le nerf olfactif, particulièrement étudié chez le rongeur, traverse la plaque criblée (ou cribriforme) de l'os ethmoïde. À partir de l'espace sous-arachnoïdien de la moelle épinière, le LCR peut également rejoindre les vaisseaux lymphatiques longeant les nerfs spinaux et être éliminé par les ganglions lymphatiques lombaires (*flèches noires*). Abréviations : Aq : aqueduc du mésencéphale, CB : citerne basale (ou interpédonculaire), CCh : citerne chiasmatique, CM : *cisterna magna* (ou citerne cérébromédullaire), CQ : citerne quadrigéminal, CP : citerne pontique, Cv : cervelet, FIV : foramen interventriculaire, LCR : liquide céphalo-rachidien, PC : plexus choroïde, VL : ventricule latéral, 3V : 3<sup>ème</sup> ventricule, 4V : 4<sup>ème</sup> ventricule.

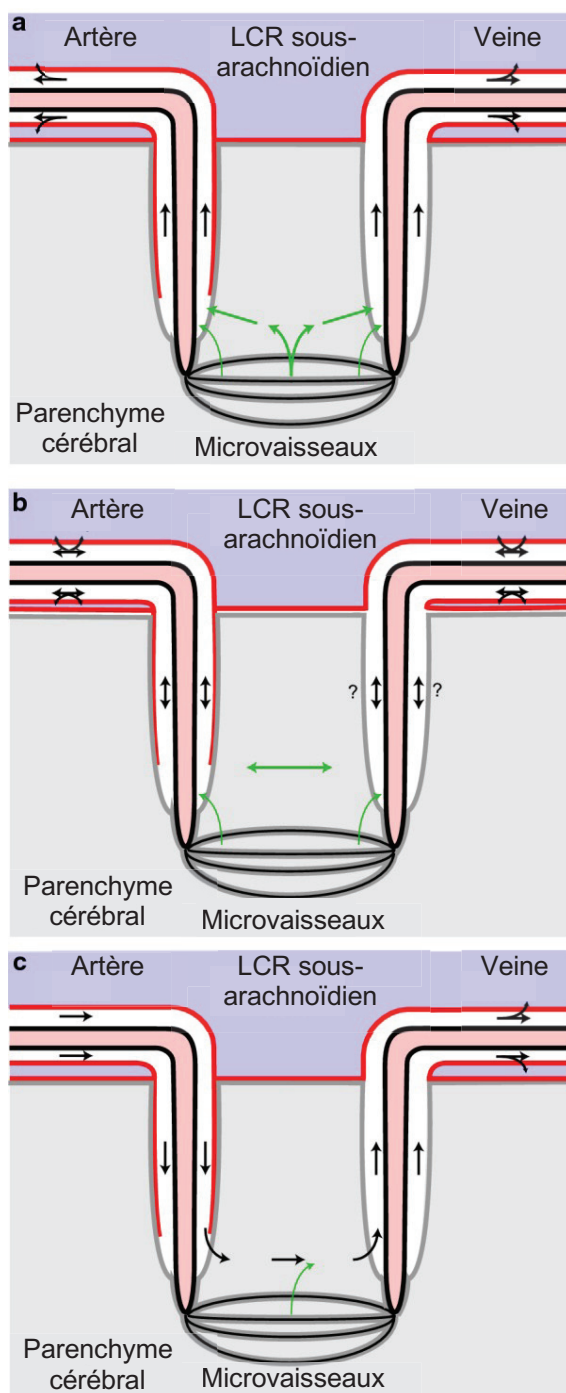
Modifié d'après (Pizzo & Thorne, 2017).

Chez l'homme adulte, il était généralement admis que la majorité du LCR est drainé dans le sang veineux à travers les villosités arachnoïdiennes. Ce postulat est actuellement remis en question : les villosités arachnoïdiennes ne pourraient être qu'un système secondaire venant suppléer le drainage lymphatique du LCR (Qiaoli Ma et al., 2017). Chez le fœtus humain et le nouveau-né, le LCR serait principalement drainé dans le système lymphatique, étant donné que les villosités arachnoïdiennes n'apparaissent qu'à la 39<sup>ème</sup> semaine de gestation, et continuent à se développer jusqu'à 18 mois après la naissance (Papaiconomou et al., 2002; Sakka et al., 2011; Weller et al., 2009). La prédominance de la résorption lymphatique aux stades précoces de développement n'a cependant encore jamais été formellement démontrée chez l'homme.

### ***Forces de circulation***

La circulation du LCR est attribuée à différents facteurs. Le flux du LCR est tout d'abord dû à sa production continue par les plexus choroïdes, à l'origine d'un **gradient de pression hydrostatique**. Le LCR est par ailleurs animé d'un **mouvement pulsatile**, de l'ordre d'un battement par seconde, qui favoriserait le mélange et le déplacement du LCR. Ce mouvement pulsatile est principalement attribué aux battements cardiaques : la systole fait gonfler les plexus choroïdes et le tissu cérébral, ce qui diminue le volume ventriculaire et favorise le mélange du LCR tout en l'entraînant vers ses sites de drainage (Abbott et al., 2018; Nilsson et al., 1992). La respiration pourrait également participer à ces mouvements pulsatiles, mais à une fréquence moindre. Enfin, les **cellules épendymaires** tapissant les parois des ventricules cérébraux sont dotées de **cils** qui, en plus de mélanger le LCR, le drainent vers les espaces sous-arachnoïdiens. L'importance de ces cils n'est pas à négliger : une fonction ciliaire anormale est associée au développement de ventriculomégalie et d'hydrocéphalie (Banizs et al., 2005).

### 2.1.3.2. Échanges liquide céphalorachidien – liquide interstitiel cérébral



**Figure 7 | Hypothèses concernant la circulation du liquide interstitiel cérébral et/ou du liquide céphalorachidien à travers le parenchyme cérébral.**

**a.** Proposition initiale de Hélène Cserr. Les microvaisseaux cérébraux sécrètent le liquide interstitiel cérébral qui est évacué du parenchyme cérébral via des voies privilégiées, ici les espaces périvasculaires.

**b.** Mouvements de convection. Le liquide interstitiel cérébral est produit par les microvaisseaux et le parenchyme cérébral. L'évacuation de ce liquide interstitiel se fait via les espaces périvasculaires, et est favorisée par des mouvements de convection.

**c.** Système glymphatique. Le liquide céphalorachidien (LCR) arachnoïdien peut pénétrer dans le parenchyme cérébral en suivant les espaces périvasculaires des artères pénétrantes. Il est excrété dans le parenchyme cérébral à partir duquel il va rejoindre les espaces périvasculaires des veines. Le flux du LCR entraîne avec lui le liquide interstitiel cérébral et les solutés qu'il transporte.

Les lignes rouges représentent les membranes piales, les lignes grises représentent la *glia limitans*, les flèches noires représentent le déplacements des marqueurs (utilisés pour étudier l'élimination de liquide interstitiel cérébral), et les flèches vertes représentent la diffusion.

D'après (Hladky & Barrand, 2018).

Le LCR et le liquide interstitiel cérébral peuvent communiquer de façon bidirectionnelle à travers l'épendyme et la pie-mère, qui sont relativement perméables (Figure 11). Les échanges entre le LCR et le liquide interstitiel cérébral permettent de

réguler l'homéostasie cérébrale, de diffuser les composés produits par le parenchyme cérébral, de maintenir un volume cérébral constant, et enfin de drainer le liquide interstitiel cérébral et les solutés qu'il transporte (Abbott et al., 2018; Cserr et al., 1986). Les différentes hypothèses concernant la circulation du liquide interstitiel cérébral, illustrées dans la *Figure 7*, sont présentées ci-dessous.

### ***Hypothèse 1***

Lewis Weed puis Hélène Cserr ont très tôt décrit l'existence d'un flux unidirectionnel de liquide interstitiel cérébral du parenchyme cérébral au LCR sous-arachnoïdien, via les espaces périvasculaires cérébraux et certains faisceaux de la substance blanche (*Figure 7a*) (Cserr et al., 1986; Weed, 1914). Hélène Cserr a en effet montré chez le rat que des composés de tailles différentes (900, 4k et 69k Da), n'ayant pas le même coefficient de diffusion, étaient pourtant éliminés à la même vitesse dans le sang et le LCR après micro-injection dans le parenchyme cérébral (noyau caudé) (Cserr et al., 1986). Ce flux unidirectionnel serait généré par la production continue de liquide interstitiel cérébral.

Stephen Hladky et Margery Barrand jugent peu probable que l'efflux des composés de l'espace interstitiel cérébral soit uniquement dépendant de la production du liquide interstitiel cérébral (Hladky & Barrand, 2018). Cette production devrait en effet être de 1,2 à 2,4 L·j<sup>-1</sup> afin d'expliquer la demi-vie de l'inuline ou du sucrose injectés dans le parenchyme cérébral ( $t_{1/2} = 2-4$  h,  $V_d = 200 \mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

### ***Hypothèse 2***

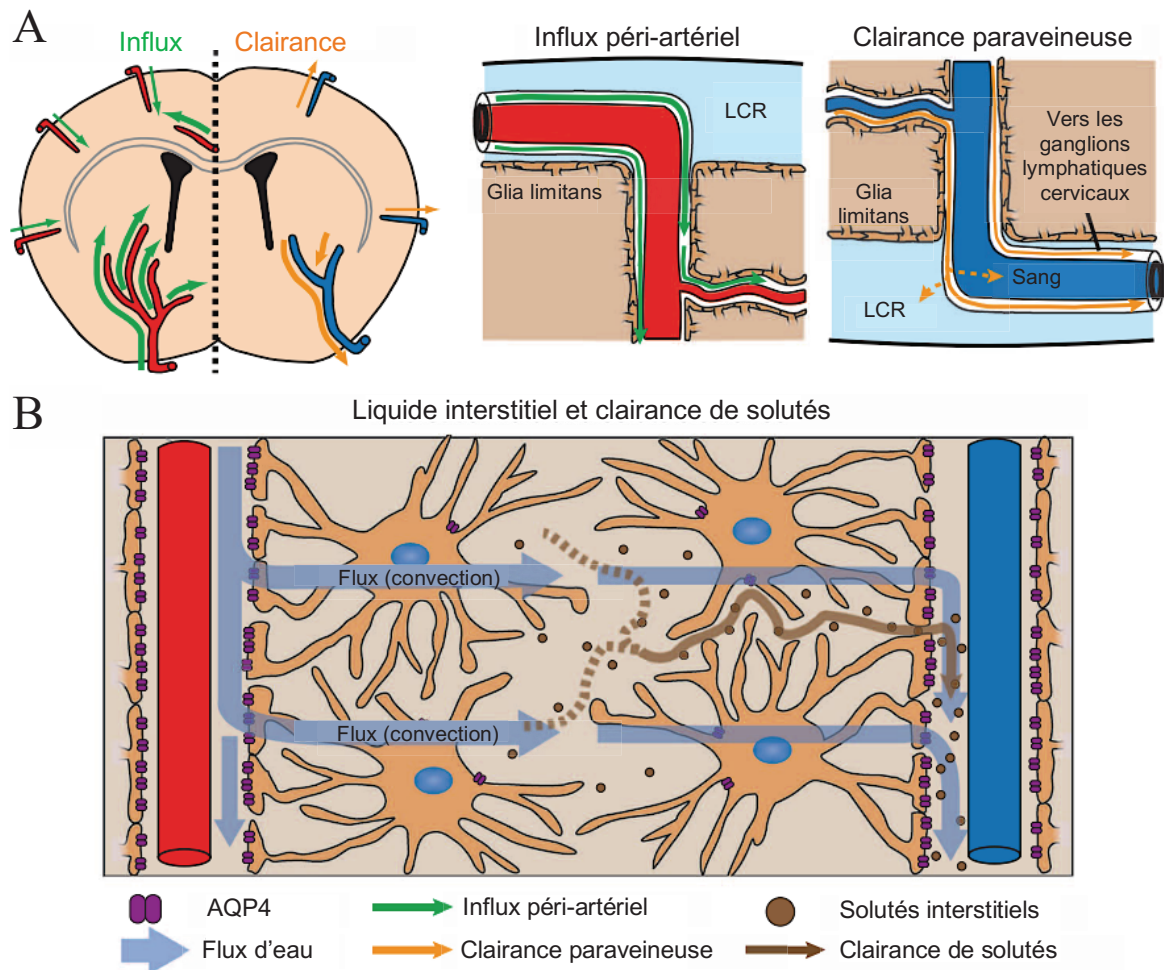
Plus récemment, ces résultats ont été revisités par le groupe de Maiken Nedergaard à l'aide de la microscopie bi-photonique (*Figure 7c*). En 2012, Jeffrey Iliff décrit chez la souris un système complexe d'échanges entre le liquide interstitiel cérébral et le LCR, baptisé « système glymphatique » (Iliff et al., 2012). Ce « système glymphatique », décrit dans la *Figure 8*, présente trois composantes : l'influx du LCR sous-arachnoïdien le long des espaces périvasculaires artériels, le flux unidirectionnel du liquide interstitiel cérébral (composé notamment du LCR infiltrant) des espaces périvasculaires artériels aux espaces périvasculaires veineux, et l'efflux de ce liquide interstitiel le long des espaces

périvasculaires veineux en direction du LCR sous-arachnoïdien. L'influx du LCR dans les espaces périvasculaires artériels serait principalement généré par les pulsations des cellules musculaires lisses entourant les artères, et par un gradient de pression (Jessen et al., 2015). Le LCR et les solutés qu'il transporte sortiraient ensuite des espaces périvasculaires artériels par voie paracellulaire à travers le manchon astrocytaire (solutés < 20 nm), ou via des transporteurs spécifiques (e.g. protéine A $\beta$ ) (Iliff et al., 2012). La différence de pression hydrostatique entre les espaces périvasculaires artériels et veineux créerait un flux unidirectionnel de liquide interstitiel cérébral (et de solutés qu'il transporte) en direction des espaces périvasculaires veineux. Ce mouvement serait accompagné et renforcé par un flux d'eau généré par la distribution asymétrique de l'aquaporine 4 (AQP4) entre les pieds astrocytaires bordant les artères, les veines et les capillaires (Iliff et al., 2012).

Le travail de Iliff soulève de nombreuses interrogations dont certaines sont reportées ci-après. Tout d'abord, si la clairance des solutés des espaces interstitiels cérébraux est uniquement dépendante d'un flux liquidien unidirectionnel entre les espaces périvasculaires artériels et veineux, ce flux devrait atteindre 1,2 à 2,4 L·j<sup>-1</sup> (*cf Hypothèse I*). Ces valeurs, bien supérieures aux estimations de production de LCR et de liquide interstitiel cérébral, suggèrent que le LCR et le liquide interstitiel parcourent plusieurs fois le « système glymphatique » avant d'être éliminés dans le sang veineux ou dans la circulation lymphatique (Hladky & Barrand, 2018). Par ailleurs, l'influx du LCR dans les espaces périvasculaires artériels, observé chez la souris après injection de traceurs fluorescents dans la *cisterna magna*, a pu être surestimé. L'injection du traceur a pu artificiellement augmenter la pression du LCR dans le compartiment sous-arachnoïdien, et augmenter l'entrée du LCR dans les espaces périvasculaires artériels. Enfin, le rôle du canal AQP4 dans le « système glymphatique » est discuté. À l'aide de plusieurs molécules traceurs, Iliff a montré *in vivo* que le flux du liquide interstitiel cérébral entre les espaces périvasculaires artériels et veineux était réduit chez les souris KO-*Aqp4* et en a déduit que l'Aqp4 participait à la création de ce flux liquidien (Iliff et al., 2012). La contribution du canal AQP4 est peut-être surévaluée ; des expérimentations réalisées *in vitro* (astrocytes murins) montrent que le *knock down* d'*Aqp4* peut s'accompagner d'un



réarrangement du cytosquelette, et d'une diminution importante de la connexine 43 qui pourraient également modifier le flux liquidien (Nicchia et al., 2005).



**Figure 8 | Représentation schématisée du système glymphatique.**

**A.** Le liquide céphalo-rachidien (LCR) pénètre dans le cerveau le long des espaces périvasculaires des artères pénétrantes (*flèches vertes*), alors que le liquide interstitiel cérébral est éliminé du cerveau le long des espaces périvasculaires veineux (*flèches orange*). **B.** Le flux convectif du liquide interstitiel cérébral entre les espaces périvasculaires artériel et veineux est facilité par le flux d'eau créé par les canaux AQP4 des astrocytes (*flèches bleues*), et entraîne les solutés interstitiels du parenchyme cérébral (*flèches marron*). À partir des espaces périvasculaires veineux, le liquide interstitiel cérébral et les solutés qu'il transporte peuvent être éliminés dans le sang des veinules post-capillaires, rejoindre le LCR sous-arachnoïdien, ou suivre les parois veineuses pour rejoindre les ganglions lymphatiques cérébraux.

D'après (Iliff et al., 2012).

### ***Hypothèse 3***

Une hypothèse ancienne, alternative au « système glymphatique », a récemment connu un regain d'intérêt. Elle est basée sur l'existence de mouvements de convection au sein des espaces périvasculaires artériels et potentiellement veineux (*Figure 7b*) (Hladky & Barrand, 2014). Selon cette hypothèse, l'efflux du liquide interstitiel cérébral commence par la diffusion de ce liquide sur une courte distance ( $\sim 100\text{-}200\ \mu\text{m}$ ), des capillaires de la BHE jusqu'aux espaces périvasculaires des vaisseaux avoisinants. Une fois dans les espaces périvasculaires artériels, le liquide interstitiel est activement mélangé par la compression périodique ( $\sim 1$  fois par seconde) de l'espace périvasculaire sous l'influence des variations de pression sanguine lors du cycle cardiaque. Ce mélange crée des mouvements convectifs, d'avant en arrière. Indépendamment du flux net du liquide interstitiel, ce mélange favorise le déplacement des solutés selon leurs gradients de concentration.

#### **2.1.4. Rôles du liquide céphalorachidien**

Le LCR a un rôle primordial dans le développement, la protection et le fonctionnement du SNC.

Chez l'embryon, la pression hydrostatique apportée par le LCR est essentielle à la **formation même du SNC**. Une pression hydrostatique trop faible réduit le volume cérébral total (tissu cérébral et cavités ventriculaires) (Desmond & Jacobson, 1977). Une pression hydrostatique trop importante réduit le volume du tissu cérébral, qui est comprimé par la quantité importante de LCR emplissant les ventricules cérébraux (hydrocéphalie).

Le LCR assure par ailleurs une **protection physique** au SNC. L'encéphale flotte littéralement dans le LCR, qui assure un rôle d'amortisseur visqueux contre les chocs éventuels. Selon le principe de la poussée d'Archimède, le LCR réduit par ailleurs le poids apparent de l'encéphale, ce qui évite son affaissement. Enfin, le volume du LCR varie en fonction du volume occupé par l'encéphale ce qui permet de maintenir la pression intracrânienne constante.

Le LCR a un véritable **rôle nourricier** : il transporte les ions (e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ), vitamines (e.g. vitamine C, folates, thiamine monophosphate), protéines (e.g. transthyrétine, leptine), lipides (e.g. cholestérol), glucose et autres molécules et métabolites indispensables au développement et au bon fonctionnement des cellules neurales (Spector, Snodgrass, et al., 2015; Wirth et al., 2014). La plupart de ces éléments, issus du sang, pénètrent dans le cerveau par la BHE (e.g. glucose, biotine, lactate, riboflavine) ; d'autres sont uniquement apportés par les plexus choroïdes (e.g. vitamine C, folates) (Spector, Snodgrass, et al., 2015).

Le LCR constitue aussi une **voie de transport** de choix au sein du SNC (Abbott et al., 2018; Zappaterra & Lehtinen, 2012). Premièrement, il peut permettre la diffusion cérébrale d'un composé produit par une région spécifique du cerveau. Par exemple, la mélatonine, molécule antioxydante impliquée dans le rythme circadien, est sécrétée par la glande pinéale à proximité du 3<sup>ème</sup> ventricule et peut atteindre ses zones cibles (noyaux suprachiasmatiques, hypothalamus, hippocampe, plexus choroïdes) grâce au mouvement du LCR (Abbott et al., 2018). Deuxièmement, le LCR permet la diffusion cérébrale des composés d'origine sanguine qui traversent la barrière sang-LCR choroïdienne. C'est notamment le cas de la vitamine C qui, en condition physiologique, est uniquement apportée au cerveau via le transporteur choroïdien SLC23A1. De la même façon, les folates réduits (méthyltétrahydrofolates, MeTHF) sont principalement apportés au SNC par les plexus choroïdes grâce à un système de transport complexe impliquant le récepteur aux folates  $\text{FR}\alpha$ , le transporteur SLC46A1, et le transporteur de folates réduits RFC (*reduced folate carrier*) (Spector, 2009). Enfin, le LCR transporte les composés synthétisés par les plexus choroïdes ou les méninges. Les plexus choroïdes produisent par exemple la transthyrétine, qui est la seule protéine de transport des hormones thyroïdiennes dans le SNC (Wirth et al., 2014).

Le LCR a un rôle important dans le **maintien de l'homéostasie cérébrale**, notamment grâce aux échanges avec le liquide interstitiel cérébral (*cf* §2.1.3.2), et le **drainage des déchets métaboliques** produits par l'activité des cellules neurales.



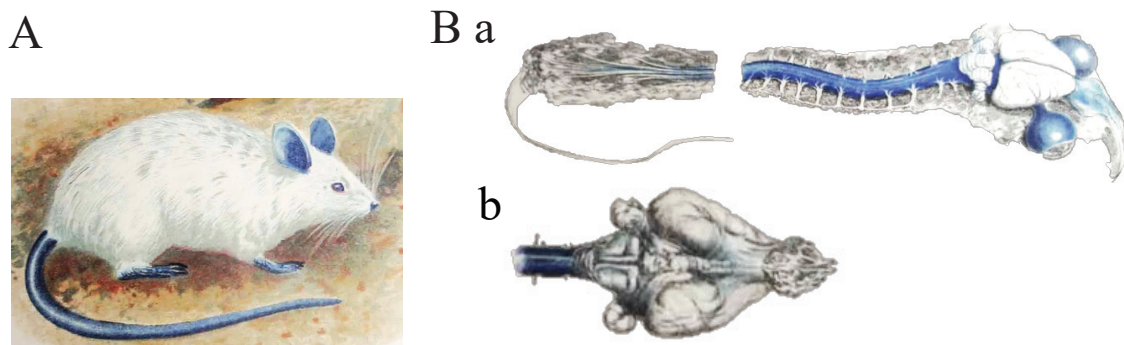
Le LCR a un rôle important dans **la surveillance neuro-immunitaire** (Engelhardt et al., 2017). Le parenchyme cérébral est caractérisé par une très faible capacité à développer des réponses immunitaires innées ou adaptatives en comparaison des tissus périphériques ; on parle de « privilège immunitaire ». Cette spécificité permet de maintenir l'homéostasie cérébrale en évitant les réactions immunitaires excessives. Les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (BHE), la *glia limitans* et les cellules épithéliales choroïdiennes contrôlent l'entrée des cellules du système immunitaire dans le SNC ; il s'agit principalement de cellules effectrices et de lymphocytes T effecteurs à mémoire ou lymphocytes T de la mémoire centrale. En condition physiologique, la dissémination de ces cellules immunes est limitée au LCR emplissant les espaces ventriculaires et sous-arachnoïdiens. Les cellules immunes peuvent interagir avec les macrophages leptomeningés présentateurs d'antigènes. Le LCR contient par ailleurs des antigènes solubles qui sont drainés vers les ganglions cervicaux profonds conjointement aux cellules immunes (lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, monocytes, cellules dendritiques) (Cserr et al., 1992; Engelhardt et al., 2017; J. Goldmann et al., 2006; Kaminski et al., 2012). La réponse immunitaire adaptative est initiée dans ces ganglions.

## 2.2. Interfaces sang-cerveau

### 2.2.1. Découverte

La découverte des interfaces sang-cerveau est généralement attribuée aux Allemands Paul Ehrlich et Edwin Goldmann. La revue réalisée par Norman Saunders souligne que de nombreux autres scientifiques ont joué un rôle clé dans la découverte de ces barrières. (Saunders et al., 2014).

Les premiers indices de l'existence de la BHE ont été apportés en 1885 par le chimiste Paul Ehrlich. Il observa que l'injection intraveineuse d'un colorant azoïque, le bleu trypan, entraînait une coloration rapide de l'ensemble des liquides extracellulaires du corps à l'exception du cerveau et de la moelle épinière (Ehrlich, 1885). Ehrlich interpréta ce phénomène comme un défaut d'affinité du colorant pour le SNC.



**Figure 9 | Expérimentations de Goldmann avec le bleu Trypan.**

**A.** Première expérimentation de Goldmann (1909). Rat adulte après injection systémique de colorant bleu trypan. **B.** Deuxième expérimentation de Goldmann (1913). Cerveau et colonne vertébrale de jeune lapin après injection sous-arachnoïdienne de 0,5 mL de bleu trypan 0,5 % (**a** : vue dorsale, **b** : vue ventrale). La moelle épinière, le tronc cérébral, les nerfs optiques, la sclère et les aires olfactives sont colorés en bleu. Cette expérimentation démontre efficacement que le manque de coloration du système nerveux central observé dans la première expérimentation de Goldmann n'est pas dû à un manque d'affinité du colorant pour le tissu nerveux.

L'existence de propriétés spécifiques aux vaisseaux sanguins cérébraux a été proposée quelques années plus tard par Biedl et Kraus, Roux et Borrel, puis Lewandosky (Biedl & Kraus, 1898; Lewandosky, 1900; Roux & Borrel, 1898). Ces scientifiques étudièrent l'impact de la voie d'administration de diverses molécules sur leur toxicité. Ils observèrent que les acides biliaires, la toxine tétanique, la strychnine, et le sodium ferrocyanide avaient des effets neurotoxiques significativement plus importants après administration intrathécale qu'après administration parentérale. Même si Paul Ehrlich apporta la première preuve de l'existence de la BHE, il réfuta strictement l'hypothèse que les cellules endothéliales cérébrales puissent posséder des propriétés particulières.

L'expérience de Ehrlich fut reprise par Bouffard puis Goldmann qui utilisèrent respectivement le bleu de méthylène et le bleu trypan (Bouffard, 1906; E. Goldmann, 1909). Comme Paul Ehrlich, ils notèrent que les colorants, injectés par voie parentérale, ne coloraient pas le SNC. Goldmann remarqua la forte coloration des plexus choroïdes, et émit l'hypothèse que ces structures étaient à l'origine du défaut de coloration du SNC (E. Goldmann, 1909). En 1913, Goldmann injecta le colorant azoïque par voie

intrathécale et observa une coloration exclusive du SNC (*Figure 9B*) (E. Goldmann, 1913). Ce résultat réfuta l'hypothèse de défaut d'affinité du colorant pour les tissus cérébraux proposé par Ehrlich. Goldmann conclut que des mécanismes protecteurs et régulateurs, siégeant au sein des plexus choroïdes, protégeaient le SNC. Il ne fit cependant pas mention du rôle neuroprotecteur des capillaires cérébraux.

Le terme « barrière » a été utilisé pour la première fois par les Français Lina Stern et Raymond Gautier en 1918 pour décrire l'interface « *qui s'oppose au passage dans le LCR de substances circulant dans le sang* » (Stern & Gautier, 1918b, 1918a). Dix ans plus tard, Stern et Rapoport émirent l'hypothèse de l'existence de deux barrières distinctes protégeant le cerveau : la BHE localisée au niveau des capillaires cérébraux, et la barrière sang-LCR localisée au niveau des plexus choroïdes (Stern & Rapoport, 1928b, 1928a).



**Figure 10 | Expérimentations de Wislocki avec le bleu trypan.**

Section sagittale d'un fœtus de cobaye (36 mm) prélevé 48 h après l'administration de bleu trypan dans la cavité amniotique. Tous les organes sont colorés à l'exception du système nerveux central.

D'après (Wislocki, 1920).

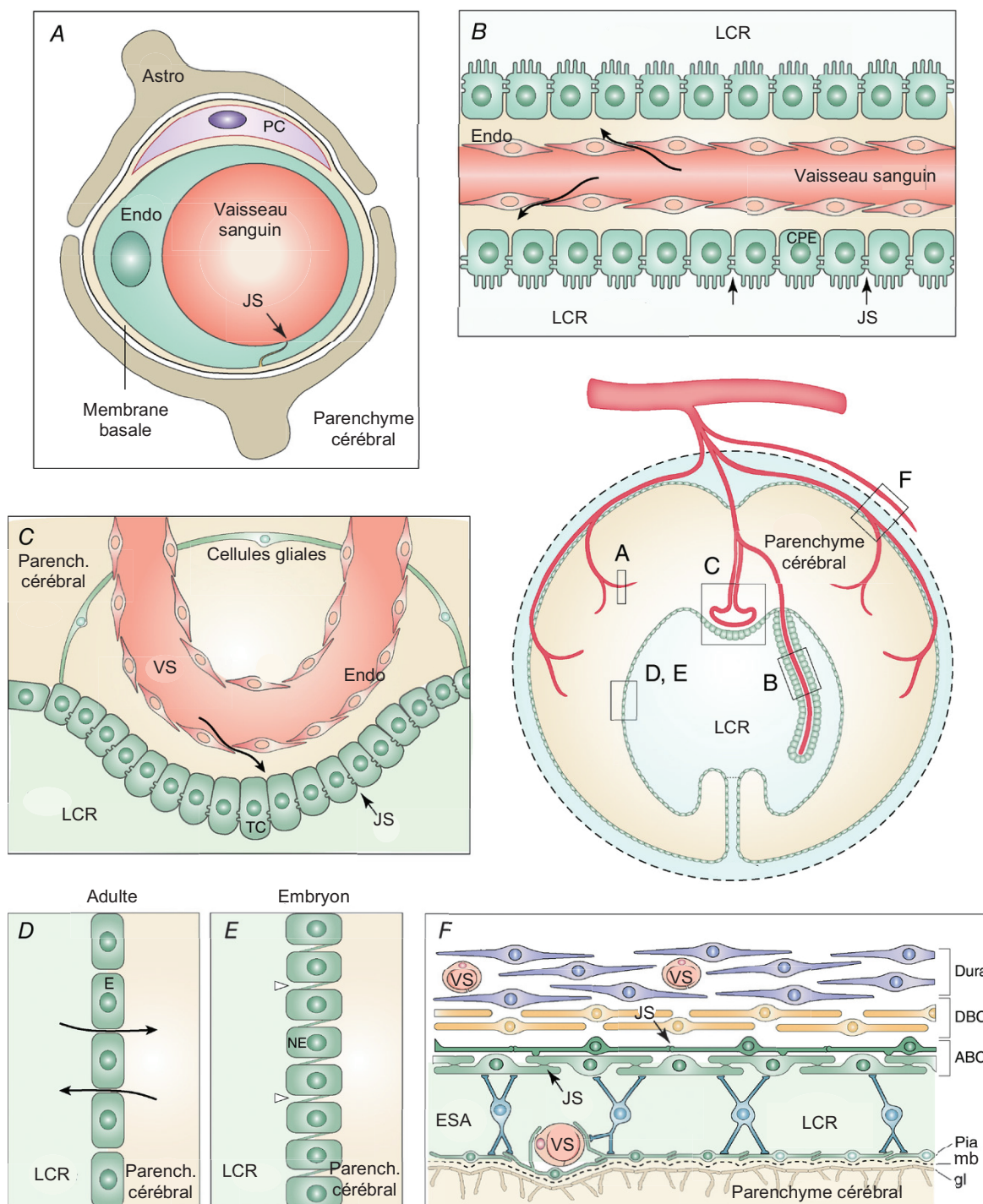
L'existence et la fonctionnalité de ces interfaces sang-cerveau aux stades précoces de développement cérébral ont longtemps été sources de débats. Pourtant, dès 1917, Lewis Weed apporta une preuve de l'existence d'une barrière entre le sang et le LCR chez l'embryon de porc. Weed montra que le potassium ferrocyanide, molécule de petit poids moléculaire, ne diffuse pas hors du SNC lorsqu'il est injecté par voie intrathécale (Weed, 1917a, 1917b). Ces résultats furent confirmés quelques années plus tard par les travaux de George Wislocki. Wislocki, qui étudiait les propriétés de la barrière placentaire, remarqua que l'injection de bleu de trypan dans le liquide amniotique de cobayes gestantes colorait l'ensemble des tissus embryonnaires à l'exception du SNC (*Figure 10*) (Wislocki, 1920). Alors même que des résultats similaires ont permis de mettre en évidence les interfaces sang-cerveau chez l'adulte, les interfaces sang-cerveau de

l'embryon, du fœtus et même du jeune enfant ont longtemps été considérées inexistantes, incomplètes ou inefficaces. Au contraire, les interfaces sang-cerveau de l'enfant présenteraient des caractéristiques spécifiques qui reflèteraient plutôt une spécialisation développementale qu'une immaturité.

## 2.2.2. Présentation générale

### 2.2.2.1. Localisation des différentes interfaces sang-cerveau

Le parenchyme cérébral, le LCR et le sang sont séparés par différentes barrières cellulaires communément appelées interfaces sang-cerveau. Ces interfaces diffèrent par leurs situations anatomiques, leurs structures et leurs propriétés fonctionnelles.



**Figure 11 | Représentation schématique des principales interfaces sang-cerveau chez l'adulte.**

Les cellules qui forment les interfaces sang-cerveau sont colorées en vert.

**A.** La barrière hémato-encéphalique (BHE) est localisée au niveau des microvaisseaux cérébraux. Un ensemble cellulaire, appelé unité neurovasculaire, participe à la formation de cette barrière. Les cellules endothéliales (Endo) des microvaisseaux cérébraux présentent à leur pôle luminal des jonctions serrées (JS, *flèche noire*) formant une barrière physique entre le sang et le parenchyme cérébral. Les cellules endothéliales reposent sur une membrane basale qui englobe des péricytes (PC). L'ensemble de ces cellules est recouvert par les pieds astrocytaires des astrocytes avoisinants (Astro). Le manchon astrocytaire n'apparaît qu'après la naissance.

**B.** La barrière sang-liquide céphalorachidien (LCR) choroïdienne est localisée au niveau des plexus choroïdes flottant dans les ventricules du cerveau. Les cellules épithéliales choroïdiennes (CPE) forment cette barrière sang-LCR : elles ont des jonctions serrées (JS, *flèches noires*) qui empêchent les échanges entre le LCR et le stroma conjonctif choroïdien. Les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins choroïdiens sont fenêtrées et ne sont pas reliées par des jonctions serrées. Elles permettent les échanges paracellulaires entre le sang et le stroma conjonctif choroïdien (*flèches noires*).

**C.** La barrière sang-LCR tanycytaire protège les organes circumventriculaires (éminence médiane, organe vasculaire de la lame terminale, area postrema, organe subfornical) (Langlet et al., 2013). Afin de permettre aux organes circumventriculaires d'assurer leur rôle de senseur et de sécrétion, les vaisseaux sanguins (VS) qui irriguent ces organes sont exclus de la BHE. Afin de protéger le LCR, des cellules épendymaires spécialisées, appelées tanocytes (TC), présentent des jonctions serrées (JS, *flèches noires*) qui empêchent les peptides et autres molécules du sang d'entrer dans le LCR (*tête de flèche*). Les organes circumventriculaires sont par ailleurs riches en astrocytes qui pourraient participer à la formation de la barrière tanycytaire (Langlet et al., 2013).

**D, E.** Au stade embryonnaire, les cellules neuroépendymaires (NE) tapissant les ventricules cérébraux sont connectées entre elles par des « *strap junctions* » (*têtes de flèche*). Ces jonctions forment une barrière entre le LCR et le parenchyme cérébral. Chez l'adulte, les cellules épendymaires (E) dérivant de la neuroépendyme sont dépourvues de « *strap junctions* » et ne forment pas de barrière.

**F.** Les méninges abritent plusieurs interfaces sang-cerveau distinctes. La barrière sang-LCR arachnoïdienne est localisée au niveau des cellules de l'arachnoïde (ABC) bordant la dure-mère (DBC, Dura). Ces cellules arachnoïdiennes sont reliées par des jonctions serrées (JS) et séparent le LCR sous-arachnoïdien du sang circulant dans les vaisseaux durs fenêtrés (VS). La *glia limitans* (gl) est située sous la membrane basale (mb) de la pie-mère (Pia). La *glia limitans* sépare le parenchyme cérébral du LCR sous-arachnoïdien.

D'après (Saunders et al., 2018).



L'interface entre le parenchyme cérébral et le sang, appelée « **barrière hémato-encéphalique** », est localisée au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (*Figure 11A*). Les plexus choroïdes et les organes circumventriculaires<sup>2</sup> sont les seules structures cérébrales exclues de la BHE. Au niveau de ces structures, le SNC est protégé par d'autres interfaces sang-cerveau qui sont décrites ci-après.

L'interface entre le sang et le LCR présente trois composantes. La première composante est la **barrière sang-LCR choroïdienne** (*Figure 11B*), située au niveau des cellules épithéliales des plexus choroïdes. Cette interface sépare les vaisseaux sanguins fenêtrés du stroma conjonctif choroïdien (exclus de la BHE) et le LCR circulant dans les ventricules cérébraux. La deuxième composante est la **barrière sang-LCR tanocytaire** (*Figure 11C*) qui sépare les capillaires fenêtrés irriguant les organes circumventriculaires et le LCR circulant dans les ventricules cérébraux. Cette barrière est localisée au niveau de cellules épendymaires spécialisées, les tanocytes (Kiecker, 2018; Langlet et al., 2013; Madsen & Møllgård, 1979). Les astrocytes, particulièrement présents au sein des organes circumventriculaires, pourraient participer à l'établissement de la barrière tanocytaire (Langlet et al., 2013). Les organes circumventriculaires sont exclus de la BHE afin d'assurer leurs fonctions de sécrétion (neurohypophyse, éminence médiane de l'hypothalamus, éminence médiane, glande pinéale) ou de détection (area postrema, organe subfornical et organe vasculaire de la lame terminale). Cette particularité permet par exemple à l'area postrema de déclencher le réflexe émétique lorsque certains toxiques sont détectés dans le sang. Les organes circumventriculaires étant de taille modeste, ils ne constituent pas une importante voie d'entrée dans le SNC pour les toxiques ou les médicaments. Enfin, la dernière composante est la **barrière sang-LCR arachnoïdienne** (*Figure 11F*), située au niveau des cellules arachnoïdiennes bordant la dure-mère. Elle forme une barrière physique entre le LCR contenu dans l'espace sous-arachnoïdien (crâne et moelle épinière) et le sang circulant dans les capillaires fenêtrés de la dure-mère. Dans le contexte plus particulier de la neuroprotection, la barrière sang-LCR arachnoïdienne semble jouer un rôle mineur. Le passage des xénobiotiques sanguins potentiellement

---

<sup>2</sup> Organes circumventriculaires : Structures neuroépithéliales spécialisées localisées autour du 3<sup>ème</sup> et du 4<sup>ème</sup> ventricule du cerveau qui régulent les échanges de molécules (e.g. hormones) entre le sang et le parenchyme cérébral (Kiecker, 2018).

neurotoxiques à travers cette interface est en effet peu probable : le flux net liquidien est dirigé du LCR vers le sang veineux.

L'interface entre le LCR et le parenchyme cérébral a également deux composantes. Tout d'abord, l'**épendyme** (*Figure 11D et E*) forme la paroi des ventricules cérébraux et sépare le LCR ventriculaire du parenchyme cérébral. Au stade embryonnaire, les cellules neuroépendymaires sont organisées en épithélium pseudostratifié et reliées par des « *strap junctions* » qui limitent efficacement le passage paracellulaire de protéines et de molécules de petits poids moléculaires (Katarzyna Magdalena Dziegielewska et al., 1979; Fossan et al., 1985; Møllgård et al., 1987; Møllgård & Saunders, 1986; Whish et al., 2015). La barrière sang-LCR neuroépendymaire n'existe véritablement qu'au stade embryonnaire (*Figure 11E*). En effet, dès la naissance, cet épithélium pseudostratifié est progressivement remplacé par une monocouche de cellules épendymaires cuboïdes reliées par des jonctions plus permissives (gap junctions, jonctions de type *zonula adherens*) (*Figure 11D*) (Møllgård et al., 1987). La seconde interface LCR-parenchyme cérébral est localisée au niveau des cellules astrocytaires de la **glia limitans** qui juxtent la pie-mère (*Figure 11F*). La pie-mère est une méninge perméable, c'est donc la *glia limitans* qui sépare le LCR circulant dans les espaces sous-arachnoïdiens du parenchyme cérébral sous-jacent. La *glia limitans* est formée par un enchevêtrement important de prolongements astrocytaires visible chez l'homme dès la 6<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire (Choi, 1988). La *glia limitans* protège le SNC des toxiques et déchets métaboliques présents dans le LCR sous-arachnoïdien. Le passage de cette barrière est cependant intéressant pour les médicaments à visée cérébrale administrés par voie intrathécale.

Du fait de leurs localisations et de leurs tailles, la BHE et la barrière sang-LCR choroïdienne sont les deux interfaces les plus impliquées dans la protection cérébrale envers les composés sanguins potentiellement neurotoxiques. Les caractéristiques précises de ces interfaces sont respectivement détaillées dans les paragraphes 2.2.3 et 2.2.4.



#### 2.2.2.2. Caractéristiques principales

La capacité des interfaces sang-cerveau à réguler les échanges entre le sang et le SNC est attribuée à deux composantes principales : une composante **physique** et une composante **métabolique**.

##### *Barrière physique*

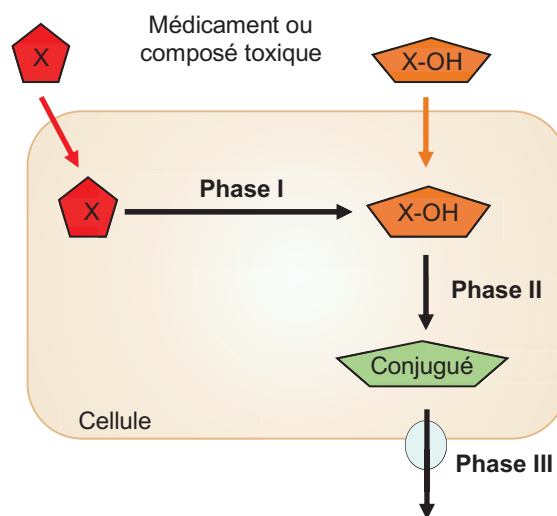
La barrière physique des interfaces sang-cerveau est principalement due aux **jonctions serrées** qui lient les cellules de barrières entre elles et limitent ainsi le passage paracellulaire passif de composés entre le sang et le compartiment cérébral. Ce mécanisme de protection est efficace envers les molécules hydrophiles qui ne sont pas capables de traverser la double couche lipidique des membranes cytoplasmiques. Les jonctions serrées sont composées de protéines membranaires intégrales (*e.g.* claudines, occludines) et de protéines cytoplasmiques accessoires (*scaffolding proteins* ; *e.g.* zonula occludens, cinguline) (W. Y. Liu et al., 2012). Les protéines membranaires intégrales présentent des domaines extracellulaires qui, par associations homotypiques, permettent la jonction de deux cellules adjacentes. Les protéines cytoplasmiques accessoires relient le domaine intracytoplasmique des protéines membranaires intégrales au cytosquelette d'actine.

Les cellules de barrière présentent également un **faible niveau de transport transcellulaire aspécifique** : les cellules ne sont pas ou peu fenêtrées et présentent peu de vésicules de pinocytose.

##### *Barrière métabolique*

Les **transporteurs d'efflux** de solutés régulent le passage transcellulaire de composés entre le sang et le compartiment cérébral. Les molécules lipophiles circulant dans le sang peuvent en effet diffuser à travers la bicouche lipidique des membranes cellulaires, et atteindre le SNC en traversant les cellules de barrière. Les transporteurs d'efflux permettent d'excréter ces composés dans le sang et de limiter leur passage cérébral. Les transporteurs d'efflux participent également à l'élimination par voie sanguine de composés toxiques et déchets métaboliques présents dans le compartiment cérébral. On

distingue les protéines de transport de type *ATP-binding cassette* (ABC), responsables d'un transport actif primaire, des *solute carrier transporters* (SLC) permettant une diffusion facilitée ou un transport actif secondaire. Les transporteurs d'efflux des interfaces sang-cerveau appartiennent essentiellement aux familles ABCB, ABCC et ABCG, et aux familles SLC15, SLC21/SLCO et SLC22 (Strazielle & Ghersi-Egea, 2015). Ces transporteurs ont des spécificités de substrats larges, parfois chevauchantes. La distribution de ces protéines de transport varie entre les différentes interfaces sang-cerveau, ce qui suggère l'existence de propriétés de barrière spécifiques.



**Figure 12 | Principe général du métabolisme des xénobiotiques.**

Lorsqu'un composé toxique ou un médicament (X ou X-OH) pénètre dans une cellule, il peut être pris en charge par les enzymes du métabolisme des xénobiotiques. Ces enzymes vont modifier ce composé pour le rendre moins actif et faciliter son élimination. La phase I, ou phase de fonctionnalisation, permet de rendre plus hydrophile le composé toxique (ou le médicament) par l'ajout d'un groupement -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, ou -SH. Les enzymes de phase I, réalisant cette première étape, sont des mono-oxygénases (e.g. flavine mono-oxygénases, cytochromes P450), des estérases, des amidases ou des oxydoréductases (e.g. monoamines oxydases). La phase II, ou phase de conjugaison, permet de rendre le métabolite (X-OH) moins réactif et plus hydrosoluble. Cette étape est assurée par des enzymes de phase II qui sont des transférases (e.g. glutathion transférase, UDP-glucuronyltransférase, sulfotransférase). Enfin, la phase III permet d'excréter le conjugué formé à l'extérieur de la cellule. Cette étape est assurée par des transporteurs d'efflux.

Les **enzymes antioxydantes et de détoxification** travaillent en association avec les transporteurs d'efflux et participent à la formation de barrières métaboliques au niveau des interfaces sang-cerveau. Parmi les enzymes de détoxification, on distingue les **enzymes de phase I** qui augmentent la polarité des xénobiotiques par une étape de fonctionnalisation avec un groupement hydrophile, et les **enzymes de phase II** qui, en conjuguant les xénobiotiques avec des co-substrats polaires (e.g. glutathion réduit), favorisent leur élimination (*Figure 12*). L'élimination des métabolites, qui correspond à la phase III, se fait par des transporteurs d'efflux.

L'activité enzymatique dans le compartiment cérébral a longtemps été jugée insignifiante comparée à l'activité mesurée dans le foie qui est l'organe de détoxification majeur. Des études plus approfondies sur les différentes structures composant l'encéphale ont cependant démontré un enrichissement important de certaines enzymes du métabolisme des xénobiotiques dans les interfaces sang-cerveau chez le rongeur et chez l'homme (Declèves et al., 2013).

### 2.2.3. Barrière hémato-encéphalique

La BHE est une interface dynamique, essentielle au contrôle du microenvironnement du SNC. Cette interface sang-cerveau est de loin la mieux caractérisée ; elle a été l'objet de nombreuses études dans le but de comprendre les mécanismes régulant la biodisponibilité cérébrale des médicaments.

#### 2.2.3.1. Localisation et surface d'échange

La BHE est localisée au niveau de l'ensemble des **microvaisseaux cérébraux**, à l'exception des capillaires irriguant les organes circumventriculaires et les plexus choroïdes. Cette barrière est une importante interface d'échange entre le sang et le parenchyme cérébral : chez l'homme adulte, la surface luminale des capillaires cérébraux est estimée entre 100 et 200 cm<sup>2</sup>·g<sup>-1</sup> de tissu cérébral en fonction de la région étudiée, soit près de 21 m<sup>2</sup> pour un cerveau de 1400 g (Reichel, 2015). La densité du réseau capillaire dépend de la région cérébrale étudiée mais aussi de l'âge (Miyawaki et al., 1998).

Chez le rat adulte, la surface de la BHE et la distance inter-microvaisseaux sont respectivement estimées à  $179 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  de tissu et  $19,5 \pm 4,0 \text{ }\mu\text{m}$  dans la substance grise, et à  $107 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  de tissu et  $29,8 \pm 13,0 \text{ }\mu\text{m}$  dans la substance blanche (Schlageter et al., 1999). La densité capillaire cérébrale évolue au cours du développement : elle est multipliée par quatre entre la naissance et la 3<sup>ème</sup> semaine postnatale (Caley & Maxwell, 1970). Le flux sanguin dans le cortex cérébral augmente également de façon importante au cours du développement : il est estimé à  $0,32 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tissu cérébral chez le rat de deux semaines, et  $0,6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$  de tissu cérébral chez le rat adulte (Szmydynger-Chodobska et al., 1994).

#### 2.2.3.2. Unité neurovasculaire

La BHE est formée par un réseau cellulaire et moléculaire complexe, appelé unité neurovasculaire, s'articulant autour des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Ces cellules reposent sur une fine membrane basale dans laquelle sont enchâssés des péricytes. Chez l'adulte, la membrane basale est recouverte d'un manchon de pieds astrocytaires. Les cellules de la microglie et les interneurons communiquent directement avec les péricytes et les astrocytes de la BHE et participent à l'unité neurovasculaire. Les principales caractéristiques des cellules composant l'unité neurovasculaire sont détaillées ci-après.

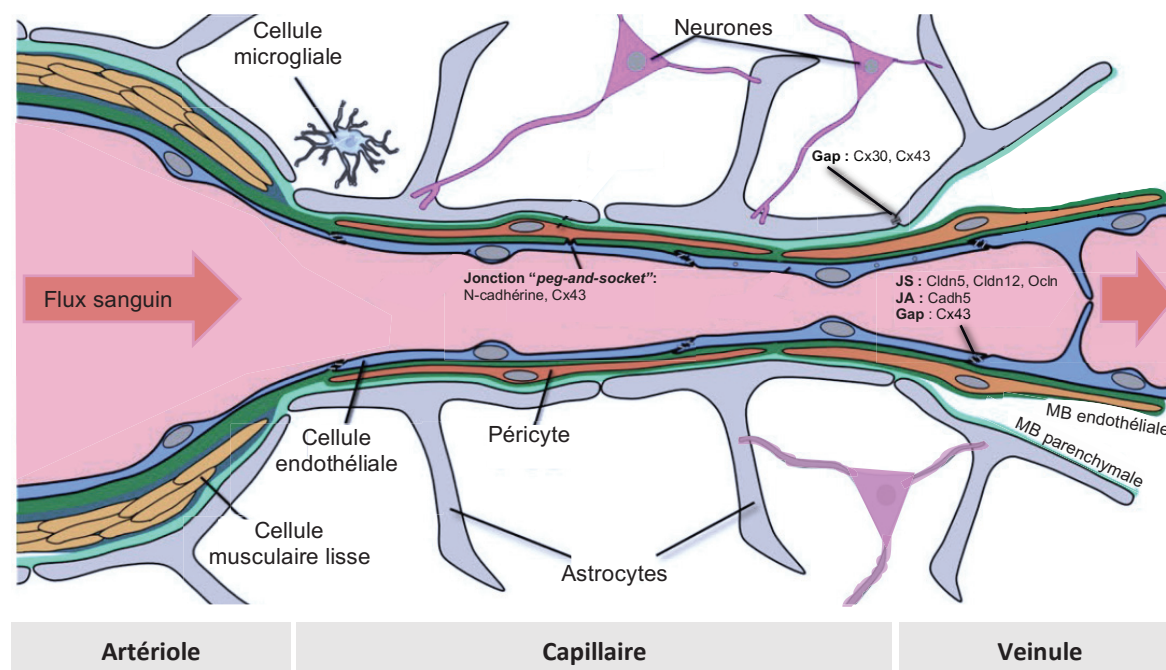
#### *Cellules endothéliales*

Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux diffèrent de celles des microvaisseaux périphériques mais aussi de celles des autres tronçons vasculaires cérébraux (Wilhelm et al., 2016). Une étude transcriptomique, réalisée par *single cell-RNAseq*, a récemment mis en évidence une « zonation cellulaire »<sup>3</sup> endothéliale graduelle le long de l'axe artério-veineux cérébral de la souris adulte (*Figure 15*) (Vanlandewijck et al., 2018). Par ailleurs, cette étude a mis en évidence trois nouvelles sous-populations de cellules endothéliales. Ces cellules endothéliales particulières, qui se distinguent par une capacité de synthèse protéique particulièrement élevée, seraient probablement

---

<sup>3</sup> Zonation cellulaire : changements phénotypiques cellulaires le long d'un axe anatomique ou au sein d'une structure.

réparties au sein de l'ensemble de l'arbre artério-veineux cérébral (y compris au niveau des capillaires sanguins) (Vanlandewijck et al., 2018).



**Figure 13 | Schéma d'une portion de vaisseau sanguin cérébral, de l'artériole à la veinule afférente.**

Ce schéma représente les principaux composants cellulaires des vaisseaux sanguins cérébraux et les interactions moléculaires qui les unissent. L'unité neurovasculaire est localisée au niveau des capillaires de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les cellules endothéliales de l'unité neurovasculaire (*bleues*) sont reliées entre elles par des jonctions serrées et des jonctions adhérentes. Les cellules endothéliales sont entourées par des péricytes (*orange*) qui sont enchassés dans la membrane basale endothéliale (*verte*). Les péricytes communiquent avec les cellules endothéliales par des jonctions « *peg-and-socket* » qui permettent le transport de nutriments et de molécules de signalisation. Un manchon astrocytaire entoure les capillaires de la BHE. Les astrocytes (*gris*) qui le composent sont liés par des jonctions communicantes (*gap junction*). Les neurones (*roses*) et les cellules microgliales (*bleu clair*) participent aussi à l'unité neurovasculaire.

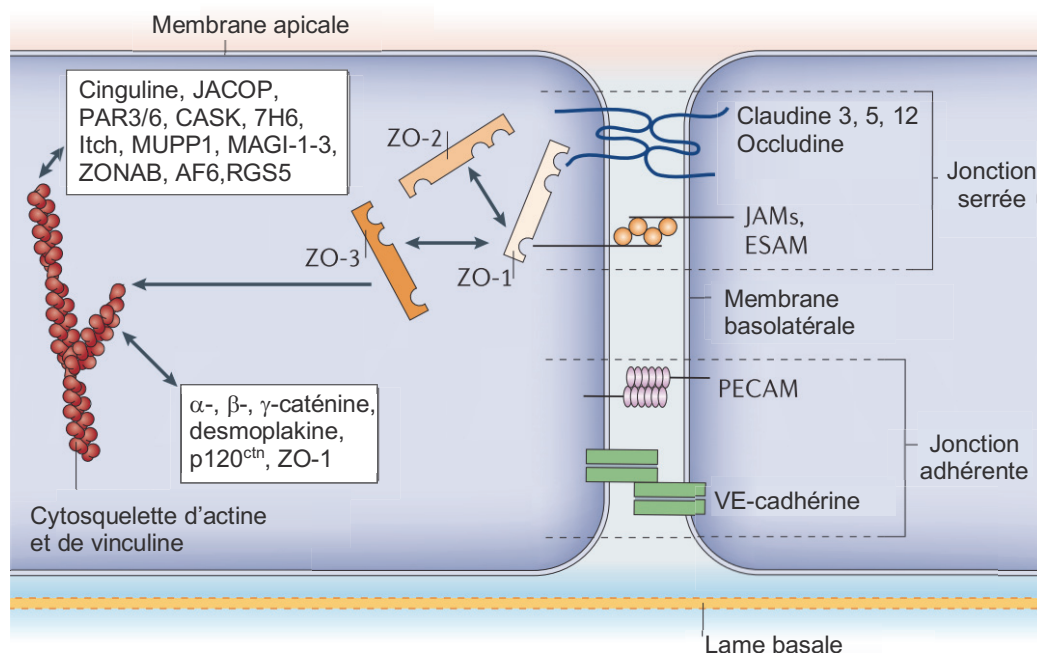
Abréviations : Cldn : claudine, Cx : connexine, Gap : jonction communicantes (*gap junctions*), JA : jonction adhérente, JS : jonction serrée, MB : membrane basale, Ocldn : occludine.

Modifié d'après (Liebner et al., 2018).

Les cellules endothéliales de la BHE sont organisées en une monocouche continue de cellules polarisées connectées étroitement entre elles par des jonctions serrées (*cf* 2.2.3.3) et des jonctions adhérentes (cadhérine 5) (*Figure 14*). La présence de jonctions communicantes (*gap junction*) est également décrite, mais leurs fonctions restent à établir (De Bock et al., 2014). Les cellules endothéliales de la BHE sont exemptes de fenestrations et ont un faible niveau de pinocytose (De Bock et al., 2016; Smith & Gumbleton, 2006). L'endocytose par récepteur, plus spécifique, permet aux molécules nécessaires au bon fonctionnement cérébral (e.g. insuline,  $\text{Fe}^{3+}$  lié à la transferrine, lipoprotéines de faible densité) de traverser ces cellules (De Bock et al., 2016).

Les cellules endothéliales ont également une densité mitochondriale élevée, bien supérieure à celle des cellules endothéliales périphériques, qui suggère une forte activité métabolique (Oldendorf et al., 1977). Cette importante capacité métabolique est associée à l'expression élevée de diverses enzymes, récepteurs et transporteurs participant au phénotype de barrière (Declèves et al., 2013).

La surface luminale des cellules endothéliales est recouverte de glycocalyx sur une épaisseur de  $\sim 0,46 \mu\text{m}$  (L. Gao & Lipowsky, 2010). Le glycocalyx est un revêtement dense, riche en glycosaminoglycanes chargés négativement, qui est synthétisé par les cellules endothéliales. Il permet par exemple la fixation de facteurs de croissance (e.g. *vascular endothelial growth factor*, *fibroblast growth factor*) et d'enzymes (e.g. lipoprotéine lipase). Le glycocalyx participe au phénotype de barrière. La charge négative du glycocalyx réduit considérablement le passage des molécules anioniques, quelles que soient leurs tailles (Vink & Duling, 2000). Une étude *in vivo* du passage cérébral de composés fluorescents réalisée chez la souris par imagerie bi-phonique a montré que le glycocalyx réduit également le passage des composés hydrophiles de haut poids moléculaires (Kutuzov et al., 2018). La perméabilité du glycocalyx à une molécule donnée serait donc dépendante de sa charge, de son coefficient de partage entre le plasma et le glycocalyx, et de sa taille (Kutuzov et al., 2018; Vink & Duling, 2000).



**Figure 14 | Schéma simplifié de la composition moléculaire des jonctions liant les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique.**

Les claudines et les occludines, protéines à 4 domaines transmembranaires et 2 boucles extracellulaires, sont les composants membranaires les plus importants des jonctions serrées de la barrière hémato-encéphalique. Les protéines *junctional adhesion molecules* (JAM) et la protéine *endothelial adhesion molecule* (ESAM) sont des membres de la superfamille des immunoglobulines. Le cytoplasme contient de nombreuses protéines adaptatrices de premier ordre qui se lient aux protéines membranaires, notamment les *zonula occludens* 1, 2 et 3 (ZO-1 à 3) et la  $Ca^{2+}$ -*dependent serine protein kinase* (CASK). Parmi les molécules adaptatrices du second ordre, la cinguline est particulièrement importante et la *junction-associated coiled-coil protein* (JACOP) peut également être présente. Les protéines de signalisation et de régulation incluent la *multi-PDZ-protein 1* (MUPP1), les *partitioning defective proteins 3 and 6* (PAR3/6), les *membrane-associated guanylate kinases* avec orientation inversée des domaines d'interaction protéine-protéine (MAGI-1 à 3), la *ZO-1-associated nucleic acid-binding protein* (ZONAB), l'afadine (AF6) et le *regulator of G-protein signalling 5* (RGS5). Toutes ces protéines (adaptatrices, régulatrices ou de signalisation) contrôlent l'interaction des composants membranaires avec le cytosquelette d'actine et de vinculine. Dans les cellules épithéliales, les jonctions serrées et adhérentes sont strictement séparées les unes des autres, mais dans les cellules endothéliales, ces jonctions sont entremêlées. La molécule la plus importante des jonctions adhérentes endothéliales est la *vascular endothelial cadherin* (VE-cadhérine). En outre, la *platelet-endothelial cell adhesion molecule* (PECAM) intervient dans l'adhésion homophile. Les molécules de liaison principales entre les jonctions adhérentes et le cytosquelette sont les caténines, la desmoplakine et la caténine p120 (p120<sup>ctn</sup>).

D'après (Abbott et al., 2006).



## ***Péricytes***

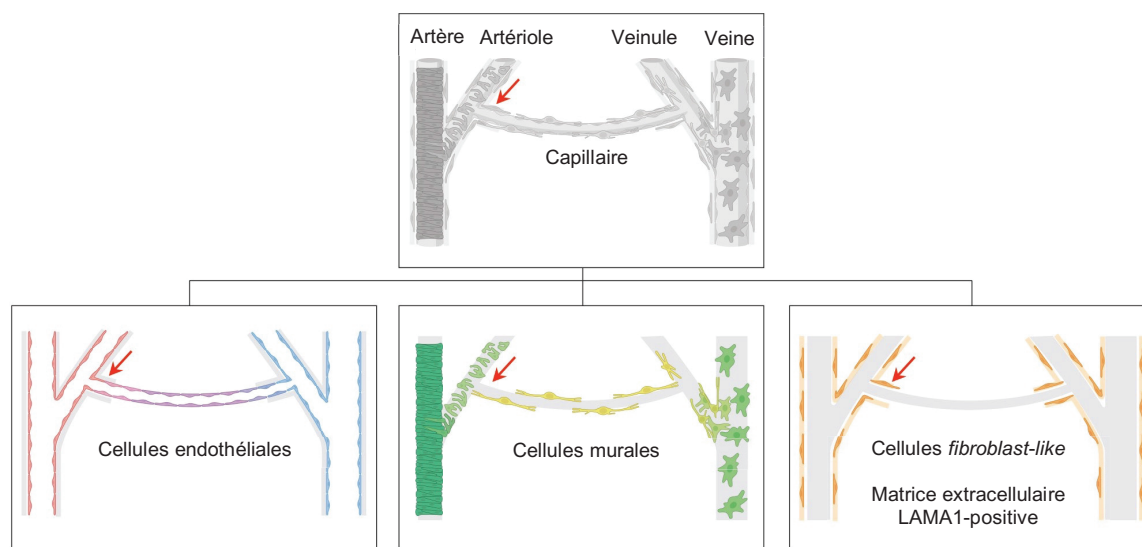
Les péricytes sont des cellules murales localisés autour des capillaires, des veinules post-capillaires et des artérioles terminales. L'étude transcriptomique de *single cell-RNAseq* réalisée par Vanlandewijck et collaborateurs décrit les péricytes du SNC comme un groupe cellulaire homogène (*Figure 15*) (Vanlandewijck et al., 2018). Cette étude a également permis de mettre en évidence chez la souris un profil transcriptomique spécifique aux péricytes, qui étaient jusque-là difficilement différenciés des cellules musculaires lisses vasculaires avec lesquelles ils partagent la même origine embryonnaire (Korn et al., 2002; Vanlandewijck et al., 2018). Ces résultats, en contradiction avec la diversité des phénotypes péricytaires décrits par ailleurs, sont à considérer avec précaution : ils pourraient être biaisés par le choix du marqueur cellulaire utilisé pour isoler les cellules murales (*Pdgfra*-H2BGFP) (J. Cheng et al., 2018).

Chez le rat, les péricytes recouvrent environ 40 % de la surface abluminale des microvaisseaux cérébraux (Mathiisen et al., 2010). Les péricytes sont presque entièrement enveloppés dans la lame basale de la membrane basale qu'ils partagent avec les cellules endothéliales. Au niveau de certaines zones très focalisées, les péricytes forment des jonctions de type « *peg-and-socket* » avec les cellules endothéliales (N-cadhérine, connexine 43) : des protrusions cytoplasmiques péricytaires (*pegs*) s'insèrent dans des invaginations endothéliales (*socket*) ce qui permet le passage de nutriments et de molécules de signalisation (Liebner et al., 2018). Les péricytes forment également des jonctions adhérentes (*adhesion plaques*) et des jonction communicantes (*gap-junction like*) avec les cellules endothéliales et les astrocytes avoisinants (Armulik et al., 2011; Tanigami et al., 2012).

Les péricytes ont un rôle clé dans l'angiogenèse. En 2010, les travaux d'Annika Armulik et de Richard Daneman ont montré *in vivo* que les souris péricytes-déficientes développent un réseau de capillaires cérébraux moins dense, avec des vaisseaux de diamètres plus importants (Armulik et al., 2010; Daneman et al., 2010). Les péricytes permettent également d'induire et de maintenir les propriétés de barrière des microvaisseaux cérébraux en contrôlant l'expression et/ou la distribution cellulaire de certaines protéines endothéliales (*e.g.* ANG1, ANG2, MFSD2A, CD71) et astrocytaires



(e.g. AQP4) (Armulik et al., 2010; J. Cheng et al., 2018; M. Zhang et al., 2013). Par exemple, les péricytes limitent la transcytose endothéliale en induisant l'expression endothéliale de *Mfsd2a* chez la souris (Ben-Zvi et al., 2014). Enfin, les péricytes régulent l'entrée des cellules immunes dans le SNC, probablement via la régulation de récepteurs endothéliaux (Daneman et al., 2010).



**Figure 15 | Illustration schématique de la zonation cellulaire au sein de l'arbre artériovoineux cérébral.**

L'étude transcriptomique (*single cell-RNAseq*) des cellules endothéliales des artères, capillaires et veines cérébrales (*rouges, violette et bleues* respectivement) suggère que ces cellules présentent des changements phénotypiques graduels le long de l'arbre artériovoineux. Les cellules murales des vaisseaux cérébraux sont les péricytes et les cellules musculaires lisses. L'étude transcriptomique de ces populations cellulaires a mis en évidence deux continums cellulaires distincts : le premier concerne les péricytes (*jaunes*) situés autour des capillaires sanguins et les cellules musculaires lisses des veines (*vert clair et vert foncé*), le second concerne les cellules musculaires lisses des artères et artérioles (*vert clair et vert foncé*). La transition entre les cellules murales des artérioles (cellules musculaires lisses) et des capillaires (péricytes) est nette (*flèche rouge*). Les cellules *fibroblast-like* sont en étroite association avec les artères, artérioles, veinules et veines de l'arbre artériovoineux cérébral. La distribution de ces cellules coïncide avec celle de la protéine de matrice extracellulaire LAMA1 (*laminin subunit  $\alpha 1$* , marqueur de la membrane basale endothéliale). Les cellules *fibroblast-like* sont localisées entre les cellules endothéliales et les pieds astrocytaires.

D'après (Vanlandewijck et al., 2018).

### ***Membrane basale***

La membrane basale est une matrice extracellulaire formée par l'union de deux feuillets : une lame basale d'origine « épithéliale », et une lame réticulaire d'origine « conjonctive ». La lame basale est sécrétée par les cellules endothéliales et les péricytes (qui sont enchâssés dans cette lame basale), et la lame réticulaire est synthétisée par les cellules astrocytaires.

La membrane basale est indispensable à la formation de la BHE : elle permet l'ancrage de l'endothélium aux péricytes et astrocytes sous-jacents. Elle est en effet constituée d'un réseau de protéines (laminine, fibronectine, collagène de type IV, protéoglycanes) pouvant être reconnues par les récepteurs transmembranaires (e.g. dystroglycanes, récepteurs d'adhésion de la famille des intégrines) des cellules adjacentes (Baeten & Akassoglou, 2011).

La membrane basale participe aussi au maintien de l'intégrité et des propriétés de barrière de la BHE (Thomsen et al., 2017). Par exemple, une étude réalisée *in vitro* et *in vivo* chez la souris a montré que l'inhibition fonctionnelle de l'intégrine  $\beta 1$ , qui permet l'interaction des cellules endothéliales avec la membrane basale, diminue l'expression endothéliale de la claudine 5 (Cldn5) et augmente la perméabilité de la BHE (Osada et al., 2011).

### ***Astrocytes***

Les astrocytes font partie des cellules gliales. Ces cellules présentent des caractéristiques variées en fonction de leurs localisations tissulaires et des interactions qu'elles établissent avec les autres cellules neurales environnantes. Les astrocytes de l'unité neurovasculaire présentent de nombreux prolongements cytoplasmiques, appelés **pieds astrocytaires**, qui entourent la membrane basale des microvaisseaux cérébraux. Ces pieds astrocytaires sont enrichis en canaux AQP4 et en canaux potassiques KIR4.1 (Abbott et al., 2006). Les astrocytes périvasculaires présentent aussi une expression élevée de connexine 43 et 30 qui leur permettent d'établir des jonctions communicantes (*gap junctions*) (De Bock et al., 2014).

Les données concernant le taux de recouvrement du manchon astrocytaire et la taille des éventuels interstices entre deux pieds astrocytaires font actuellement débat. Caley et Maxell, Mathiisen, et Daneman ont étudié par microscopie électronique la structure de l'unité neurovasculaire sur des coupes de cerveau de rat et de souris fixées par un mélange d'aldéhydes. Ces auteurs décrivent un recouvrement presque complet du manchon astrocytaire, avec des chevauchements cellulaires (Caley & Maxwell, 1970; Daneman et al., 2010; Mathiisen et al., 2010). Les rares discontinuités du manchon astrocytaires semblent remplies de prolongements microgliaux et pourraient donc permettre de connecter la membrane basale aux cellules microgliales (Mathiisen et al., 2010). Une étude plus récente, réalisée par Korogod, suggère un recouvrement astrocytaire plus restreint (~ 60 %), permettant plus d'échanges entre la membrane basale et les cellules neurales proches de l'unité neurovasculaire (Korogod et al., 2015). Cette étude de microscopie électronique, réalisée chez la souris, utilise la cryofixation qui induirait moins de gonflement astrocytaire et respecterait mieux la structure de l'unité neurovasculaire. On peut globalement retenir que le manchon astrocytaire permet les interactions entre les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux et les cellules de la microglie avoisinantes.

Les cellules astrocytaires ne sont pas impliquées dans la formation de la BHE au stade embryonnaire : des études de microscopie électronique, réalisées chez le rat et la souris, ont montré que les astrocytes se développent majoritairement au stade postnatal alors que les jonctions serrées sont fonctionnelles bien avant la naissance (*cf* 2.2.3.3) (Caley & Maxwell, 1970; Daneman et al., 2010). Les astrocytes sont en revanche importants dans le maintien du phénotype de barrière des cellules endothéliales de la BHE : ils améliorent la qualité des jonctions serrées, régulent l'expression et la polarisation de certains transporteurs (ABCB1 (P-glycoprotéine), GLUT1) et peuvent induire des systèmes enzymatiques (Abbott et al., 2006; Liebner et al., 2018; C.-Y. Liu et al., 2018). Les cellules endothéliales et les astrocytes semblent fonctionner de façon synergique : la coculture de ces cellules permet d'augmenter le potentiel antioxydant (e.g. catalase, glutathion peroxydases) de chacun des deux types cellulaires (Schroeter et al., 1999).

Le réseau astrocytaire participe également activement au contrôle de l'homéostasie cérébrale : il est capable de réguler le pH, la concentration des ions et le volume d'eau du SNC (C.-Y. Liu et al., 2018). Par exemple, les astrocytes éliminent les ions  $K^+$  produits par l'activité neuronale : les astrocytes situés à proximité des neurones peuvent capter les ions  $K^+$ , ces ions vont ensuite parcourir le réseau astrocytaire *via* les jonctions communicantes (*gap junctions*, connexine 43) jusqu'aux astrocytes périvasculaires où ils seront libérés par les canaux KIR4.1 à proximité du flux sanguin (Nagelhus & Ottersen, 2013; Nicchia et al., 2005).

### ***Autres cellules de l'unité neurovasculaire***

Les **cellules microgliales**, dérivées des cellules neuroépithéliales, sont des cellules immunitaires résidentes du cerveau. Ces cellules, abondantes au sein du SNC, ont un faible taux de renouvellement. Au cours du développement cérébral, la microglie serait importante dans la mise en place de la BHE : elle secrète des signaux pouvant réguler l'angiogenèse (e.g. protéines de la famille WNT) et l'astrogliogenèse (e.g. jagged 1 et Delt 1 (ligands de Notch1), IL-6, LIF, MCP-1, BMP2, FGF2) (Liebner et al., 2008; Trembley & Sierra, 2015). Le rôle des cellules microgliales dans le maintien de la BHE n'est pas connu. Ces cellules immunitaires, situées à proximité directe du flux sanguin, seraient par ailleurs la première ligne de défense du SNC (Thurgur & Pinteaux, 2018).

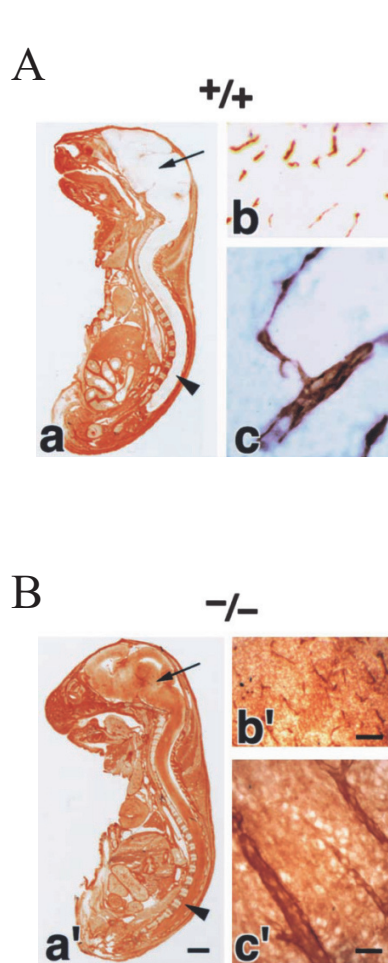
Les **neurones** participent aussi à la vascularisation du cerveau et à la formation de la BHE : ils sécrètent les facteurs WNT7A et WNT7B. Une fois la BHE établie, les neurones traitent et transmettent les informations entre les différentes composantes cellulaires de l'unité neurovasculaire (signaux chimiques et électriques) (Thurgur & Pinteaux, 2018).

#### 2.2.3.3. Principaux mécanismes de barrière

### ***Jonctions serrées***

Les jonctions serrées se mettent en place très tôt au cours du développement embryonnaire, probablement au moment même de la différenciation des cellules endothéliales de la BHE. Chez l'homme, les jonctions serrées de la BHE ont été observées dès la 7<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire (Møllgård & Saunders, 1986). Chez

le rongeur, ces jonctions apparaissent et sont fonctionnelles entre le 11<sup>ème</sup> et le 13<sup>ème</sup> jour embryonnaire, ce qui coïncide avec la disparition des fenestrations des cellules endothéliales (Møllgård & Saunders, 1986; Wolburg & Lippoldt, 2002). La présence des jonctions adhérentes semble être un prérequis à la formation des jonctions serrées. Une étude réalisée *in vitro* sur des cellules rénales canines (*Madin-Darby canine kidney*) a par exemple montré que les nectines (protéines de jonction adhérente) sont impliquées dans le recrutement des protéines de jonctions serrées *junctional adhesion molecule* (JAM) (Fukuhara et al., 2002). Les jonctions serrées procurent à la BHE une importante résistance transépithéliale ; elle est estimée à 1900  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  chez la grenouille (vaisseaux sanguins de la pie-mère) et 3000  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  chez le rat (microvaisseaux de la surface du cerveau) (Bradbury, 1993; De Bock et al., 2016).



**Figure 16 | Dysfonction de la barrière hémato-encéphalique chez les embryons de souris claudine 5 (Cldn5) déficientes.**

Des embryons ressuscités de souris Cldn5<sup>+/+</sup> (A) et Cldn5<sup>-/-</sup> (B) de 18,5 j ont été perfusés par voie intracardiaque avec une amine biotinyllée (~ 443 Da). Après 5 min, les embryons entiers ou les cerveaux ont été fixés au formaldéhyde puis congelés. Des sections congelées ont été incubées avec de la streptavidine conjuguée à une peroxydase de raifort (HRP). La peroxydase oxyde la biotine, ce qui forme un précipité marron et permet de localiser l'agent biotinyllé.

A. L'amine biotinyllée est complètement exclue du cerveau (*flèche*) et de la moelle épinière (*tête de flèche*) des souris Cldn5<sup>+/+</sup> (a). L'amine ne diffuse pas dans le parenchyme cérébral et reste confinée aux capillaires sanguins (b, c).

B. Au contraire, l'amine biotinyllée pénètre le cerveau (*flèche*) et la moelle épinière (*tête de flèche*) des souris Cldn5<sup>-/-</sup>. L'agent biotinyllé infiltre abondamment le parenchyme cérébral (b', c').

Barre d'échelle : a et a' : 2 mm, b et b' : 40  $\mu\text{m}$ , c et c' : 10  $\mu\text{m}$ .

D'après (Nitta et al., 2003).

Chez l'homme, les jonctions serrées liant les cellules endothéliales de la BHE sont caractérisées par une forte expression de **CLDN5**, associée à une expression plus modérée de **CLDN3** et **CLDN12** (Haseloff et al., 2015; Virgintino et al., 2004). L'expression de la CLDN1 (claudine de scellement) chez l'homme fait actuellement débat : certains anticorps anti-CLDN1 ont montré une réactivité croisée avec la CLDN3 (Haseloff et al., 2015; Wolburg et al., 2003). La CLDN5 est une claudine de scellement qui participe à la mise en place de la BHE et au contrôle de la perméabilité sang-cerveau. Les souris *Cldn5*-déficientes présentent en effet une perméabilité sang-cerveau élevée aux molécules de petits poids moléculaires (< 800 Da) (*Figure 16*) et une mortalité néonatale très précoce (Nitta et al., 2003). La contribution de la CLDN3 et de la CLDN12 dans le fonctionnement de la BHE est encore débattue (Liebner et al., 2018). La CLDN3 pourrait limiter le passage des cellules immunes dans le SNC : chez la souris, une perte de *Cldn3* associée à une désorganisation spatiale de la *Cldn1* a été décrite dans les capillaires sanguins de la BHE entourés par un infiltrat inflammatoire dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune (Wolburg et al., 2003). Chez le rat, une étude transcriptomique (qRT-PCR) a par ailleurs mis en évidence l'expression spécifique des *Cldn4* et *Cldn16* dans des préparations de capillaires cérébraux isolés (Kratzer et al., 2012).

L'**occludine** est une autre protéine membranaire intégrale présente au niveau des jonctions serrées (Virgintino et al., 2004). Les souris occludine-déficientes présentent des jonctions serrées d'aspect normal (immunohistofluorescence et microscopie électronique) au niveau de l'intestin, du rein et du foie ; l'aspect des jonctions serrées de la BHE n'a pas été décrit sur ces animaux (Saitou et al., 2000). Les souris occludine-déficientes développent cependant un phénotype complexe (retard de croissance, stérilité masculine, calcifications cérébrales) suggérant que l'absence d'occludine induit une déficience modérée des jonctions serrées, y compris dans la BHE (Saitou et al., 2000). L'occludine pourrait également avoir un rôle dans le *sensing* du stress oxydant (Haseloff et al., 2015) : sous l'effet de l'hypoxie, l'occludine est rapidement internalisée (cellules HEK-293 et MDCK-II) (Bellmann et al., 2014). Des molécules d'adhésion **JAM**, appartenant à la famille des *cortical thymocyte marker of the Xenopus* (CTX) de la superfamille des immunoglobulines, sont également exprimées au niveau des jonctions

serrées de la BHE (Martin-Padura et al., 1998). Les protéines JAM1 à 3 et l'*endothelial adhesion molecule* (ESAM) sont impliquées dans l'assemblage et la stabilité des jonctions serrées, la polarisation des cellules endothéliales et permettent la migration des leucocytes à travers la BHE (Jia et al., 2013; Liebner et al., 2018; Martin-Padura et al., 1998). Enfin, la **tricelluline** et le *lipolysis-stimulated lipoprotein receptor* (**LSR**) forment des jonctions serrées « tricellulaires » au niveau des points de contact entre trois cellules et participent ainsi au phénotype de barrière de l'endothélium (Masuda et al., 2011). Ces différentes protéines membranaires intégrales sont liées par leur domaine C-terminal intra-cytoplasmique à des « protéines d'échafaudage » de la famille des *membrane-associated guanylate kinases* (MAGUK), les *zonula occludens* (ZO1, 2 et 3), qui les relient au cytosquelette d'actine (Greene & Campbell, 2016; Liebner et al., 2018).

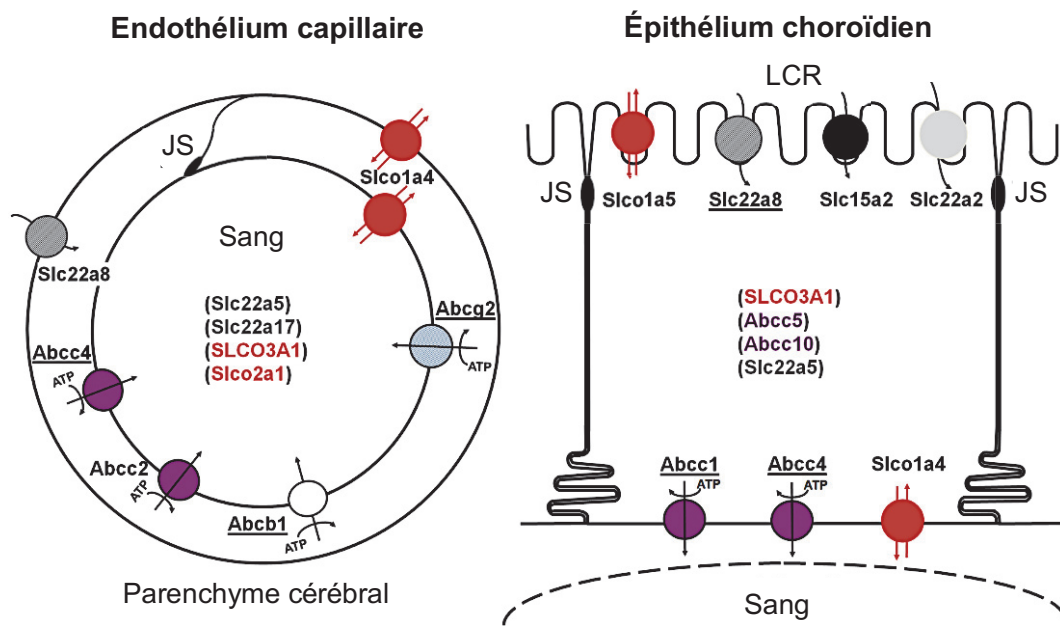
### ***Transporteurs d'efflux***

Les cellules endothéliales de la BHE présentent un trafic transcellulaire plus faible que les cellules endothéliales des vaisseaux périphériques : elles sont notamment exemptes de fenestrations et présentent un nombre réduit de vésicules de pinocytose (aspécifiques) (De Bock et al., 2016; Strazielle & Gherzi-Egea, 2013). Au contraire, ces cellules présentent de nombreux mécanismes de transports actifs et facilités qui permettent le transport sélectif de nutriments et de composés biologiquement actifs (e.g. hormones stéroïdes, eicosanoïdes) du sang vers le SNC, et l'élimination des déchets du SNC vers le sang. Les principaux transporteurs d'efflux de la BHE et leurs localisations membranaires sont décrits dans la *Figure 17*. Les profils développementaux d'expression de ces transporteurs sont présentés dans le *Tableau 3*.

L'une des spécificités de la BHE est la présence importante d'**ABCB1** (P-glycoprotéine, PGP, MDR1) et d'**ABCG2** (*breast cancer resistance protein*, Bcrp) sur la membrane luminale des cellules endothéliales (Dauchy et al., 2008; Shawahna et al., 2011; Strazielle & Gherzi-Egea, 2015). Chez l'homme, l'expression d'ABCG2 est deux fois plus importante que celle d'ABCB1 (Shawahna et al., 2011). Le transporteur d'efflux ABCB1 accepte une grande variété de substrats dont certains médicaments potentiellement intéressants dans le traitement des pathologies du SNC comme des



immunosuppresseurs, antirétroviraux, certains antibiotiques, certains agents antidépresseurs et antipsychotiques. Des immunomarquages réalisés sur tissus humains ont montré que le transporteur d'efflux ABCB1 est présent sur la membrane des microvaisseaux cérébraux dès le milieu de la gestation (Daood et al., 2008; Virgintino et al., 2008).



**Figure 17 | Représentation schématique des principaux transporteurs d'efflux multispécifiques de la barrière hémato-encéphalique (*gauche*) et de la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne (*droite*) impliqués dans la neuroprotection.**

Les noms soulignés correspondent aux transporteurs d'efflux dont l'existence a été démontrée chez l'homme. Les noms des transporteurs sont indiqués entre parenthèses lorsque les données concernant leur implication dans l'efflux entre le compartiment cérébral (parenchyme cérébral ou liquide céphalorachidien) et le sang sont encore limitées.

Abréviations : LCR : liquide céphalorachidien, JS : jonctions serrées.

D'après (Strazielle & Gherzi-Egea, 2015).

Chez le rat, l'expression d'Abcb1 augmente au cours du développement : elle est multipliée par 5 entre le stade périnatal (9 j) et le stade adulte (Western-blot quantitatif) (Gazzin et al., 2008; Strazielle & Gherzi-Egea, 2015). Le transporteur ABCG2 a un rôle important dans les phénomènes de résistance médicamenteuse (Natarajan et al., 2012).



Ce transporteur est exprimé chez l'homme à partir de la 22<sup>ème</sup> semaine de gestation (Daood et al., 2008). Chez le rat, le transporteur Abcg2 acquiert un haut niveau d'expression très tôt au cours du développement qui se maintient à l'âge adulte (Strazielle & Ghersi-Egea, 2015). Les transporteurs **ABCC2** (*multidrug resistance-associated protein 2*, MRP2) et **ABCC4** (MRP4) sont localisés au pôle luminal des cellules endothéliales de la BHE (Strazielle & Ghersi-Egea, 2015). Ils prennent en charge de nombreux xénobiotiques mais également des molécules partiellement détoxifiées comme les conjugués au glutathion (GSH) (Bodó et al., 2003).

**Tableau 3 | Analyse comparative de l'expression développementale des transporteurs d'efflux entre la barrière hémato-encéphalique et la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne.**

Barrière hémato-encéphalique		Barrière sang – liquide céphalorachidien	
Principaux transporteurs d'efflux	Profil développemental	Principaux transporteurs d'efflux	Profil développemental
ABCB1/Abcb1a	↑ mRNA, Prot, Fc	Abcc	= Fc
ABCG2/Abcg2	= mRNA, (Prot)	Abcc1	= mRNA, Prot
Abcc4	↑ mRNA	Abcc4	≤ mRNA
Slc22a8	= mRNA, prot	Slc22a8	↑ mRNA
		Slco	↓ Fc
		Slco1a5	= mRNA
		Pept2/Slc15	= mRNA, (Prot)
Autres transporteurs multispécifiques	Profil développemental	Autres transporteurs multispécifiques	Profil développemental
Slc22a5	↑ mRNA	Abcb1b	↓ mRNA
Slco1a4	↑ mRNA, Prot	Abcg2	↓ mRNA(Prot)
Slc22a17	= mRNA	Abcc5	= mRNA
Slco2b1	= mRNA	Abcc9	↓ mRNA
Slco2a1	↓ mRNA	Abcc10	= mRNA
		Slc22a5	= mRNA
		Slco1a4	= mRNA

Symboles et abréviations : ↑, ↓, = : augmentation, diminution, expression similaire chez l'adulte en comparaison du stade périnatal, respectivement. mRNA : déterminé par qRT-PCR ou *gene array*. Prot : déterminé par Western-blot quantitatif. (Prot) : déterminé par l'intensité du signal immunohistochimique ou d'immunohistofluorescence. Fc : déterminé par des études fonctionnelles à l'aide de substrats spécifiques.

D'après (Strazielle & Ghersi-Egea, 2015).

Plusieurs transporteurs d'efflux de la famille SLC sont également présents dans la BHE (Strazielle & Ghersi-Egea, 2015). Le transporteur d'efflux **SLC22A8** (OAT3, *organic anion transporter 3*) est le plus étudié ; il a été mis en évidence au pôle basolatéral des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux de souris par une étude transcriptomique, et son expression est stable au cours du développement. Chez le rat, le transporteur Slco1a4 (Oatp2, *organic anion transporting polypeptide 2*) est présent aux deux pôles des cellules endothéliales de la BHE ; son rôle dans l'efflux (plutôt que dans l'influx) reste à déterminer.

### ***Enzymes de détoxification et enzymes antioxydantes***

Plusieurs enzymes de détoxification sont exprimées dans les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux (Declèves et al., 2013).

Au sein de la BHE, les enzymes de phase I ont probablement pour rôle d'inactiver les composés pharmacologiquement actifs et les substances toxiques afin d'éviter qu'ils n'entrent en contact avec le parenchyme cérébral (Declèves et al., 2013). Les **monoamines oxydases** (MAO) inactivent les monoamines neuroactives (e.g adrénaline, noradrénaline, sérotonine) ainsi que de nombreux autres xénobiotiques aminés, y compris des molécules thérapeutiques. Au cours de la réaction de détoxification de ces composés aminés, les MAO produisent du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), normalement pris en charge par les systèmes antioxydants cellulaires (catalase, glutathion peroxydases). En condition d'ischémie-reperfusion, les MAO peuvent cependant participer à l'augmentation du stress oxydant : l'augmentation des concentrations en catécholamines couplée à l'hyperoxie pendant la reperfusion augmente la production d' $H_2O_2$  qui surpasse alors les capacités antioxydantes cellulaires (Simonson et al., 1993). Chez l'homme, les transcrits *MOAA* et *MOAB* ont été détectés dans des microvaisseaux isolés (Kalaria et al., 1988; Shawahna et al., 2011). La MAO est localisée au niveau des mitochondries, ce qui suggère un enrichissement en MAO au niveau des microvaisseaux de la BHE, particulièrement riches en mitochondries. Chez la souris, l'expression du transcrit *Maoa* est effectivement plus élevée dans les cellules endothéliales des capillaires de la BHE que dans les cellules endothéliales des capillaires du foie ; le niveau d'expression de la *Maob*

est cependant similaire entre ces deux types cellulaires (Vanlandewijck et al., 2018). Les enzymes de la superfamille des **cytochromes P450** (CYP) catalysent principalement des réactions d'oxydation. L'activité de certaines CYP a été décrite dans les microvaisseaux cérébraux chez l'homme et chez le rat (Gherssi-Egea et al., 1994, 1993). Les CYP1B1 et CYP2U1 sont les CYP majoritaires dans les cellules de la BHE chez l'homme (Dauchy et al., 2008; Shawahna et al., 2011). Le CYP1B1 intervient dans le métabolisme de composés endogènes (e.g. estradiol, mélatonine), de médicaments (e.g. tamoxifène, docétaxel) et de composés toxiques (e.g. benzo[*a*]pyrène) (Dutour & Poirier, 2017). Cette enzyme est surexprimée dans les tissus cancéreux, ce qui participerait à la résistance médicamenteuse (Dutour & Poirier, 2017). Le CYP2U1 participerait au métabolisme des acides gras insaturés (e.g. acide arachidonique, acide linoléique) et des acides gras saturés à longue chaîne (e.g. acide palmitique) (Dhers et al., 2017). Le CYP2U1 est en revanche très peu impliqué dans le métabolisme des xénobiotiques ; ses seuls substrats pharmacologiques avérés sont la débrisoquine (avec une affinité envers cet antihypertenseur bien moindre que celle du CYP2D6), et des composés issus du métabolisme de la terfénadine (antihistaminique) (Dhers et al., 2017). Enfin, les **époxydes hydrolases** métabolisent les époxydes en diols théoriquement moins toxiques. L'époxyde hydrolase microsomale (EPHX1) est la plus impliquée dans la détoxification envers les époxydes exogènes (e.g. oxyde de cyclohexène) et les époxydes issus du métabolisme de certains xénobiotiques (e.g. oxyde de styrène issu de la dégradation du styrène (plastique) par les CYP) (Václavíková et al., 2015) ; elle est active dans les microvaisseaux cérébraux chez l'homme (Gherssi-Egea et al., 1993). Chez la souris, l'Ephx1 a été détectée dans les cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux (Marowsky et al., 2009). Chez le rat, les homogénats de microvaisseaux cérébraux isolés ont une activité époxyde hydrolase envers le benzo[*a*]pyrène-4,5-oxide (fumée de cigarette) 6 fois supérieure à celle mesurée dans les homogénats de cerveau total (Gherssi-Egea et al., 1988).

Les enzymes de phase II favorisent l'excrétion de leurs substrats en les conjuguant à des molécules polaires. Les **UDP-glucuronosyltransférases** (UGT) catalysent des réactions de glucuronosylation ; l'UGT1A1 forme notamment la bilirubine conjuguée à partir de la bilirubine libre (Gazzin et al., 2012). Les UGT présentent de fortes différences inter-espèces : ces enzymes n'ont pas été détectées (ARNm, activité) dans les

microvaisseaux chez l'homme mais ont une importante activité chez le rat chez lequel elles conjuguent notamment des composés à structures phénoliques (e.g. 1-naphtol) (Gherzi-Egea et al., 1988, 1993; Shawahna et al., 2011). Les **glutathion transférases** (GST) catalysent la conjugaison de nombreux substrats électrophiles polaires avec du glutathion réduit (GSH) (cf §3.2). L'isoenzyme GSTP1 est largement majoritaire dans les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux chez l'homme ; les isoenzymes GSTM2, GSTM3, GSTM5 et GSTO1 ont également été détectées (Shawahna et al., 2011). Les **sulfotransférases** (SULT) ont de nombreux substrats endogènes (e.g. hormones, stéroïdes) et exogènes (e.g. paracétamol). Le transcrit de la *SULT1A1* a été détecté à faible niveau dans les capillaires cérébraux isolés humains (Shawahna et al., 2011).

#### 2.2.4. Barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne

##### 2.2.4.1. Localisation et surface d'échange

La barrière sang-LCR choroïdienne est localisée au niveau de l'épithélium des plexus choroïdes. Les plexus choroïdes sont des organes papillaires très ramifiés invaginés dans les différentes cavités du cerveau : les deux ventricules latéraux, le 3<sup>ème</sup> ventricule et le 4<sup>ème</sup> ventricule (*Figure 4*). Chez l'homme, le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule est formé au cours de la 6<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire, suivi par ceux des ventricules latéraux (entre la 6<sup>ème</sup> et la 7<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire), et celui du 3<sup>ème</sup> ventricule (Katarzyna M. Dziegielewska et al., 2001; Müller & O'Rahilly, 1990). Quelle que soit l'espèce étudiée, le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule est le premier formé.

La barrière sang-LCR choroïdienne est une importante interface d'échange entre le sang et le LCR circulant dans le système ventriculaire cérébral : sa surface apicale est estimée entre 2 et 5 m<sup>2</sup> chez l'homme adulte (Spector, Keep, et al., 2015). Chez le rat de 30 jours, la surface apicale de cette interface est estimée à 75 cm<sup>2</sup>, et est donc proche de la surface luminale des microvaisseaux de la BHE estimée à 155 cm<sup>2</sup> (Keep & Jones, 1990). En outre, les plexus choroïdes ont le plus important débit sanguin cérébral. Ce flux sanguin augmente progressivement au cours du développement : il est estimé à 2,5 et

2,7 mL·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup> de tissu pour les plexus choroïdes des ventricules latéraux et du 4<sup>ème</sup> ventricule respectivement chez le rat de deux semaines, et à 3,2 et 4 mL·min<sup>-1</sup>·g<sup>-1</sup> de tissu pour les plexus choroïdes des ventricules latéraux et du 4<sup>ème</sup> ventricule respectivement chez le rat adulte (Szmydynger-Chodobska et al., 1994).

### 2.2.4.2. Structure

Les cellules épithéliales des plexus choroïdes sont le siège de la barrière sang-LCR choroïdienne. Cet épithélium entoure un stroma conjonctif riche en vaisseaux sanguins. Les plexus choroïdes abritent également diverses cellules immunes. Les différentes composantes de la barrière sang-LCR choroïdienne sont détaillées ci-après.

#### ***Épithélium choroïdien***

L'épithélium choroïdien, dérivant du neuroépithélium<sup>4</sup>, est en continuité avec l'épendyme tapissant les ventricules cérébraux (Lun, Monuki, et al., 2015). Cet épithélium forme de très nombreuses villosités (*Figure 18D*). Il se compose d'une monocouche continue de cellules cubiques bombées (*Figure 18C*), étroitement reliées entre elles par des jonctions serrées, reposant sur une lame basale continue.

Le pôle apical de ces cellules est différencié en microvillosités (*Figure 18C*). Cette spécialisation apicale, additionnée aux villosités de l'épithélium choroïdien, permet de multiplier par 30 la surface d'échange entre le sang et le LCR (Spector, Keep, et al., 2015). Les cellules épithéliales choroïdiennes présentent également une ou deux douzaines de cils<sup>5</sup> non-motiles potentiellement impliqués dans la régulation de la production du LCR (*Figure 18C*) (Narita & Takeda, 2015). Ces cils sont situés à proximité immédiate des cellules immunes de la surface des plexus choroïdes et pourraient donc également être une zone de contact privilégiée pour ces cellules immunes et/ou pour les facteurs chimiques qu'elles sécrètent (Narita & Takeda, 2015). Curieusement, une étude réalisée *ex vivo* sur des plexus choroïdes isolés de souris a montré que la majorité des cils de l'épithélium choroïdien présentent une motilité transitoire au cours de la période

---

<sup>4</sup> Cellules neuroépithéliales : Cellules souches multipotentes du SNC formant la paroi des ventricules cérébraux chez le fœtus.

<sup>5</sup> Cils : Projections fines de la surface cellulaire de ~ 250 nm de diamètre et mesurant 5 à 10 µm.

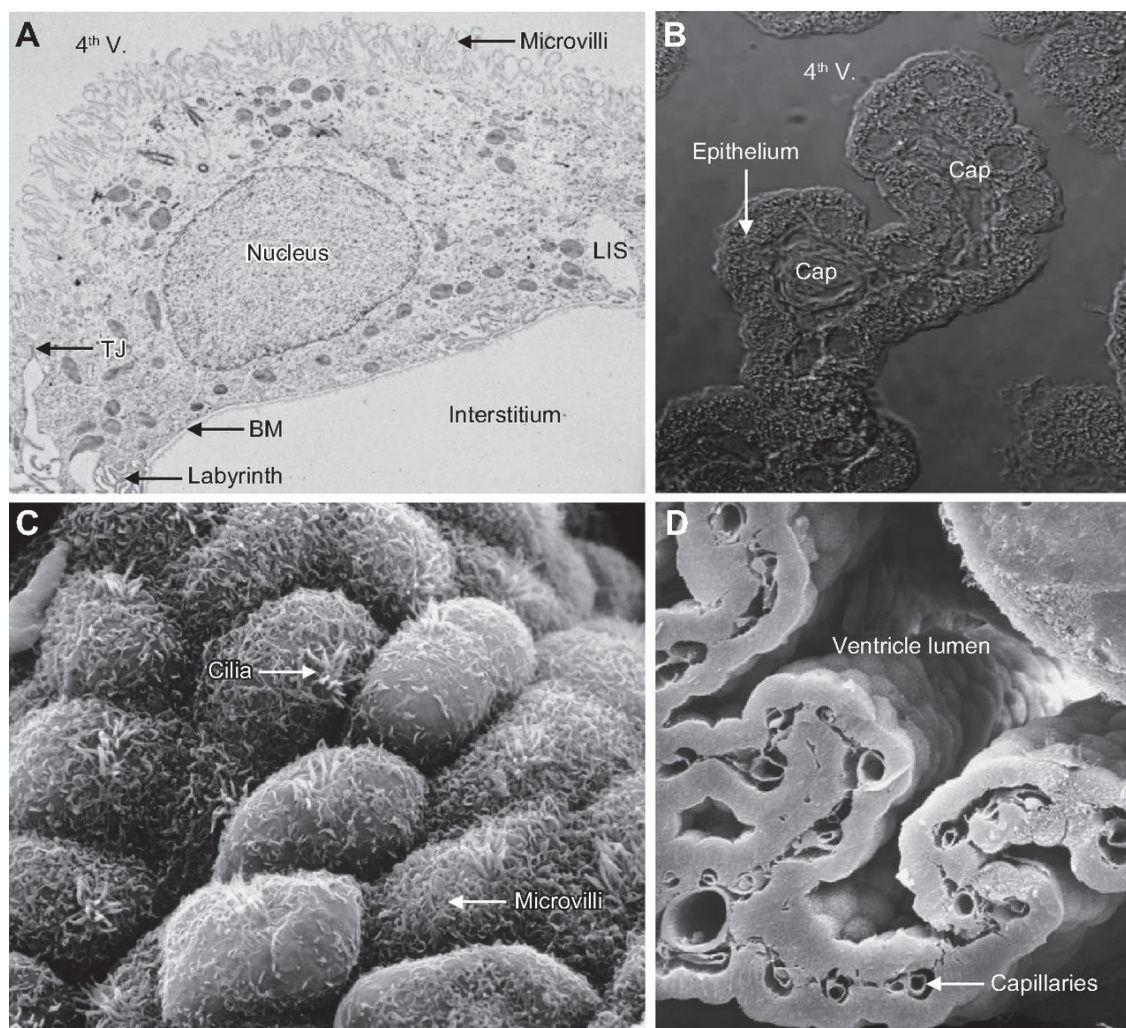
périnatale (Narita et al., 2012). Ces mouvements ciliaires (faible amplitude, faible fréquence, orientation aléatoire) pourraient participer à la diffusion radiale de composés synthétisés par les cellules épithéliales choroïdiennes dans le LCR.

Au niveau intracellulaire, les cellules épithéliales sont riches en mitochondries, en réticulum endoplasmique et en vésicules de sécrétion (Cornford et al., 1997). Cette capacité métabolique importante permet tout d'abord d'assurer la sécrétion du LCR. Elle est aussi associée à l'expression élevée de diverses enzymes, récepteurs et transporteurs participant au phénotype de barrière (Gherzi-Egea, Strazielle, et al., 2018).

La microscopie électronique a permis de distinguer deux types cellulaires, communément appelés cellules « claires » et cellules « foncées » (*Figure 19*) (Dohrmann, 1970). Les cellules « foncées », généralement moins nombreuses, présentent une densité cytoplasmique et nucléaire plus élevée, légèrement plus de vacuoles au pôle apical, et sont exemptes de cil ou présentent des cils filiformes (Dohrmann, 1970; Schultz et al., 1977). La densité du milieu intracellulaire pourrait refléter le degré d'hydratation de la cellule : l'administration de vasopressine ou une période de privation hydrique augmente le pourcentage de cellules « foncées » (Johanson et al., 1999; Schultz et al., 1977).

Les cellules épithéliales de la barrière sang-LCR présentent également des particularités régionales : l'équipe de Maria Lehtinen a en effet mis en évidence une variation de 22 % entre le transcriptome des cellules épithéliales des plexus choroïdes des ventricules latéraux et celui des cellules épithéliales du plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule de l'embryon de souris (RNA-seq, qRT-PCR, *microarray*) (Lun, Johnson, et al., 2015). Les sécrétomes prédictifs des cellules épithéliales choroïdiennes de ces deux tissus suggèrent que la composition du LCR varie en fonction du type de plexus choroïde qui le sécrète.

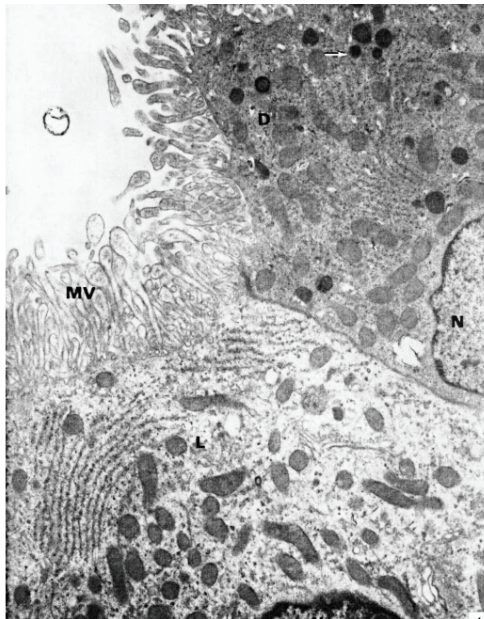




**Figure 18 | Ultrastructure du plexus choroïde.**

**A.** Micrographie électronique à transmission d'une cellule épithéliale de plexus choroïde de rat. La surface luminale contient de nombreuses microvillosités (*Microvilli*) et est séparée de l'espace intercellulaire latéral (*LIS*) par des jonctions serrées (*TJ*). Un labyrinthe de protrusions membranaires plasmatiques (*Labyrinth*) apparaît à la frontière entre les membranes latérales et basales. La membrane basale (*BM*) sépare l'épithélium de l'interstitium qui, sur cette image, manque de tissu conjonctif en raison de la technique de préparation. **B.** Micrographie en contraste interférentiel de la pointe du 4<sup>ème</sup> ventricule (4<sup>th</sup> V). Une villosité choroïdienne occupe la lumière du ventricule. Le tissu choroïdien est composé d'un cœur conjonctif riche en capillaires sanguins (*Cap*), et d'une monocouche de cellules épithéliales cuboïdales. **C.** Micrographie électronique à balayage de la surface ventriculaire d'un plexus choroïde humain. Les cellules épithéliales sont bombées et présentent de nombreuses microvillosités apicales (*Microvilli*) et quelques cils (*Cilia*). Les zones plus denses aux électrons correspondent aux jonctions intercellulaires. **D.** Cryo-fracture d'un plexus choroïde de souris. L'épithélium choroïdien montre de nombreux plis.

D'après (Damkier et al., 2013).



**Figure 19 | Microscopie électronique de l'épithélium choroïdien humain montrant les cellules « claires » et « foncées ».**

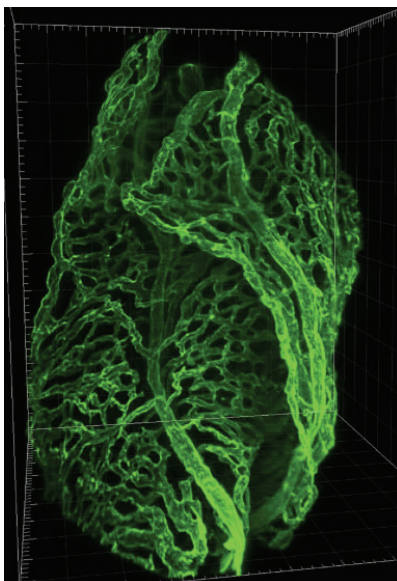
Le tissu est issu d'une biopsie de plexus choroïde de ventricule latéral (femme de 23 ans). Les cellules épithéliales montrent des densités cytoplasmiques différentes qui permettent de distinguer des cellules « claires » (L) et des cellules « foncées » (D). Les flèches montrent des vacuoles chargées d'osmium.

Abréviations : MV : microvillosités, N : noyau.  
Grossissement : x11800.

D'après (Dohrmann, 1970).

### ***Stroma conjonctif et capillaires choroïdiens***

Le tissu conjonctif choroïdien contient des fibroblastes. Ces fibroblastes sécrètent une trame conjonctive lâche qui est richement vascularisée. Contrairement aux capillaires formant la BHE, les capillaires choroïdiens sont fenêtrés et ne présentent pas de jonctions serrées.



**Figure 20 | Représentation tridimensionnelle du réseau sanguin irriguant une villosité choroïdienne.**

Les cellules endothéliales d'un plexus choroïde latéral de rat adulte ont été marquées par l'anticorps anti-Reca1 (vert) et visualisées par microscopie à feuillets de lumière. Les plexus choroïdes présentent un dense réseau capillaire. Les cellules épithéliales choroïdiennes ne sont pas visibles sur cette image.

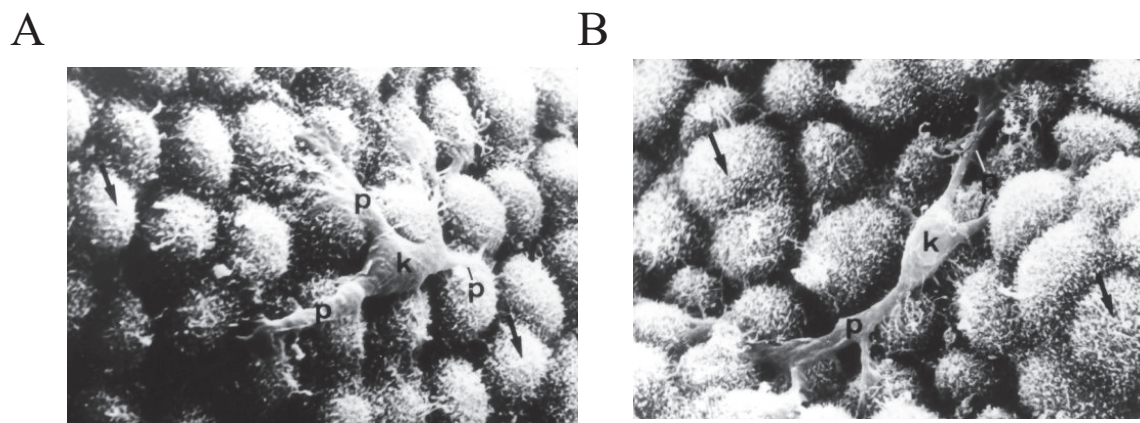
Graduation : 10  $\mu$ m.

D'après (Gherzi-Egea, Strazielle, et al., 2018).



### ***Cellules immunes***

Les plexus choroïdes sont une voie d'entrée dans le SNC pour les cellules du système immunitaire et participent activement à la surveillance immune du SNC (Stolp et al., 2013). Plusieurs types de cellules immunes résidentes sont associées aux plexus choroïdes. Des macrophages et des cellules dendritiques (CD11c<sup>+</sup>) sont localisés au sein du stroma conjonctif, situé hors du SNC. Ces cellules ont un rôle clé dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T au cours d'événements inflammatoires centraux (Kaur et al., 2016). Des cellules épiplexuelles, appelées cellules de Kolmer, sont apposées au pôle apical de l'épithélium choroïdien (*Figure 21*). Ces cellules présentatrices d'antigènes pourraient stimuler les lymphocytes centraux en cas de présence de pathogènes dans le LCR ou dans le liquide interstitiel cérébral (Ransohoff & Engelhardt, 2012).



**Figure 21 | Images de microscopie électronique à balayage de la surface d'un plexus choroïde latéral de singe mâle adulte (*Cebus apella apella*) montrant des cellules de Kolmer.**

Les cellules de Kolmer (*k*) circulent à la surface de l'épithélium choroïdien (*flèches*). Ces cellules ont de fins prolongements cytoplasmiques (*p*) qui partent du corps cellulaire.

Grossissement : A : x405, B : x425.

D'après (Tamega et al., 2000).

#### **2.2.4.3. Principaux mécanismes de barrière**

### ***Jonctions serrées***

Les jonctions serrées présentes au niveau du pôle apical des cellules de l'épithélium choroïdien limitent les mouvements paracellulaires entre le sang et le LCR. Ces jonctions

garantissent également la polarité de cet épithélium en empêchant la diffusion des protéines transmembranaires entre les membranes apicale et basolatérale.

Les jonctions serrées se mettent en place et sont efficaces très tôt au cours du développement. Des études fonctionnelles ont montré l'imperméabilité de l'épithélium choroïdien à différents traceurs dès le 15<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire chez le rat, et le 1<sup>er</sup> jour de développement postnatal chez l'opossum (Ek et al., 2003; Johansson et al., 2006; Liddelow et al., 2013).

Chez l'homme, les jonctions serrées liant les cellules épithéliales choroïdiennes sont caractérisées par une expression des **CLDN1, 2, 3 et 5** mises en évidence par immunohistochimie et immunohistofluorescence dès les stades fœtal (à l'exception de la CLDN5) et pédiatrique (Kratzer et al., 2012; Virág et al., 2017). Chez le rat, des études de qRT-PCR confirmées par analyses Western-blot, ont montré que les Cldn1, 2 et 3, majoritaires, étaient associées aux Cldn6, 9, 10, 12, 19 et 22 (Kratzer et al., 2012). La Cldn5 n'a pas été détectée chez le rat (Kratzer et al., 2012). La CLDN1 est une claudine de scellement. La CLDN2, spécifique des jonctions serrées de la barrière sang-LCR au sein du cerveau, n'est pas une claudine de scellement : elle forme un pore permettant le passage paracellulaire de petits cations inorganiques ( $K^+$ ,  $Na^+$ ), d'eau, et d'autres solutés entre le sang et le LCR. Cette claudine est à l'origine de la faible résistance transépithéliale mesurée à travers l'épithélium choroïdien ( $178 \Omega \cdot cm^2$  chez la grenouille) (Saito & Wright, 1983). Chez la souris, la perte de la Cldn3 dans la BHE est associée à une infiltration inflammatoire ; la CLDN3 pourrait donc avoir un rôle dans la régulation du passage de cellules immunes à travers la barrière choroïdienne (*cf* §2.2.3.3) (Wolburg et al., 2003). L'**occludine** et la **tricelluline** sont également présentes au niveau des jonctions serrées (Iwamoto et al., 2016; Virág et al., 2017). Comme dans la BHE, la tricelluline lie les membranes cellulaires au niveau des points de contact impliquant trois cellules adjacentes, et régule ainsi le passage paracellulaire des molécules de haut poids moléculaire (Mariano et al., 2011). La protéine **Alix**, exprimée à haut niveau dans la barrière sang-LCR choroïdienne, serait nécessaire à l'organisation spatiale des jonctions serrées (Campos et al., 2016).

La composition des jonctions serrées diffère entre les stades périnatal et adulte chez le rat, ce qui suggère que les fonctions supportées par ces jonctions serrées sont régulées au cours du développement (Kratzer et al., 2012). L'expression transcriptomique des *Cldn2*, 9 et 22 augmente au cours du temps alors que celle des *Cldn3* et 6 diminue. Ces résultats ont été confirmés par Western Blot pour les Cldn2, 3 et 9.

### ***Transporteurs d'efflux***

Les principaux transporteurs d'efflux de la barrière sang-LCR choroïdienne et leurs localisations membranaires sont décrits dans la *Figure 17*. Les profils développementaux d'expression sont présentés dans le *Tableau 3*.

Plusieurs types de transporteurs ABC ont été identifiés dans les cellules épithéliales des plexus choroïdes, avec globalement une expression majoritaire des protéines de type ABCC (MRP). Les transporteurs de type ABCC participent à l'élimination des conjugués au GSH, des glucuro- et des sulfo-conjugués par exemple. Le transporteur d'efflux **ABCC1** (MRP1), localisé sur la membrane basolatérale des cellules épithéliales choroïdiennes, est très abondant chez l'homme dès le stade embryonnaire (22<sup>ème</sup> semaine de gestation) (Daood et al., 2008). Chez le rat, l'expression protéique d'Abcc1 mesurée par Western-blot quantitatif est légèrement plus faible dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux de l'adulte que du nouveau-né, et est stable dans les plexus choroïdes du 4<sup>ème</sup> ventricule (Gazzin et al., 2008). Le transporteur d'efflux **ABCC4** (MRP4) est également abondant dans les plexus choroïdes. Chez le rat, l'expression transcriptomique d'*Abcc4* dans les plexus choroïdes augmente légèrement au cours du développement (Kratzer et al., 2013; Strazielle & Ghersi-Egea, 2015). Les transporteurs ABCC1 et 4, localisés au pôle basolatéral des cellules épithéliales choroïdiennes, pourraient jouer un rôle important dans la neuroprotection (Leggas et al., 2004; Rao et al., 1999).

Plusieurs familles de SLC susceptibles d'être impliquées dans l'excrétion des xénobiotiques ont été mises en évidence dans les plexus choroïdes de rat : les Slco, Slc15 et Slc22. Le transporteur d'efflux Slco1a4 (Oatp2) a été détecté au pôle basolatéral des cellules épithéliales choroïdiennes chez le rat ; son expression transcriptomique ne varie pas au cours du développement (Kratzer et al., 2013). Les transporteurs Slco1a5 (Oatp3),

Slc15a2 (Pept2), et Slc22a2 (Oct2), localisés au pôle apical, sont exclusivement exprimés au niveau des plexus choroïdes chez le rongeur (Strazielle & Ghersi-Egea, 2015). Les transporteurs SLC22A8 (OAT3) et SLC22A6 (OAT1) ont été localisés au sein des cellules épithéliales choroïdiennes chez l'homme, ils partagent un large panel de substrats exogènes (Alebouyeh et al., 2003). Chez le rat, le transporteur Slc22a6, fortement exprimé aux stades précoces de développement, semble progressivement être remplacé par le transporteur Slc22a8 qui présente un profil développemental inverse (étude transcriptomique) (Kratzer et al., 2013).

### **Enzymes**

À l'instar des microvaisseaux cérébraux de la BHE, les plexus choroïdes expriment des enzymes qui participent au phénotype de barrière (Declèves et al., 2013).

Les plexus choroïdes présentent une remarquable expression de plusieurs enzymes de phase I. Ces structures ont le plus haut niveau de **MAO** dans le cerveau, comparable au niveau hépatique (Kalaria et al., 1988). Chez le rat, l'expression transcriptomique des *Moaa* et *Moab* augmente au cours du développement périnatal (Kratzer et al., 2013). L'expression et l'activité des **CYP** dans les plexus choroïdes n'ont pas été étudiées chez l'homme. Chez le rat, les plexus choroïdes ont le niveau le plus haut niveau d'activité Cyp au sein du cerveau (mesurée envers la 7-benzoxyrésorufine), mais cette activité reste 4 fois inférieure à l'activité hépatique (Ghersi-Egea et al., 1994). Les transcrits des *Cyp1b1*, *2d4*, *2j4* et *2u1* ont été détectés dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux chez le rat adulte ; l'expression transcriptomique du *Cyp1b1* est supérieure aux stades embryonnaire et périnatal (Kratzer et al., 2013). Enfin, l'**EPHX1** est très exprimée dans les cellules épithéliales des plexus choroïdes chez l'homme dès le stade fœtal et chez la souris (Marowsky et al., 2009; Vasiljevic, 2017). Chez le rat, l'activité Epxh1 choroïdienne mesurée envers le benzo[*a*]pyrène-4,5-oxide est comparable à l'activité Epxh1 hépatique, et est 17 fois supérieure à l'activité Epxh1 mesurée dans des capillaires isolées (Ghersi-Egea et al., 1994). L'expression transcriptomique de l'*Ephx1* est par ailleurs stable entre le stade embryonnaire et le stade adulte dans les plexus choroïdes du rat (Kratzer et al., 2013).

Les plexus choroïdes expriment également de nombreuses enzymes de phase II. Chez le rat, les **Ugt** ont une importante activité choroïdienne envers les composés planaires (1-naphtol, 4-méthylumbelliférone), comparable à l'activité hépatique (Leininger-Muller et al., 1994). L'activité Ugt choroïdienne est, en fonction du substrat utilisé, 40 à 150 fois supérieure à l'activité mesurée dans les cellules de la BHE (Gherssi-Egea et al., 1994). Aucune donnée n'est cependant disponible chez l'homme. La **SULT1A1** est bien exprimée dans les plexus choroïdes chez l'homme, et présente une importante activité enzymatique envers le 4-nitrophénol et le 3,3'-T<sub>2</sub> (Richard et al., 2001). L'expression et l'activité choroïdienne des **GST** sont détaillées dans la partie §3.2.

En plus des enzymes du métabolisme des xénobiotiques, les plexus choroïdes ont des activités enzymatiques antioxydantes qui participent au phénotype de barrière. L'étude d'Ivan Tayarani a révélé une remarquable activité **glutathion peroxydase** (Gpx), 10 fois supérieure à l'activité mesurée dans les autres structures cérébrales chez le rat (Tayarani et al., 1989) (cf §3.2).

### 3. Mécanismes de neuroprotection choroïdiens liés au glutathion

Le GSH est un tripeptide impliqué dans de nombreuses réactions biochimiques dont certaines sont essentielles à la survie cellulaire. En particulier, le GSH a un rôle important dans la **protection envers le stress oxydant** et la **détoxification** des molécules électrophiles et des xénobiotiques. Les plexus choroïdes présentent une remarquable machinerie enzymatique liée au glutathion, ils pourraient donc avoir un rôle prépondérant dans la protection cérébrale envers les stress oxydants et toxiques.

#### 3.1. Glutathion

##### 3.1.1. Fonctions

**Tableau 4 | Rôles du glutathion.**

<b>Défense anti-oxydante et détoxification</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; <i>Scavenging</i> des radicaux libres et autres ERO</li> <li>&gt; Élimination du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes lipidiques (via l'activité GPX)</li> <li>&gt; Formation de mercapturates à partir de composés électrophiles (via l'activité GST)</li> <li>&gt; Conversion des formaldéhyde (carcinogènes) en formiates (via l'activité formaldéhyde déshydrogénase)</li> </ul>
<b>Implication dans les voies métaboliques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Synthèse des leucotriènes et prostaglandines (via l'endoperoxyde isomérase)</li> <li>&gt; Formation de nitrosothiol à partir du NO (ce qui permet le transport du NO dans le plasma et augmente sa demi-vie)</li> <li>&gt; Stockage et transport de la cystéine</li> </ul>
<b>Régulation</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>&gt; Statut redox intracellulaire</li> <li>&gt; Expression génique et protéique (via l'activation de certaines voies de signalisation en fonction du statut redox intracellulaire)</li> <li>&gt; Prolifération cellulaire et apoptose (contrôlées par le statut redox intracellulaire)</li> <li>&gt; Production de cytokines et réponse immunitaire (contrôle du phénotype Th1/Th2 par la balance GSH/GSSG)</li> <li>&gt; Glutathionylation protéique</li> <li>&gt; Fonction et intégrité mitochondriale (via l'activité GPX)</li> </ul>

Abréviations : ERO : espèces réactives de l'oxygène, GPX : glutathion peroxydase, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, GST : glutathion transférase.

Modifié d'après (Wu et al., 2004).

Le GSH a de nombreuses fonctions dans l'organisme ; certaines sont reportées dans le *Tableau 4*. Le GSH participe notamment à la **défense envers le stress oxydant**, via plusieurs systèmes enzymatiques et non-enzymatiques. Tout d'abord, ce peptide est un piègeur d'espèces réactives de l'oxygène<sup>6</sup> (ERO) aussi appelé *scavenger* : les ERO vont réagir préférentiellement avec le GSH, ce qui limite leurs interactions avec les autres composants cellulaires (ADN, protéines et lipides) (Ahmadinejad et al., 2017; Haenen & Bast, 2014). Le GSH est également le cosubstrat des GPX et participe ainsi à l'élimination des hydroperoxydes et des hydroperoxydes lipidiques (*cf* §3.2) (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). Le GSH a un rôle important dans la **défense envers les stress toxiques**. C'est en effet le cosubstrat des GST qui sont capables de prendre en charge des toxiques divers (e.g. hydrocarbures aromatiques, médicaments anti-cancéreux). Enfin, le GSH est une forme de **stockage de la cystéine** et permet son **transport extracellulaire** (nécessaire à la synthèse intracellulaire du GSH et de nombreuses autres protéines) (*cf* §3.1.3.1).

### 3.1.2. Répartition tissulaire et concentrations cellulaires

Le GSH est présent de façon **ubiquitaire** dans les cellules de mammifères, à des concentrations pouvant atteindre 12 mM (Dringen, 2000). Une étude approfondie de la littérature réalisée récemment par Caroline Rae et Stephen Williams évalue entre 1 et 2 mM la concentration du glutathion total<sup>7</sup> dans le cerveau humain (études utilisant la spectroscopie à résonance magnétique), avec des variations importantes en fonction de la zone cérébrale étudiée (Rae & Williams, 2017). La concentration en GSH est par exemple deux fois plus importante dans le cortex cingulaire antérieur que dans le cortex occipital (Sanaei Nezhad et al., 2017). La concentration en GSH dépend également du genre : dans l'étude menée par Mandal et collaborateurs, la concentration en GSH est supérieure chez les femmes dans 7 des 8 régions cérébrales étudiées (Mandal et al., 2012). Par ailleurs, la concentration en GSH dans le cerveau diminue au cours du vieillissement

---

<sup>6</sup> Espèces réactives de l'oxygène : Espèces chimiques oxygénées très réactives telles que des radicaux-libres (e.g. anion superoxyde  $O_2^{\cdot-}$ , radical hydroxyl  $OH^{\cdot}$ , oxyde nitrique  $NO^{\cdot}$ ) et des peroxydes (e.g.  $H_2O_2$ , peroxydes lipidiques).

<sup>7</sup> Glutathion total : Glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG).



et dépend de la condition physiopathologique de l'individu étudié (Emir et al., 2011; Mandal et al., 2012; Rae & Williams, 2017).

Chez le rat, les concentrations en GSH, mesurées sur des coupes de cerveau *ex vivo* par fluorimétrie après conjugaison avec le monochlorobimane (MCB), sont par exemple élevées dans les cellules épendymaires tapissant les ventricules latéraux ( $2,73 \pm 0,56$  mM) et dans les cellules des méninges ( $1,45 \pm 0,09$  mM), et sont plus faibles dans les astrocytes ( $0,9 \pm 0,08$  mM) et les neurones ( $0,21 \pm 0,02$  mM) (Sun et al., 2006). Chez la souris et le rat, des analyses histochimiques non-quantitatives du GSH ont révélé un marquage particulièrement important des cellules épithéliales choroïdiennes (Philbert et al., 1991; Slivka et al., 1987).

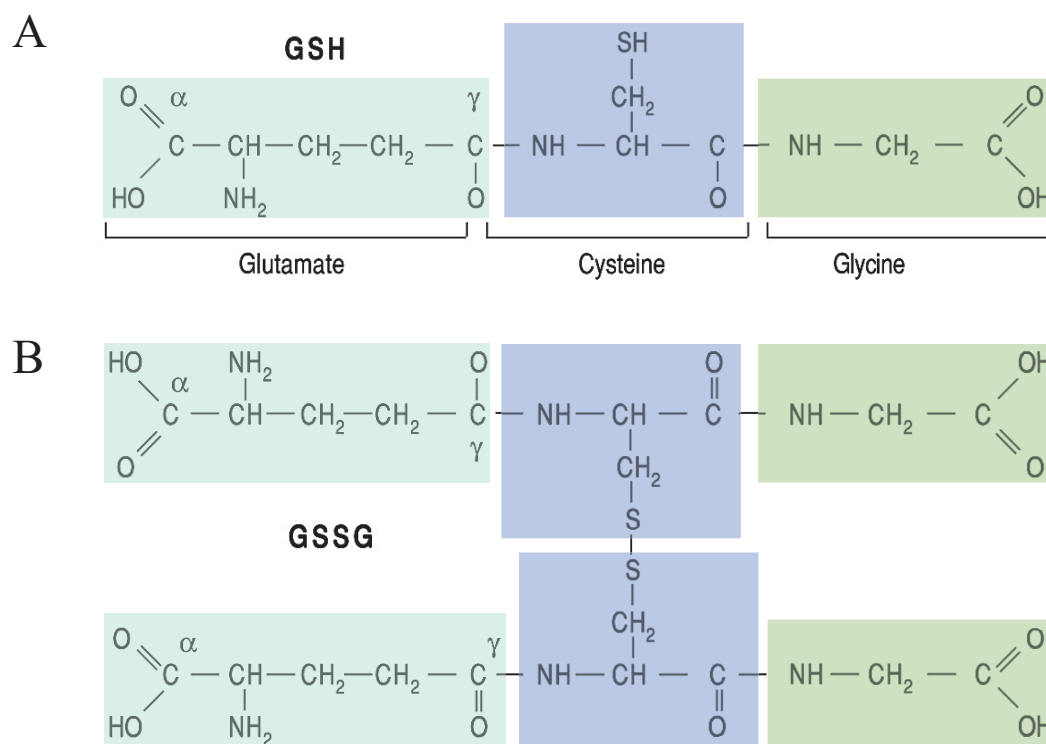
### 3.1.3. Métabolisme

#### 3.1.3.1. Synthèse

Le GSH, ou  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cystéinyglycine, est composé de trois acides aminés : le **glutamate**, la **cystéine**, et la **glycine** (*Figure 22A*). Il est synthétisé par les actions consécutives de deux enzymes ATP-dépendantes (*Figure 23*) : la  **$\gamma$ -glutamylcystéine synthétase** (ou glutamate-cystéine ligase, E.C. 6.3.2.2) et la **glutathion synthétase** (E.C. 6.3.2.3). Le GSH exerce un rétrocontrôle négatif (inhibition compétitive,  $K_i = 2,3$  mM) sur la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase, ce qui permet de réguler les niveaux intracellulaires de GSH, de glutamate et de cystéine (Dringen, 2000).

Au sein du SNC, le GSH peut être produit par les cellules neurales *in situ*. L'ensemble du parenchyme cérébral présente en effet les activités  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase et glutathion synthétase nécessaires à cette synthèse. Ces activités, mesurées *ex vivo* à partir de tissus cérébraux de lapin et de bœuf, sont particulièrement élevées dans les plexus choroïdes (Okonkwo et al., 1974; Tate et al., 1973). Cette capacité particulière de production du GSH est en adéquation avec les importants taux choroïdiens de GSH (*cf* §3.1.2).





**Figure 22 | Structure chimique du glutathion réduit et du glutathion oxydé.**

**A.** Le glutathion réduit (GSH), aussi appelé L- $\gamma$ -glutamyl-L-cystéinyglycine, est un tripeptide. Le glutamate N-terminal et la cystéinyglycine sont liés par le groupe  $\gamma$ -carboxyle du glutamate. Le résidu cystéine (ou cystéinyl) contient un groupe thiol réactif (R-SH) permettant au GSH d'assurer l'essentiel de ses fonctions. **B.** Le glutathion oxydé (GSSG) est un dimère formé par l'union de deux molécules de GSH par un pont disulfure (R-SS-R) reliant les deux résidus cystéines.

Modifié d'après (Arauz et al., 2016).

La synthèse intracellulaire du GSH est conditionnée par l'accès aux acides aminés le composant. Le **glutamate** et la **glycine** ne sont pas limitants, contrairement à la **cystéine**. La cystéine peut entrer dans les cellules neurales par le transporteur d'acides aminés neutres ASC1 sodium-dépendant, ou par le transporteur SLC1 (EAAT3) appartenant à la famille des transporteurs d'acides aminés excitotoxiques (EAAT) (Rae & Williams, 2017). La concentration extracellulaire en cystéine étant relativement faible (6  $\mu$ M), cet acide aminé est principalement apporté par la métabolisation intracellulaire de composés soufrés précurseurs (e.g. cystine, cystéinyglycine,  $\gamma$ -glutamylcystéine) (Dringen, 2000; Dringen & Hamprecht, 1999; Kranich et al., 1996; Rae & Williams, 2017). La cystine est un homodimère de cystéine qui peut être clivé sous l'effet réducteur de l'environnement

intracellulaire (Burdo et al., 2006; Rae & Williams, 2017). L'échangeur glutamate-cystine  $X_c^-$  a été localisé par immunohistochimie dans les neurones, les cellules gliales, les cellules endothéliales de la BHE, les cellules épendymaires, et les cellules épithéliales choroïdiennes de l'homme et de la souris (étude des deux sous-unités xCT et 4F2hc) (Burdo et al., 2006). Chaque type de cellule neurale a des « préférences » en terme de précurseur de cystéine : les études réalisées *in vitro* par Dringen ont montré que les neurones utilisent préférentiellement la cystéine déjà formée pour synthétiser le GSH, alors que les astrocytes peuvent utiliser la cystine (Dringen & Hamprecht, 1999; Kranich et al., 1996).

### 3.1.3.2. Recyclage

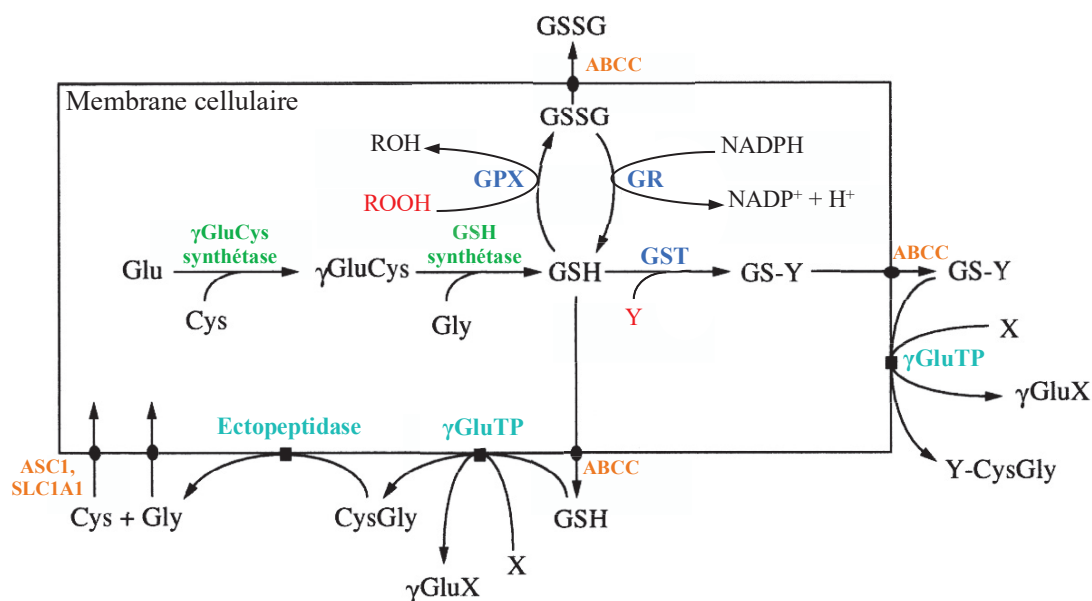
Le GSH peut également provenir du « recyclage » intracellulaire du glutathion oxydé (GSSG) produit par le *scavenging* des ERO, ou par l'activité des GPX (*Figure 23*). Ce recyclage, effectué par la glutathion réductase (GR), permet de limiter le pourcentage de GSSG intracellulaire à moins de 2 % en condition physiologique (Rae & Williams, 2017).

### 3.1.3.3. Export

Le GSH formé peut être exporté de la cellule par des transporteurs de type ABCC (MRP). Le GSH extracellulaire, à l'instar des conjugués au GSH, est substrat de l'ectoenzyme<sup>8</sup>  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. Cette enzyme catalyse le transfert du  $\gamma$ -glutamyl sur une molécule accepteuse, ce qui génère le dipeptide cystéinyglycine (ou un conjugué au cystéinyglycine). Le cystéinyglycine peut être hydrolysé par des ectopeptidases en cystéine et glycine, qui pourront être importées par d'autres cellules neurales pour synthétiser du GSH. Les plexus choroïdes présentent une importante activité  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase. Chez le lapin, cette activité est 50 à 100 fois supérieure à celle mesurée dans les autres structures cérébrales étudiées (Tate et al., 1973). Les cellules épithéliales choroïdiennes sont responsables de cette activité : elles sont fortement marquées par enzymohistochimie chez l'adulte (cobaye, rat, souris) et au cours du développement postnatal (rat) (De Bault & Mitro, 1994; Gazzin et al., 2008).

---

<sup>8</sup> Ectoenzyme : enzyme située sur la paroi externe d'une cellule.



**Figure 23 | Synthèse et métabolisme du glutathion.**

Le glutathion réduit (GSH) est formé par les actions successives de deux enzymes dépendantes de l'ATP (*en vert*) : la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase ( $\gamma$ GluCys synthétase) et la glutathion synthétase (GSH synthétase). La  $\gamma$ GluCys synthétase greffe la cystéine (Cys) au carbone  $\gamma$  du glutamate (Glu) ; la GSH synthétase ajoute ensuite la glycine (Gly) au  $\gamma$ -glutamylcystéine ( $\gamma$ GluCys) formé.

Les acides aminés composants le GSH (cystéine, glycine, glutamate) peuvent être importés dans la cellule par des transporteurs spécifiques (*en orange*), ou être synthétisés *in situ* à partir d'acides aminés précurseurs (*non présentés*).

Le GSH est utilisé par différents systèmes enzymatiques antioxydants ou de détoxification (*en bleu*). Les glutathion peroxydases (GPX, *en bleu*) peuvent utiliser le GSH comme cosubstrat pour détoxifier des hydroperoxydes toxiques (ROOH, *en rouge*). Cette réaction génère du glutathion oxydé (GSSG) qui est réduit en GSH par la glutathion réductase (GR, *en bleu*) en utilisant la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH). Les glutathion transférases (GST, *en bleu*) peuvent détoxifier des molécules électrophiles (Y, *en rouge*) en les conjuguant au GSH. Le conjugué au GSH formé (GS-Y) peut sortir de la cellule par des transporteur de type ABCC (MRP, *en orange*).

L'ectoenzyme  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ GluTP, *en bleu clair*) peut catalyser le transfert du groupement  $\gamma$ -glutamyl du GSH extracellulaire sur une molécule accepteuse X, et génère ainsi le dipeptide cystéinyglycine (CysGly). De la même façon, cette enzyme peut utiliser des conjugués au GSH extracellulaires (GS-Y) pour former un conjugué au cystéinyglycine (Y-CysGly). À partir du dipeptide cystéinyglycine, les ectopeptidases (*en bleu clair*) peuvent générer de la cystéine et de la glycine, acides aminés précurseurs du GSH.

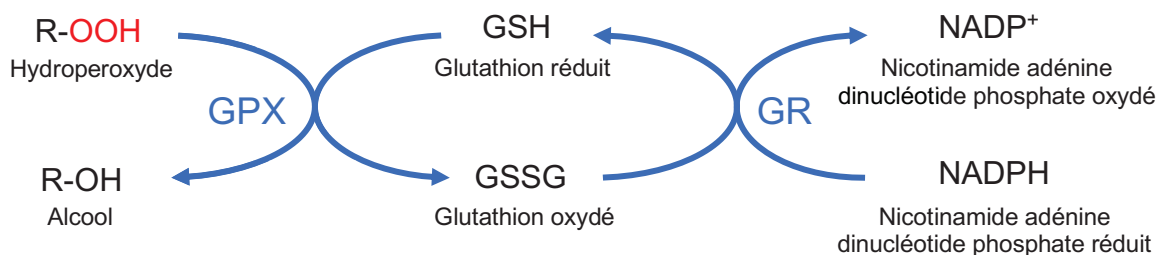
Modifié d'après (Dringen, 2000).

## 3.2. Glutathion peroxydases et glutathion réductase

### 3.2.1. Isoenzymes et structures

Chez les mammifères, les GPX (EC 1.11.1.9) forment une famille de huit isoenzymes<sup>9</sup> ayant une même origine phylogénétique (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013; Toppo et al., 2008). Les GPX possèdent un centre catalytique composé de 4 acides aminés : une sélénocystéine ou une cystéine, une glutamine (ou une sérine), un tryptophane, et un acide aspartique (Tosatto et al., 2008). On distingue les GPX ayant une sélénocystéine dans leur centre catalytique (SecGPX) et les GPX ayant une cystéine (CysGPX) (*Tableau 5*).

Les SecGPX peuvent catalyser la **réduction des hydroperoxydes en alcools** en utilisant le GSH comme substrat réducteur (*Figure 24*). La majorité des SecGPX peut toutefois utiliser d'autres substrats réducteurs en absence de GSH (*Tableau 5*). En fonction de leurs conformations, les SecGPX peuvent catalyser la réduction d'hydroperoxydes plus ou moins complexes : les homotétramères (GPX1, 2, 3 et 6) prennent en charge des hydroperoxydes solubles de petits poids moléculaires alors que la GPX4, enzyme monomérique, peut prendre en charge des hydroperoxydes lipidiques plus complexes (*Tableau 5*).



**Figure 24 | Couplage entre la réduction des hydroperoxydes en alcool par les glutathion peroxydases (GPX) et le recyclage du glutathion oxydé en glutathion réduit par la glutathion réductase (GR).**

<sup>9</sup> Isoenzymes : enzymes catalysant la même réaction chimique mais ayant une séquence d'acides aminés différente.

**Tableau 5 | Noms, caractéristiques structurales, substrats et localisations des différentes isoenzymes de glutathion peroxydases.**

Nom	Structure	Substrat		Localisation	
		Réducteur	Oxydant	Tissulaire	Cellulaire
<b>GPX1</b> (cGPx, GSHPx-1)	Sec, homotétramère	GSH ( $\gamma$ -GluCys)	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROOH, peroxynitrite, LOOH soluble</b>	ubiquitaire	cytosol, mitochondrie
<b>GPX2</b> (GSHPx-GI, GI-GPx, GPx-GI)	Sec, homotétramère	GSH	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	épithélium intestinal, foie	
<b>GPX3</b> (pGPx, pGSHPx, GPxP)	Sec, homotétramère	GSH (Trx, Grx)	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROOH, LOOH soluble, PLOOH</b>	plasma, lait, liquide broncho- alvéolaire, humeur aqueuse, tissu adipeux, liquide amniotique, membrane basale des cellules tubulaires du cortex rénal	extracellulaire
<b>GPX4</b> (PHGPx, PIP)	Sec, monomère	GSH, DTT, mercapatoéthanol, cystéine, certains thiols	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ROOH, peroxynitrite, LOOH, PLOOH, ChOOH, CEOOH</b>	testicule	cytosol, mitochondrie ou noyau
<b>GPX5</b> (cGPx)	Cys, homotétramère	n.d.	n.d.	épididyme	intra- et extracellulaire
<b>GPX6</b> (OMP)	Sec (Cys), homotétramère	n.d.	n.d.	épithélium olfactif	
<b>GPX7</b> (NPGPx)	Cys, monomère	(GSH), PDI	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PLOOH</b>		reticulum endoplasmique
<b>GPX8</b>	Cys, monomère	PDI ?	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>		membrane du reticulum endoplasmique

Les couleurs correspondent aux catégories de substrat : hydroperoxydes solubles de petits poids moléculaire (lipidiques ou non) (*rouges*), hydroperoxydes lipidiques plus complexes (*violet*).

Abréviations :  $\gamma$ -GluCys :  $\gamma$ -glutamylcystéine, CEOOH : hydroperoxyde d'ester de cholestérol, ChOOH : hydroperoxyde de cholestérol, DTT : dithiotréitol, Grx : glutarédoxine, LOOH : hydroperoxyde lipidique, n.d. : non déterminé, PDI : protéine disulfide isomérase, PLOOH : hydroperoxyde phospholipidique, ROOH : hydroperoxydes synthétiques de petite taille (e.g. hydroperoxyde de cumène, tert-butyl-hydroperoxyde), Trx : thioredoxine.

D'après (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013; Emmink et al., 2014; Y.-S. Ho et al., 1997; Toppo et al., 2008).

Les CysGPX sont en réalité des thiorédoxine peroxydases. En présence d'hydroperoxyde, il se forme un pont disulfure intramoléculaire au sein de la CysGPX qui nécessite l'utilisation d'un substrat réducteur de type rédoxine (e.g. thiorédoxine) (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). Les caractéristiques cinétiques des CysGPX suggèrent qu'elles sont moins impliquées que les SecGPX dans la protection envers les ERO.

La GR permet le recyclage du GSSG, produit par l'action des GPX, en GSH (*cf* § 3.1.3.2, *Figure 24*). Cette enzyme est très conservée chez les procaryotes comme chez les eucaryotes ; chez les eucaryotes, elle est localisée dans le cytoplasme et dans différentes organelles dont le noyau et les mitochondries (Couto et al., 2016).

### 3.2.2. Fonctions principales

Les hydroperoxydes sont des ERO, et à ce titre sont impliqués dans des mécanismes cellulaires très variés. À hautes concentrations, les ERO peuvent induire des **dommages cellulaires importants** (cassures des brins d'ADN, peroxydation lipidique, modifications protéiques) directement ou indirectement par la formation de radicaux libres ou de produits secondaires hautement réactifs (Buonocore Giuseppe et al., 2001). Par exemple, l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui est un ROS relativement peu réactif, peut interagir avec des métaux de transition comme le  $\text{Fe}^{2+}$  et générer le radical hydroxyle  $\text{OH}\cdot$  plus réactif et donc plus toxique (réaction de Fenton). À faibles concentrations, certaines ERO ont des **fonctions physiologiques**. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  participe à la signalisation cellulaire de façon autocrine et paracrine (Bienert et al., 2006) ; il est notamment impliqué dans la neurogenèse, la polarisation et la maturation neuronale (Gauron et al., 2016; Wilson et al., 2018). Une concentration faible ou modérée de 4-hydroxynonénal, produit de la peroxydation lipidique des acides gras insaturés, pourrait induire différents facteurs de transcription sensibles au stress oxydant comme le *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (NRF2 ou NFE2L2) et ainsi favoriser la survie cellulaire (Ayala et al., 2014). Les GPX régulent les taux d'hydroperoxydes ; elles peuvent donc agir dans la protection envers le stress oxydant et/ou dans la signalisation redox en fonction de leurs localisations cellulaires, de leurs spécificités de substrat, et de leurs caractéristiques cinétiques. Les fonctions des

différentes isoenzymes de GPX ont été revues par Regina Brigelius-Flohé et Mathilde Maiorino, et sont brièvement présentées ci-après (Brigelius-Flohé, 2006; Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).

La **GPX1** a été la première isoenzyme GPX caractérisée, c'est aussi la plus étudiée. Cette isoenzyme est exprimée de façon **ubiquitaire** et est localisée dans le cytoplasme et les mitochondries. En fonction de sa localisation subcellulaire, la GPX1 pourrait être sujette à différentes modifications post-traductionnelles qui moduleraient son activité (Diamond, 2015; Lubos et al., 2011). Par exemple, les GPX1 mitochondriales peuvent être inhibées par hyperacétylation et activées par la déacétylase mitochondriale sirtuine 3 (SIRT3) (Diamond, 2015). La GPX1 est capable de réduire les hydroperoxydes solubles de petits poids moléculaires (e.g. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydroperoxyde de *tert*-butyl, hydroperoxyde de cumène), et les hydroperoxydes lipidiques peu complexes. Le rôle principal de la GPX1 est la **protection envers le stress oxydant**. Les souris KO-*Gpx1* se développent en effet normalement, mais sont excessivement sensibles aux stress oxydants de fortes intensités (e.g. exposition au paraquat) (De Haan et al., 1998; Y.-S. Ho et al., 1997) ; les souris surexprimant la GPX1 humaine sont par ailleurs moins sensibles au choc toxique induit par le lipopolysaccharide (Mirochnitchenko et al., 2000). Des résultats divergents montrent cependant que le rôle de la GPX1 dans le stress oxydant et l'inflammation est plus complexe, et encore partiellement incompris (Bozinovski et al., 2012; Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). Par exemple, l'exposition intranasale au lipopolysaccharide entraîne une réaction inflammatoire broncho-pulmonaire de faible intensité chez les souris KO-*Gpx1* comparée aux souris sauvages (Bozinovski et al., 2012).

L'isoenzyme **GPX2** est principalement exprimée dans le **système gastro-intestinal** (épithélium intestinal et foie), et en particulier à la base des cryptes. La GPX2 semble avoir un rôle primordial : cette isoenzyme est la plus préservée en cas de déficit en sélénium. En maintenant l'homéostasie redox, la GPX2 contrôle l'équilibre entre la survie, la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales du tractus digestif (Emmink et al., 2014). La GPX2 aurait un rôle dans le **renouvellement continu de l'épithélium intestinal**. Au stade embryonnaire, la GPX2 pourrait être impliquée dans l'**organogénèse**.



La **GPX3** est extracellulaire ; elle a été majoritairement localisée dans le **plasma**. Elle pourrait avoir un rôle dans le **transport du sélénium**. Son rôle dans la régulation du stress oxydant plasmatique est peu probable étant donné que les concentrations en GSH sanguin sont faibles. La GPX3 a également été identifiée au niveau de la membrane basale de certaines cellules (e.g. cellules corticales rénales, cellules épithéliales intestinales). Elle pourrait y jouer le rôle de tampon redox en limitant l'activation intempestive de la défense antioxydante cellulaire en cas de stress oxydant de faible intensité.

La **GPX4** est principalement connue pour sa capacité à **réduire des hydroperoxydes lipidiques complexes**. Cette enzyme présente en réalité trois isoformes ayant des fonctions distinctes : le gène *GPX4* code en effet pour différents ARNm *GPX4* (Conrad et al., 2007; Diamond, 2015). L'isoforme mGPX4, localisée dans le compartiment mitochondrial, est presque uniquement exprimée dans les cellules testiculaires où elle est joue un rôle essentiel dans la maturation des spermatozoïdes. Les souris KO-*mGpx4* sont viables mais les mâles sont infertiles. L'isoforme snGPX4 est exprimée dans le noyau des spermatides où elle stabilise la chromatine en complexe avec des protamines. Les souris KO-*snGpx4* sont viables et fertiles, ce qui indique que le déficit en snGPX4 peut être compensé. Enfin, l'isoforme **cGPX4** est localisée de façon **ubiquitaire** dans le **cytosol**, les **membranes** et le **noyau** des cellules somatiques. Cette isoforme serait responsable du rôle antioxydant attribué à la GPX4. Le KO de la *cGpx4* est létal dès le 7,5<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire ; la cGPX4 limiterait la peroxydation lipidique engendrée par la 12/15-lipoxygénase, et empêcherait l'activation de l'*apoptosis-inducing factor* (AIF) (Seiler et al., 2008). La cGPX4 est également essentielle chez l'adulte ; elle jouerait un rôle important dans la neuroprotection en régulant la production des hydroperoxydes lipidiques et l'apoptose (Yoo et al., 2010).

La **GPX5** est spécifique de l'**épididyme** ; elle est localisée dans les cellules épithéliales, dans la lumière de l'épididyme, ou à la surface des spermatozoïdes parcourant l'épididyme. La GPX5 pourrait participer au maintien de l'intégrité des spermatozoïdes en éliminant les hydroperoxydes. Les souris KO-*Gpx5* ne sont cependant pas stériles ; le défaut de *Gpx5* serait compensé par une augmentation de l'expression épididymaire des *Gpx1*, 3 et 4.



La **GPX6** est une SecGPX chez l'homme mais une CysGPX chez le rongeur. Cette GPX est localisée dans le système olfactif. Peu d'informations sont actuellement disponibles sur cette enzyme.

Les **GPX7** et **GPX8** ont été localisés dans le **réticulum endoplasmique**. Elles pourraient avoir un rôle dans le repliement des protéines. Ce repliement est notamment catalysé par la protéine disulfure isomérase (PDI) oxydée qui peut former des ponts disulfures entre les résidus cystéines des protéines. Les GPX7 et GPX8 peuvent régénérer la PDI oxydée à partir de PDI réduite, en réduisant un hydroperoxyde.

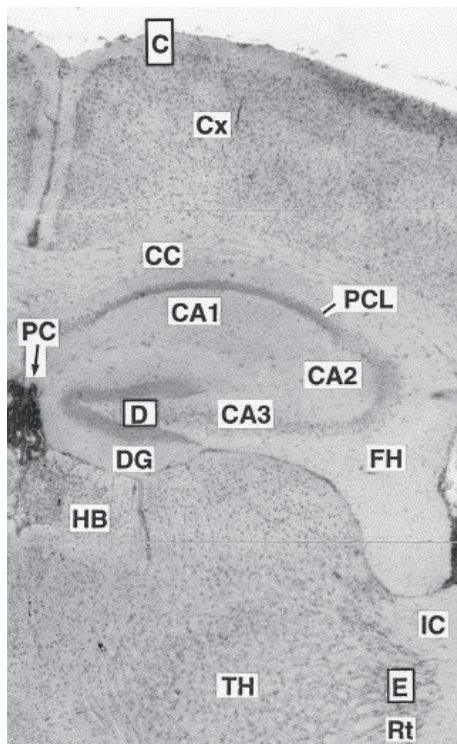
### 3.2.1. Répartition tissulaire et cellulaire, et activité au sein du système nerveux central

Les GPX et la GR participent conjointement à l'élimination des hydroperoxydes. Parmi les isoenzymes de GPX, les **GPX1** et **4** (isoforme cGPX4), ubiquitaires, semblent particulièrement impliquées dans la protection envers le stress oxydant.

Plusieurs études ont reporté l'existence des activités GPX et GR au sein du SNC (J. Chen & Berry, 2003). Ces études n'utilisent cependant pas toutes les mêmes conditions expérimentales (e.g. concentration en substrats oxydant et réducteur, température) ; les valeurs absolues d'activités enzymatiques ne peuvent donc pas être comparées. Néanmoins, ces études montrent que les plexus choroïdes présentent la plus importante activité GPX au sein du SNC.

Chez l'homme adulte, une activité GPX envers l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (cosubstrat : GSH) a été détectée dans l'ensemble des régions cérébrales étudiées, incluant le cortex cérébral et le cervelet ; une activité GPX a également été détectée dans le LCR (Kish et al., 1985; Marttila et al., 1988). L'activité GPX est du même ordre de grandeur dans toutes les structures cérébrales étudiées mais est plus faible dans le LCR (Kish et al., 1985; Marttila et al., 1988). Une activité GR a par ailleurs été mesurée dans l'ensemble de ces structures cérébrales (Marttila et al., 1988). L'isoenzyme GPX1 a été mise en évidence dans les cellules épithéliales choroïdiennes fœtales, dès la 22<sup>ème</sup> semaine de développement embryonnaire (Vasiljevic, 2017).

Chez le rat adulte, l'activité Gpx envers l' $\text{H}_2\text{O}_2$  mesurée dans les plexus choroïdes ( $\sim 350$  à  $450 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de protéines $^{-1}$ ) est environ 10 fois supérieure à celle mesurée dans le cortex cérébral, le cervelet et les capillaires isolés de la BHE (Tayarani et al., 1989). L'activité Gr est en revanche similaire dans ces différents tissus cérébraux ( $\sim 30$  à  $50 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de protéines $^{-1}$ ) (Tayarani et al., 1989). Chez le rat en développement, une étude réalisée sur un homogénat cérébral total décrit une activité enzymatique Gpx globalement stable au cours du développement cérébral, et égale à l'activité mesurée chez l'adulte (Brannan et al., 1981). Une étude immunohistochimique de la localisation de la Gpx1 dans le cerveau de la souris adulte montre un marquage particulièrement intense des plexus choroïdes des ventricules latéraux (*Figure 25*) (Trépanier et al., 1996). Ces résultats sont en concordance avec l'hybridation *in situ* de *Gpx1* réalisées chez la souris adulte (Allen Institute for Brain Sciences, 2018). Une étude réalisée par Kratzer et collaborateurs montre par ailleurs que les ARNm codant pour les isoenzymes *Gpx1* et *4* sont les plus exprimés dans les plexus choroïdes du rat adulte et ont une expression périnatale similaire (Kratzer et al., 2013).



**Figure 25 | Vue générale de la distribution de l'isoenzyme glutathion peroxydase 1 au sein du système nerveux central chez la souris adulte.**

Abréviations : CA1, CA2, CA3, FB, et PCL : hippocampe, CC : corpus callosum, Cx : cortex cérébral, DG : gyrus denté, HB : habenula, PC : plexus choroïdes, Rt : noyau réticulaire thalamique, TH : thalamus.

D'après (Trépanier et al., 1996).

### 3.3. Glutathion transférases

#### 3.3.1. Classes d'isoenzymes et fonctions

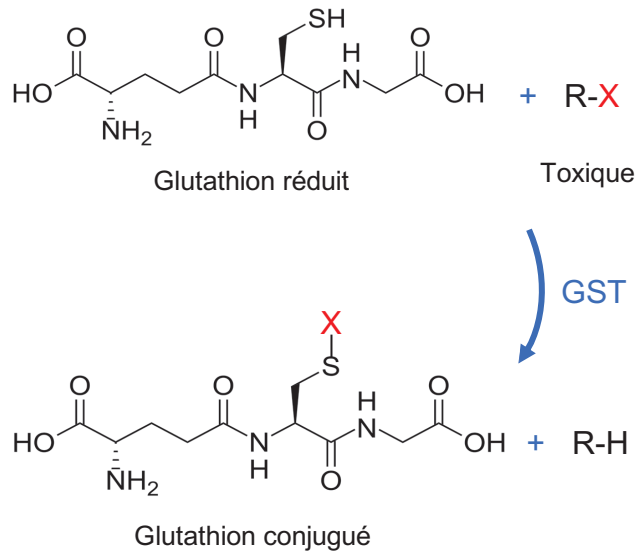
Les GST (EC 2.5.1.18) forment une superfamille multigénique d'isoenzymes, qui doivent leur abréviation à leur ancienne appellation « glutathion-*S*-transférases ». Chez l'homme, trois familles de protéines présentent une activité GST : les GST cytosoliques, les GST mitochondriales et les GST microsomales. Les GST cytosoliques et mitochondriales sont des enzymes solubles qui présentent des similarités dans leurs configurations tridimensionnelles. Les GST microsomales, aussi appelées *membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism* (MAPEG), sont associées aux membranes et ne présentent pas de ressemblance structurelle avec les deux autres familles de GST.

##### 3.3.1.1. Glutathion transférases cytosoliques

La famille des GST cytosoliques est la plus étudiée, elle a aussi le plus grand nombre de représentants. Chez les mammifères, elle est composée de sept classes d'isoenzymes, regroupées en fonction du pourcentage de similarités dans leurs séquences d'acides aminés : Alpha, Mu, Pi, Sigma, Thêta, Zeta, et Omega. Les GST cytosoliques sont des dimères formés par l'association de deux sous-unités. La nomenclature de chaque GST cytosolique fait apparaître sa classe ainsi que les numéros des sous-unités qui la composent : par exemple, la GSTA3-3 est une GST cytosolique de classe Alpha portant deux sous-unités 3 (Mannervik et al., 2005).

Les GST cytosoliques sont localisées dans le cytoplasme de la cellule. Il existe toutefois des exceptions : les sous-unités GSTA1, GSTA2, GSTA4 et GSTP1 ont également été localisées dans la mitochondrie des cellules hépatiques chez l'homme (Gallagher et al., 2006). La migration mitochondriale des GST pourrait permettre de protéger les fonctions mitochondriales en cas de stress oxydant (Gallagher et al., 2006; Raza, 2011). Selon Gallagher et collaborateurs, la GSTA4-4, impliquée dans la détoxification des produits de la peroxydation lipidique (e.g. 4-hydroxynonénal), serait

même uniquement associée à la mitochondrie dans les cellules hépatiques de l'homme ; ces résultats sont cependant discutés (Gardner & Gallagher, 2001; Raza, 2011).



**Figure 26 | Réaction de conjugaison au glutathion catalysée par les glutathion transférases.**

Les glutathion transférases (GST) sont des enzymes de phase II. Elles catalysent l'attaque nucléophile de l'atome de soufre du glutathion réduit sur le groupement électrophile de composés endogènes ou exogènes non polaires (R-X). Le conjugué au glutathion formé (GS-X) est plus polaire, ce qui facilite son élimination.

Les GST cytosoliques peuvent catalyser de nombreuses réactions enzymatiques détaillées dans les revues de John Hayes et de Katholiki Skopelitou (Hayes et al., 2005; Skopelitou et al., 2008). Certaines de ces réactions sont décrites ci-après. La principale fonction des GST est la catalyse de la **conjugaison** du GSH avec un substrat électrophile endogène ou exogène non polaire ; le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) et le MCB sont des substrats communs à la grande majorité des isoenzymes de GST ayant cette activité de conjugaison (*Figure 26*). Certaines GST ont par ailleurs une activité peroxydase : elles peuvent catalyser des réactions de **réduction** de substrats oxydants (e.g. hydroperoxyde de cumène, acide déshydroascorbique (forme oxydée de la vitamine C), acide monométhylarsonique, prostaglandine H<sub>2</sub>). Les GST cytosoliques catalysent aussi l'**isomérisation** de différents composés insaturés (e.g. maleylacétoacétate). Les GST cytosoliques peuvent également se lier de façon covalente ou non à des ligands hydrophobes non-substrats (e.g. bilirubine, hormones thyroïdiennes, corticostéroïdes) (Litwack et al., 1971). Cette propriété, qui leur a initialement valu le nom de **ligandines**, pourrait permettre le transport intracellulaire et la séquestration de molécules endogènes et exogènes (Hayes et al., 2005; Litwack et al., 1971).

Tableau 6 | Exemples de substrats des différentes familles de glutathion transférases.

Enzyme			Exemples de substrats ou de réaction
Famille	Classe	Nom	
Cytosolique	Alpha	GSTA1-1	BCDE, BPDE, DBADE, DBPDE, BPhDE, N-a-PhIP, $\Delta^5$ -ADD, busulfan, chlorambucil
		GSTA2-2	DBPDE, CuOOH, 7-chloro-4-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole
		GSTA3-3	DBPDE, $\Delta^5$ -ADD, $\Delta^5$ -pregnène-3,20-dione
		GSTA4-4	COMC-6, 4-hydroxynonénal, 4-hydroxydécénal, AE
		GSTA5-5	/
	Mu	GSTM1-1	BPDE, CDE, DBADE, styrène-7,8-oxyde, trans-stilbène oxyde
		GSTM2-2	1,2-dichloro-4-nitrobenzène, COMC-6, aminochrome, dopa o-quinone, PGH <sub>2</sub> → PGE <sub>2</sub>
		GSTM3-3	PGH <sub>2</sub> → PGE <sub>2</sub> , BCNU
		GSTM4-4	CDNB
		GSTM5-5	(CDNB)
	Pi	GSTP1-1	BPDE, CDE, acroléine, COMC-6, base propenals, chlorambucil, AE, thiotepa, cisplatine
	Sigma	GSTS1-1 (PGDS)	PGH <sub>2</sub> → PGD <sub>2</sub>
	Theta	GSTT1-1	butadiène époxyde, oxyde d'éthylène, CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , EPNP
		GSTT2-2	CuOOH
	Zeta	GSTZ1-1	malelyacétoacétate, dichloroacétate, fluoroacétate,
	Omega	GSTO1-1	acide monométhylarsénieux, acide déshydroascorbique
		GSTO2-2	acide déshydroascorbique
Mitochondriale	Kappa	GSTK1-1	CDNB, CuOOH, acide (S)-15-hydroperoxy-5,8,11,13-eicosatétraénoïque
MAPEG	I	MGST2	CDNB, LTA <sub>4</sub> → LTC <sub>4</sub> , acide (S)-5-hydroperoxy-8,11,14-cis-6-trans-eicosatétraénoïque
		FLAP	Fixation non-enzymatique à l'acide arachidonique
		LTC <sub>4</sub> S	LTA <sub>4</sub> → LTC <sub>4</sub>
	II	MGST3	CDNB, LTA <sub>4</sub> → LTC <sub>4</sub> , acide (S)-5-hydroperoxy-8,11,14-cis-6-trans-eicosatétraénoïque
	IV	MGST1 PGES1	hexachlorobutadiène, CDNB, CuOOH PGH <sub>2</sub> → PGE <sub>2</sub>

Les couleurs correspondent aux catégories de substrats : polluants environnementaux, cancérigènes et produits de synthèse chimique (*rouges*) ; produits d'oxydation endogènes (*violet*) ; médicaments (*verts*) ; composés biologiques endogènes (*bleus*) ; autres (*noirs*). Abréviations :  $\Delta^5$ -ADD :  $\Delta^5$ -androstène-3,17-dione, AE : acide éthacrynique, BCDE : benzo[g]chrysène diol époxyde, BCNU : 1,3-bis(2-chloroéthyl)-1-nitrosurée, BPDE : benzo[a]pyrène diol époxyde, BPhDE : benzo[c]phenanthrène diol époxyde, CDE : chrysène-1,2-diol 3,4-époxyde, COMC-6 : crotonyloxyméthyl-2-cyclohexénone, CuOOH : cumène hydroperoxyde, DBADE : dibenz[a,h]anthracène diol époxyde, DBPDE : dibenzo[a,l]pyrène diol époxyde, EPNP : 1,2-époxy-3-(p-nitrophénoxy)propane, N-a-PhIP : N-acétoxy-2-amino-1-méthyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. Modifié d'après (Hayes et al., 2005).

### 3.3.1.2. Glutathion transférases mitochondriales

La famille des GST mitochondriales n'est composée que d'une seule classe d'enzymes, les GST Kappa. La classe des GST Kappa ne comporte elle-même qu'une seule enzyme chez l'homme, le rat et la souris : la GSTK1-1.

La GSTK1-1 est localisée dans les mitochondries ; elle a également été détectée dans les peroxysomes sur la lignée de cellules humaines d'hépatoblastome HepG2 (Morel et al., 2004).

À l'instar des GST cytosoliques, la GSTK1-1 a une activité de **conjugaison** et une activité **peroxydase**. Cette enzyme présente des homologies structurales avec la 2-hydroxychromène-2-carboxylate isomérase et donc pourrait avoir également une activité d'isomérisation (Hayes et al., 2005).

### 3.3.1.3. MAPEG

Chez l'homme, six enzymes de la famille des MAPEG ont été identifiées et réparties en 3 classes : I, II et IV. Les MAPEG ont des activités **peroxydase** et de **conjugaison**. Elles sont particulièrement impliquées dans le métabolisme endogène d'intermédiaires lipophiles réactifs comme les leucotriènes et les prostaglandines (Jakobsson et al., 2008).

## 3.3.2. Répartition tissulaire et cellulaire, et activité au sein du système nerveux central

La famille des GST cytosoliques, et en particulier les classes **Alpha**, **Mu** et **Pi**, sont les plus impliquées dans la protection envers les stress toxiques : ces enzymes sont capables de prendre en charge des médicaments, des pesticides, des herbicides, des polluants environnementaux et des carcinogènes (*Tableau 6*) (Gherssi-Egea et al., 2006; Hayes et al., 2005; Higgins & Hayes, 2011). Plusieurs études ont reporté l'expression de ces GST cytosoliques au sein du SNC. La distribution de ces enzymes est très hétérogène ; elle est fonction de l'isoenzyme de GST étudiée, du type cellulaire, du stade de développement et de l'espèce.

Chez l'homme, une activité GST envers le CDNB a été mesurée dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux et du 4<sup>ème</sup> ventricule de l'adulte comme du fœtus ; l'activité GST choroïdienne est bien supérieure à celle mesurée dans le cortex cérébral (Gherzi-Egea et al., 2006). Une analyse Western-blot associée à une étude immunohistochimique a permis de localiser la GSTP1-1 dans les cellules neuroépithéliales/épendymaires tapissant les ventricules cérébraux, dans les cellules épithéliales choroïdiennes (marquage intense mais non uniforme) et dans les cellules de la pie-mère au stade fœtal (12 à 22 semaines de gestation) et chez l'adulte (Carder et al., 1990). Cette étude n'a par ailleurs pas détecté de GSTA1-1 dans les échantillons fœtaux, et décrit un marquage non uniforme dans les cellules épithéliales choroïdiennes et épendymaires des échantillons adultes (Carder et al., 1990).

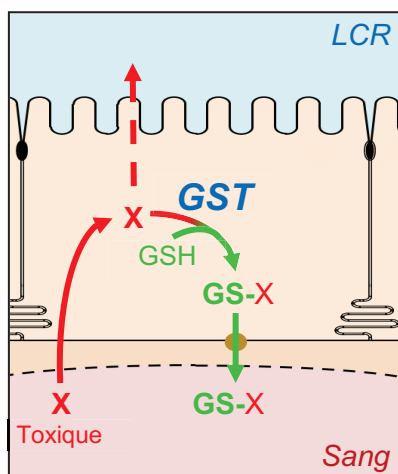
Chez le rat, d'importantes activités Gst (envers le CDNB) ont été mesurées dans les plexus choroïdes de l'adulte comme du nouveau-né (Gherzi-Egea et al., 2006; Strazielle & Gherzi-Egea, 1999). Les Gst sont en effet exprimées de façon importante dans les cellules épithéliales choroïdiennes et les cellules neuroépithéliales dès le 16<sup>ème</sup> et le 18<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire, respectivement (immunohistochimie) (Senjo et al., 1986). Cette étude décrit par ailleurs une apparition plus tardive (2<sup>ème</sup> jour postnatal) et moins importante des Gst dans le cortex cérébral (Senjo et al., 1986). Plusieurs isoenzymes de Gst Alpha, Mu et Pi (seules ou en association) ont été mises en évidence par immunohistochimie, avec différents niveaux d'expression, dans différentes cellules du SNC : neurones, astrocytes et oligodendrocytes, cellules endothéliales, cellules épithéliales des plexus choroïdes, cellules épendymaires tapissant les ventricules cérébraux et cellules piales (Cammer et al., 1989; Johnson et al., 1993; Senjo et al., 1986). Il est à noter que les marquages Gst Alpha et Pi observés dans les cellules épithéliales des plexus choroïdes de rat adulte sont particulièrement intenses (Cammer et al., 1989; Johnson et al., 1993). Enfin, une étude transcriptomique, réalisée par Kratzer et collaborateurs, montre que les *Gsta3*, *a4*, *m1*, *m5* et *p1* sont les plus exprimées dans les plexus choroïdes de rats adultes (Kratzer et al., 2013). Il est intéressant de noter que les *Gst m1*, *m5* et *p1* sont plus exprimées au cours du développement périnatal que chez l'adulte (Kratzer et al., 2013).



### 3.3.3. Rôle des glutathion transférases choroïdiennes dans la formation d'une barrière métabolique

Les isoenzymes GST Alpha, Mu et Pi présentes dans les plexus choroïdes sont majoritairement impliquées dans les réactions de détoxification (*Tableau 6*) (Gherssi-Egea et al., 2006; Hayes et al., 2005; Higgins & Hayes, 2011). Ces enzymes peuvent catalyser la conjugaison du GSH avec des substrats électrophiles non polaires (*Figure 26*).

Une étude réalisée sur un modèle *in vitro* bicaméral de l'interface sang-LCR choroïdienne de rat a montré que les Gst limitent le passage du CDNB, molécule modèle substrat des GST, du sang au LCR. Le conjugué au GSH produit est ensuite majoritairement excrété au pôle sanguin par des transporteurs de type Abcc (Mrp) ou Slc1a5 (*Figure 27*) (Gherssi-Egea et al., 2006). Cette étude, réalisée uniquement *in vitro*, suggère que les cellules épithéliales choroïdiennes forment une barrière enzymatique entre le sang et le LCR.



**Figure 27 | Modèle schématique de la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne dépendante des glutathion transférases.**

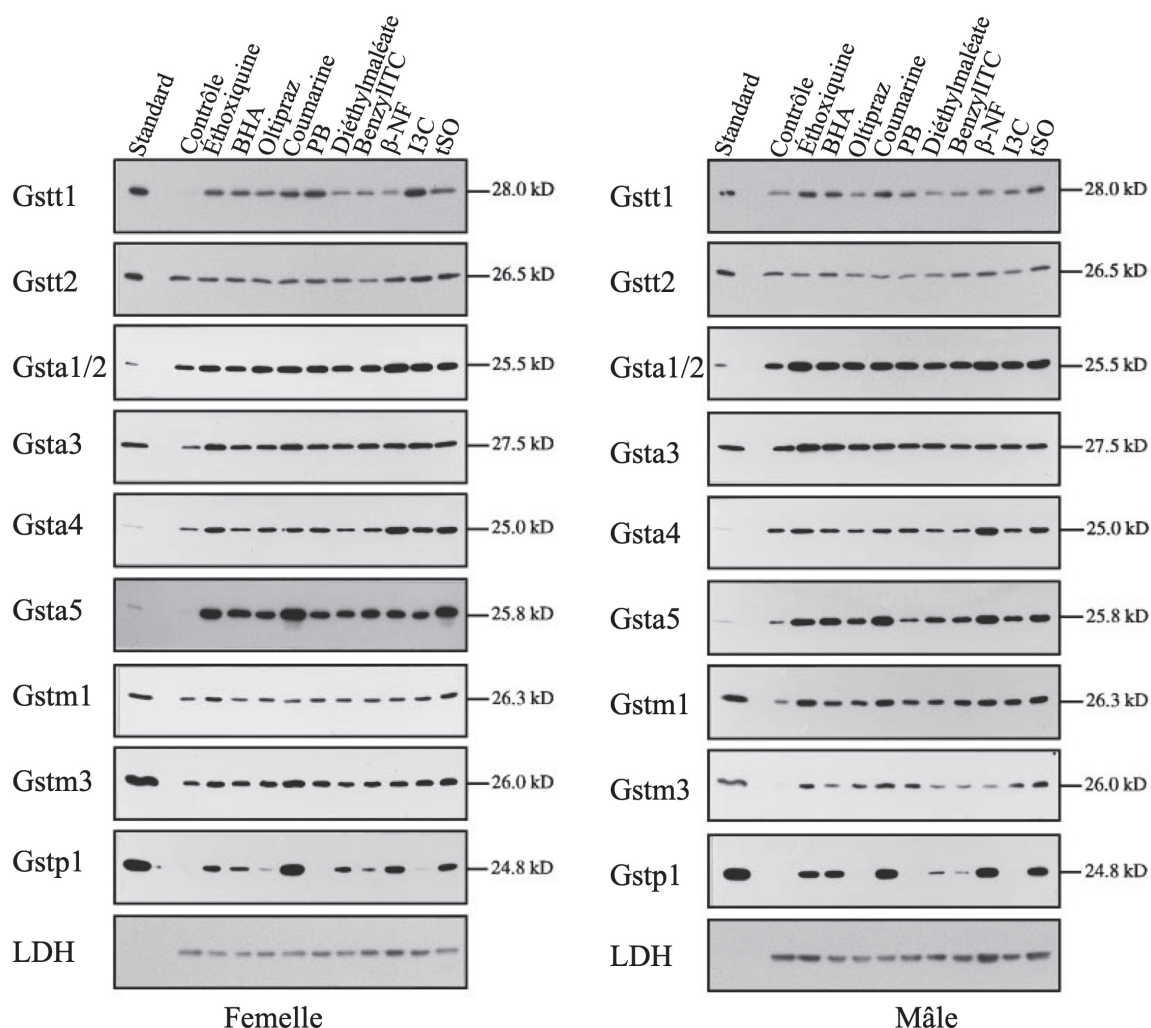
Abréviations : GSH : glutathion réduit, GST : glutathion transférase, LCR : liquide céphalorachidien, X : composé toxique substrat des GST choroïdiennes.

Modifié d'après (Gherssi-Egea et al., 2006).

### 3.3.4. Induction des glutathion transférases de classes Alpha, Mu et Pi

De nombreuses études menées chez le rat et la souris ont montré que l'activité Gst pouvaient être induites de façon importante par des xénobiotiques variés, incluant des médicaments (e.g. phénobarbital, acides fumariques, oltipraz, rifampicine), des polluants environnementaux (e.g. benzo[*a*]pyrène, 3-méthylcholanthrène), des agents de conservation (e.g. éthoxyquine) et des extraits végétaux (e.g. sulforaphane, coumarine, indole-3-carbinol) (Higgins & Hayes, 2011).





**Figure 28 | Effet de différents xénobiotiques sur l'expression protéique des sous-unités de glutathion transférases chez le rat.**

L'expression protéique des différentes sous-unités de glutathion transférase (Gst) a été étudiée par Western-blot sur des échantillons de foie prélevés sur des rats adultes femelles ou mâles traités ou non avec les xénobiotiques suivants : éthoxyquine (0,5 %, 14 j), hydroxyanisole butylée (BHA ; 0,75 %, 14j), oltipraz (0,075 %, 14j), coumarine (0,5 %, 14j), phénobarbital (PB ; 0,1 %, 7j), diéthylmaléate (0,5 %, 14 j), benzylisothiocyanate (benzylITC ; 0,5 %, 14 j),  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ -NF, 200 mg·kg<sup>-1</sup>, 7 j), indole-3-carbinol (I3C ; 0,5 %, 14j), *trans*-stilbène oxyde (tSO ; 400 mg·kg<sup>-1</sup>, 7 j). Les animaux contrôles n'ont pas été traités. Les échantillons standard ont été préparés à partir de bactéries exprimant des GSTT humaines, ou à partir de Gst purifiées à partir d'échantillons de rate de rat. La lactate deshydrogénase (LDH) est utilisée comme marqueur de dépôt.

D'après (Sherratt et al., 1998).

Le niveau d'induction de l'activité Gst varie en fonction de l'inducteur utilisé, de l'organe étudié, du substrat Gst utilisé pour mesurer l'activité enzymatique, et du genre (Deng et al., 2018; Sherratt et al., 1998). En effet, ces composés n'induisent pas l'expression de l'ensemble des isoenzymes de Gst, mais chaque composé induit l'expression de certaines isoenzymes, qui sont plus ou moins exprimées en fonction de l'organe étudié. Par exemple, l'administration d'indole-3-carbinol chez le rat augmente l'expression protéique hépatique des sous-unités Gstp1 et t1 de 1,6 et 6,2 fois respectivement, alors que la coumarine augmente leurs expressions de 26,0 et 4,7 fois respectivement (*Figure 28*) (Sherratt et al., 1998). Ces résultats suggèrent qu'il existe plusieurs mécanismes moléculaires permettant l'induction des différentes isoenzymes GST.

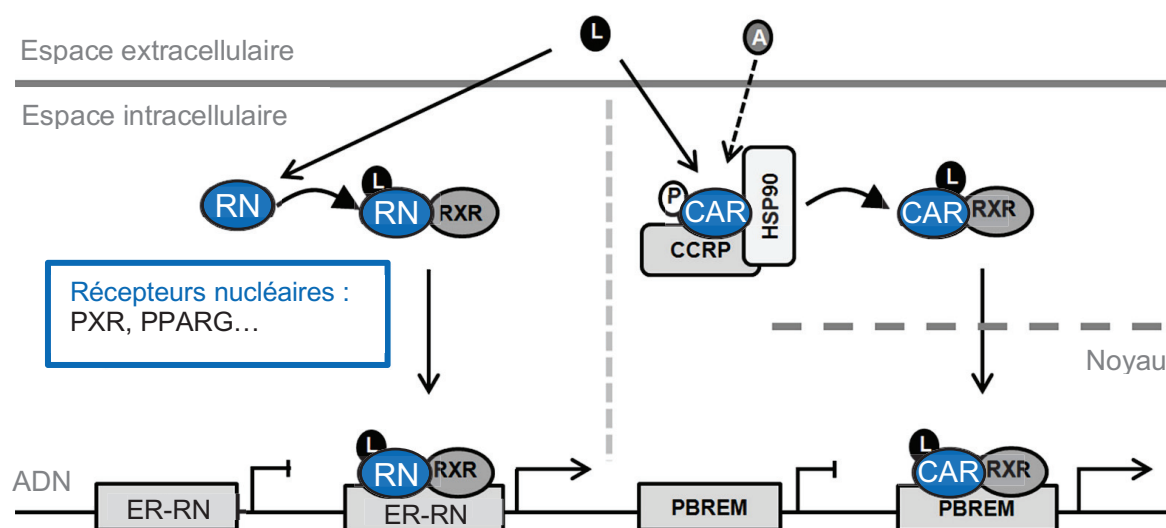
Les mécanismes d'induction des GST ont été étudiés en détail par Larry Higgins et John Hayes ; plusieurs voies d'induction ont en effet été identifiées (Higgins & Hayes, 2011). Les voies d'induction permettant d'augmenter l'expression des isoenzymes de GST impliquées dans la détoxification des xénobiotiques (classes Alpha, Mu et Pi) sont présentées ci-après.

### ***Superfamille des récepteurs nucléaires (nuclear receptor, NR)***

L'activation des récepteurs nucléaires *constitutive androstane receptor* (CAR, NR1I3), *pregnane X receptor* (PXR, NR1I2) et/ou *peroxisome proliferator activated receptor-γ* (PPARG, PPARγ, NR1C3) peut induire l'expression des isoenzymes GST possédant un élément de réponse spécifique sur le promoteur de leur gène. Le mécanisme d'action de ces récepteurs nucléaires est présenté dans la *Figure 29*.

Tout d'abord, les souris traitées avec du 1,4-bis[2-(3,5-dichloropyridyl-oxy)]benzène prégénolone 16α-carbonitrile (TCPOBOP), activateur spécifique de la voie CAR, montrent une induction significative de l'expression transcriptomique des *Gsta1*, *m1*, et *m2* dans le foie et l'intestin grêle qui est annulée chez les souris KO-Car (Maglich et al., 2002). Le phénobarbital, connu pour être un activateur CAR, est capable d'induire l'activité Gst hépatique envers le CDNB et l'expression protéique des sous-unités de *Gsta1/2*, *a4*, *a5*, *m1/2* et *m3* chez le rat (Sherratt et al., 1998); l'implication de

Car dans ces phénomènes d'induction médiés par le phénobarbital n'a pas encore été formellement démontrée. L'expression transcriptomique du récepteur nucléaire *Car* dans les plexus choroïdes du rat est plus faible au cours du développement périnatal que chez l'adulte (Kratzer et al., 2013).



**Figure 29 | Mécanisme d'induction des récepteurs nucléaires *constitutive androstane receptor*, *pregnane X receptor* et *peroxisome proliferator activated receptor-γ*.**

Les récepteurs nucléaires (RN) forment une vaste superfamille de récepteurs biochimiques. Lorsqu'un ligand (L) se fixe au récepteur nucléaire *constitutive androstane receptor* (CAR), *pregnane X receptor* (PXR) ou *peroxisome proliferator activated receptor-γ* (PPARG), le récepteur nucléaire se dimérise avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR). Le complexe formé se fixe ensuite à un élément de réponse spécifique (ER-RN) localisé au niveau de séquences promotrices ou amplificatrices d'un gène cible du récepteur nucléaire. Des protéines co-activatrices sont recrutées puis la transcription du gène cible est initiée.

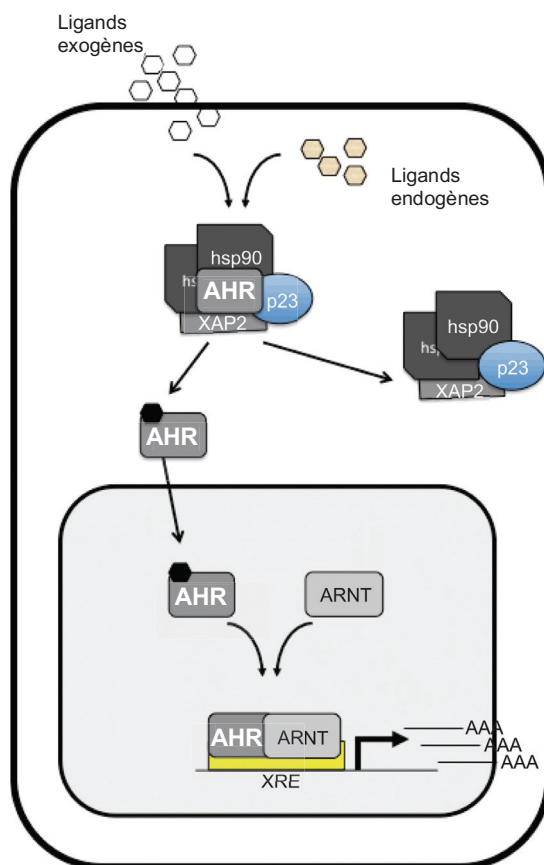
Lorsqu'il n'est pas activé, le récepteur CAR est localisé dans le cytoplasme où il est lié à un complexe protéique. La fixation d'un ligand ou d'un activateur de CAR induit une déphosphorylation qui libère le récepteur CAR du complexe protéique et permet sa migration nucléaire.

D'après (Benjamin Kandel, 2014).

Ensuite, les souris traitées avec du prégnénolone 16 $\alpha$ -carbonitrile, activateur spécifique de PXR, montrent une induction de l'expression transcriptomique des *Gsta1*, *m1* et *m2* qui est annulée chez les souris KO-*Pxr* (Maglich et al., 2002). L'expression transcriptomique du récepteur nucléaire *Pxr* dans les plexus choroïdes du rat est deux fois plus faible au cours du développement périnatal que chez l'adulte (Kratzer et al., 2013).

Enfin, la 15-deoxy- $\delta$ (12, 14)-prostaglandine J2 et les thiazolidinediones, molécules agonistes du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$ , sont capables d'induire l'expression et l'activité des *Gst* *in vitro* (hépatocytes) et *in vivo* (rein) chez la souris (Jesse et al., 2014; Park et al., 2004).

### Récepteur aux aryls hydrocarbonés



**Figure 30 | Mécanisme d'induction du récepteur aux aryl hydrocarbonés.**

Lorsqu'il n'est pas activé, le récepteur aux aryl hydrocarbonés (AHR) est localisé dans le cytoplasme où il est lié à un complexe protéique. La fixation d'un ligand endogène ou exogènes à AHR le libère du complexe protéique et permet sa migration nucléaire. Le récepteur se dimérise avec le *AHR nuclear translocator* (ARNT) et l'ensemble se fixe à un élément de réponse spécifique (*xenobiotic responsive element*, XRE) localisé au niveau de séquences promotrices ou amplificatrices d'un gène cible du récepteur nucléaire AHR. La transcription du gène cible est initiée.

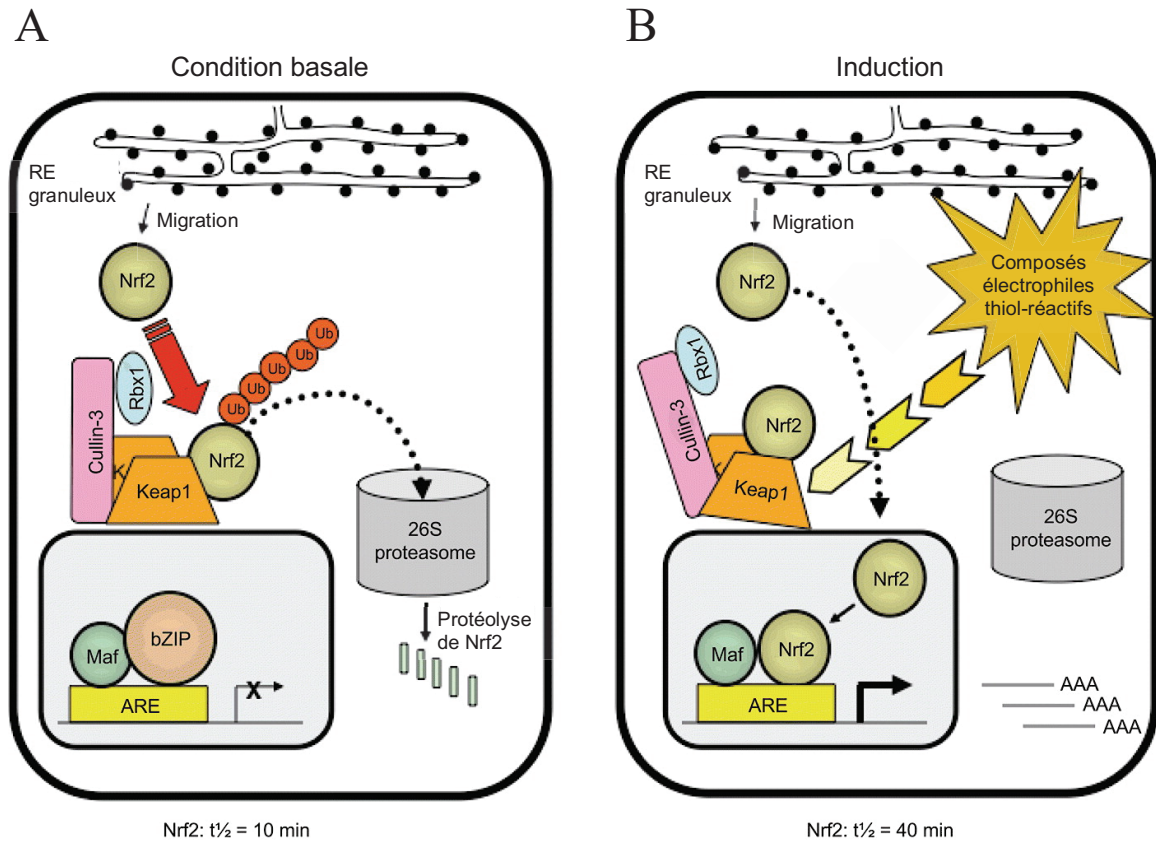
D'après (Higgins & Hayes, 2011).

Le récepteur aux aryl hydrocarbonés (*aryl hydrocarbore receptor*, AHR) est également capable d'induire l'expression des isoenzymes GST en association avec le *AHR nuclear translocator* (ARNT). Le récepteur AHR peut être activé par un large panel

de composés aromatiques plans exogènes (e.g. 3-méthylcholanthrène,  $\beta$ -naphthoflavone) ou endogènes (e.g. dérivés du tryptophane). Le récepteur AHR peut induire la transcription des gènes possédant une séquence *xenobiotic response element* (XRE) (Figure 30). Cette séquence XRE consensus est présente sur les gènes codant les *GSTA2*, *A3* et *A5* chez l'homme ; *Gsta1* et *a2* chez le rat ; *Gsta2*, *a4*, *m2* et *p1* chez la souris (Higgins & Hayes, 2011). McLellan et collaborateurs ont montré que l'expression protéique hépatique de plusieurs isoenzymes Gst de classe Alpha et Pi était induite par le  $\beta$ -naphthoflavone chez les souris C57BL/6 mais n'était pas induite (ou faiblement) chez les souris DBA/2 ayant un récepteur Ahr dysfonctionnel (McLellan et al., 1991). L'expression transcriptomique du récepteur *Ahr* et de l'*Arnt* dans les plexus choroïdes du rat est plus élevée au cours du développement périnatal que chez l'adulte (Kratzer et al., 2013).

### Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2

Enfin, le facteur de transcription NRF2 peut induire l'activité GST. La voie NRF2 peut être activée par des composés faiblement électrophiles, y compris des composés issus de l'alimentation (e.g. sulforaphane, curcumine) et des médicaments (e.g. fumarates). Cette voie permet d'induire la transcription des gènes possédant une séquence *antioxydant response element* (ARE) (Figure 31). L'analyse réalisée par Higgins et Hayes a mis en évidence cette séquence ARE dans les séquences promotrices ou amplificatrices des gènes *GSTA1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A5*, *M1*, *M2*, et *P1* chez l'homme ; *Gsta1*, *a2*, *a3*, *a4*, *a5*, *m1*, *m2*, et *p1* chez le rat ; *Gsta1*, *a2*, *a3*, *a4*, *m1*, *m2*, *p1* et *p2* chez la souris (Higgins & Hayes, 2011). Hayes et collaborateurs ont montré que l'éthoxiquine (utilisée comme conservateur alimentaire) pouvait induire l'expression hépatique des sous-unités Gstm1, m5 et p1/2 chez la souris, mais que cette induction était inhibée chez les souris déficientes en *Nrf2* (Hayes et al., 2000). Les niveaux basaux d'expression hépatique de plusieurs sous-unités des isoenzymes de Gst des classes Alpha, Mu et Pi sont par ailleurs diminués chez les souris déficientes en *Nrf2*, ce qui suggère l'implication du facteur NRF2 dans l'expression basale des GST (Hayes et al., 2000). L'expression transcriptomique de *Nrf2* dans les plexus choroïdes du rat au cours du développement périnatal est similaire à celle mesurée chez l'adulte (Kratzer et al., 2013).



**Figure 31 | Mécanisme d'induction du Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2.**

**A.** En condition basale, le Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2 (Nrf2) est complexé avec un ensemble protéique comprenant la protéine *Kealch-like ECH-associated protein 1* (Keap1). Ce complexe protéique est ubiquitinylé ce qui induit sa dégradation dans le protéasome. La demi-vie de Nrf2 est de 10 min dans ces conditions.

**B.** En condition de stress oxydant, la protéine Keap1 change de configuration ce qui libère le facteur Nrf2. Nrf2 s'accumule ensuite dans le noyau, se dimérise avec des protéines Maf et active la transcription de gènes cibles porteurs de la séquence *antioxidant response element* (ARE). La demi-vie de Nrf2 est de 40 min dans ces conditions.

D'après (Higgins & Hayes, 2011).



## OBJECTIFS DE THESE

---





Pour se développer et grandir, le cerveau doit être dans un environnement stable et parfaitement maîtrisé. L'exposition du cerveau en développement à des molécules toxiques ou à des stimuli inflammatoires ou hypoxiques peut provoquer des séquelles neurologiques importantes durables. Plusieurs interfaces sang-cerveau régulent les échanges entre le sang et le SNC, et contrôlent ainsi la composition de l'environnement cérébral. Au cours du développement, la barrière sang-LCR choroïdienne semble avoir un rôle prépondérant : les plexus choroïdes se développent en effet précocement, alors même que le cerveau n'est encore que faiblement vascularisé (Dziegielewska et al., 2001). Chez l'adulte, les plexus choroïdes présentent une remarquable machinerie enzymatique liée au GSH qui pourrait avoir un rôle prépondérant dans la protection cérébrale envers les stress oxydants et toxiques. Les caractéristiques précises de la barrière sang-LCR choroïdienne au cours du développement postnatal sont encore mal connues. Notre travail de thèse s'inscrit dans la compréhension des mécanismes neuroprotection liés au GSH présents au niveau de la barrière sang-LCR choroïdienne au cours du développement périnatal.

Le premier objectif de ce travail a été d'identifier les enzymes de détoxification et les enzymes antioxydantes siégeant au sein des plexus choroïdes au stade périnatal et participant efficacement à la neuroprotection. Dans un premier temps, les taux d'expression et l'activité du système enzymatique antioxydant Gpx / Gr ont été mesurés dans les plexus choroïdes du rat en développement. La capacité des Gpx choroïdiennes à détoxifier les composés oxydants endogènes présents dans le LCR ou provenant du sang a ensuite été évaluée. Dans un second temps, les taux d'expression et l'activité des GST choroïdiennes au cours du développement postnatal ont été mesurés chez le rat. La capacité des GST à former une barrière enzymatique entre le sang et le LCR pour des composés toxiques substrats de ces enzymes a ensuite été évaluée.

Le second objectif de ce travail a été d'identifier des voies d'induction capables de renforcer les capacités de protection de l'épithélium choroïdien envers les molécules toxiques. La capacité de plusieurs molécules pharmacologiques à induire les activités Gst choroïdiennes au cours du développement postnatal chez le rat a été testée. L'efficacité

## Objectifs de thèse

de ces stratégies pharmacologiques pour renforcer la barrière enzymatique entre le sang et le LCR a été évaluée.

## MATERIELS & METHODES

---



Cette section décrit les matériels et méthodes se rapportant à ce travail de thèse de façon succincte lorsqu'ils correspondent à des résultats publiés (Kratzer et al., 2018; Saudrais et al., 2018), et de façon plus détaillée lorsqu'ils correspondent à des résultats non publiés.

## 1. Expérimentations *in vivo*

### 1.1. Éthique

Le soin des animaux et les expérimentations ont été réalisés selon les directives approuvées par le droit français (décret n°87-848 du 19 octobre 1987) et la communauté européenne (directive 86-609-EEC du Conseil du 24 novembre 1986). Les protocoles d'expérimentation animale utilisés au cours de ce travail ont été approuvés par le Comité d'éthique CEEA-55 et le Ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation.

### 1.2. Animaux

Tous les animaux ont été hébergés dans les mêmes conditions à l'animalerie ALECS (statut sanitaire conventionnel), sous environnement contrôlé (cycle jour/nuit de 12/12 h, température 22 °C). Les animaux ont été hébergés dans des cages standard avec un accès libre à la nourriture et à l'eau, et un enrichissement adapté (papier, carton, abri).

#### 1.2.1. Rats Sprague Dawley commerciaux

Les rats Sprague Dawley (RjHan:SD, statut sanitaire EOPS) mâles et les femelles avec leurs portées ont été fournis par Janvier.

Afin d'étudier les mécanismes d'induction des enzymes choroïdiennes dépendantes du GSH, des rats Sprague Dawley commerciaux ont été traités avec différentes molécules pharmacologiques : le sulforaphane (SF), le diméthylfumarate (DMF) et le diallyl sulfide (DAS). Dans chaque expérimentation, les animaux traités avec une molécule

pharmacologique ont été comparés avec des animaux contrôles issus de la même portée afin de limiter les variations interindividuelles.

Le SF (S6317, Sigma-Aldrich) a été administré par voie intrapéritonéale chez des rats de deux jours postnatal (P2) préalablement anesthésiés (isoflurane 5 %) pour éviter le phénomène de reflux. Les animaux ont été traités avec le SF, préparé dans un mélange diméthylsulfoxyde/NaCl 0,9 % (3/7), avec une dose unique de  $5,6 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1}$ . Les animaux contrôles ont été traités avec le véhicule. Afin d'évaluer l'effet du SF sur les enzymes de la barrière sang-LCR choroïdienne, les animaux ont été sacrifiés à trois jours postnatal (P3), 18h après l'injection.

Le DMF (242926, Sigma-Aldrich) a été administré par voie intrapéritonéale chez des rats P2 préalablement anesthésiés (isoflurane 5 %) pour éviter le phénomène de reflux. Les animaux ont été traités avec le DMF, préparé dans un mélange EtOH absolu/NaCl 0,9 % (1/9), avec une dose unique de  $0,35 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ . Les animaux contrôles ont été traités avec le véhicule. Afin d'évaluer l'effet du DMF sur le facteur nucléaire Nrf2 et sur les enzymes de la barrière sang-LCR choroïdienne, les animaux ont été sacrifiés 1h30 (P2) ou 18h (P3) après l'injection respectivement.

Le DAS (A35801, Sigma-Aldrich) a été administré par voie intrapéritonéale. Les animaux ont été traités avec le DAS non dilué à une dose journalière de  $1,75 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$  pendant 4 jours (P1 à P4), selon une adaptation du protocole décrit par Cui et collaborateurs (Cui et al., 2009). Afin d'évaluer l'effet du DAS sur les enzymes de la barrière sang-LCR choroïdienne, les animaux ont été sacrifiés 18h (P5) après la dernière injection.

### 1.2.2. Rats Sprague Dawley *Nrf2*<sup>-/-</sup>

Les rats SD-Nfe2l2<sup>em1Mcowi</sup> (*Nrf2*<sup>-/-</sup>, statut sanitaire EOPS) ont été fournis par l'animalerie du *Medical college of Wisconsin*. Cette lignée de rats transgéniques a été développée par l'équipe de Julian Lombard et décrite pour la première fois en 2016 (Priestley et al., 2016). Ces rats, de souche Sprague Dawley (CrI:SD), ont été génétiquement invalidés pour le gène codant le facteur de transcription *Nrf2* à l'aide de

la technologie TALEN (*Transcription activator-like effector nuclease*). Les rats *Nrf2*<sup>-/-</sup> générés présentent une délétion de 41 pb dans le gène codant pour le facteur de transcription *Nrf2* visualisée par PCR (rein et foie), associée à une disparition de la protéine Nrf2 attestée par immunohistofluorescence (rein) (Priestley et al., 2016). À ce jour, aucune autre équipe de recherche n'a publié de résultats sur ces animaux.

Le maintien de la lignée *Nrf2*<sup>-/-</sup> est effectué par croisement *Nrf2*<sup>+/-</sup> x *Nrf2*<sup>+/-</sup>. Afin d'éviter la dérive génétique de la lignée, des animaux Sprague Dawley (RjHan:SD) sont intégrés à la colonie toutes les cinq générations. Le génotype des animaux de la colonie est testé par PCR.

Les animaux *Nrf2*<sup>+/+</sup>, *Nrf2*<sup>-/-</sup> et *Nrf2*<sup>+/-</sup> utilisés pour les expérimentations ont respectivement été générés par croisement *Nrf2*<sup>+/+</sup> x *Nrf2*<sup>+/+</sup>, *Nrf2*<sup>-/-</sup> x *Nrf2*<sup>-/-</sup>, et *Nrf2*<sup>+/+</sup> x *Nrf2*<sup>-/-</sup>. Ces croisements permettent de générer des portées de génotype homogène, ce qui facilite les expérimentations. Par ailleurs, la production exclusive d'animaux de génotype d'intérêt répond au principe de réduction (Russel & Burch, 1959).

### 1.2.3. Rats Sprague Dawley présentant une réduction de la quantité en glutathion choroïdien réduit

Des rats Sprague Dawley (RjHan:SD, statut sanitaire EOPS) P2 ont été traité avec du DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO; B2640, Sigma-Aldrich). Le BSO inhibe irréversiblement et rapidement la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase ce qui entraîne une réduction fonctionnelle en GSH (Rae & Williams, 2017). Ce traitement intrapéritonéal réduit de 92 % la quantité de GSH dans les cellules de la barrière sang-LCR choroïdienne, contre 60 % dans les autres structures cérébrales. Ce modèle animal a été caractérisé au cours de cette étude (*Figure 47*).



### 1.3. Prélèvements

#### 1.3.1. Tissus

Les animaux ont été sacrifiés par décapitation après anesthésie gazeuse profonde à l'isoflurane 5 %.

##### ***Pour analyses Western-blot, dosages enzymatiques et études ex-vivo***

Les cerveaux ont été extraits de la boîte crânienne. Les plexus choroïdes des ventricules latéraux et du 4<sup>ème</sup> ventricule ont été immédiatement prélevés (intacts) par microdissection dans du tampon *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS ; analyses Western-blot et dosages enzymatiques) ou Ringer-HEPES (RH ; études *ex vivo*) sous loupe binoculaire à 4°C. Les deux types de plexus choroïdes ont été gardés séparément. En fonction de l'âge des animaux, les plexus choroïdes de plusieurs animaux ont été regroupés (analyses Western-blot et dosages enzymatiques). Selon l'expérimentation, des échantillons de cortex cérébral (nettoyé des méninges apparentes) et de foie ont également été prélevés. Les échantillons ont été conservés à -80°C (analyses Western-blot et dosages enzymatiques) ou utilisés immédiatement (études *ex vivo*).

##### ***Pour immunohistofluorescence***

Les cerveaux ont été extraits de la boîte crânienne, rapidement congelés dans de l'isopentane à -40°C puis conservés à -80°C.

#### 1.3.2. Liquide céphalorachidien

Le LCR a été prélevé sur animal en état de mort cérébrale à cœur battant. Afin de mettre en évidence la *cisterna magna*, la peau située entre l'arrière du crâne et la base du cou a été excisée et les tissus musculaires ont été rapidement enlevés. Le LCR est prélevé par ponction dans la *cisterna magna* à l'aide d'un capillaire de verre étiré (diamètre externe ~ 500 µm). Cette technique permet de prélever 4 à 10 µL de LCR sur des rats P2 à P3.

#### 1.4. Mesures de perméabilité sang – liquide céphalorachidien

La perméabilité sang-LCR au CDNB a été évaluée *in vivo* sur des rats P3 sains ou présentant une réduction fonctionnelle en GSH choroïdien (cf § Matériels & Méthodes 1.2.3). Les animaux ont été placés en état de mort cérébrale à cœur battant par une injection intrapéritonéale de pentobarbital, puis perfusés en intracardiaque avec un tampon physiologique (128 mM NaCl, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4,2 mM KCl, 2,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,9 mM MgSO<sub>4</sub>, et 9 mM D-glucose) pendant 2 min (0,67 mL·min<sup>-1</sup>) afin d'éliminer le sang présent dans le système vasculaire. Ensuite, les animaux ont été perfusés avec le même tampon additionné de CDNB à différentes concentrations. Après 5 min, le liquide de perfusion a été prélevé à la sortie de l'oreillette cardiaque droite et le LCR a été prélevé par ponction dans la *cisterna magna* (cf Matériels et Méthodes §1.3.2) afin de doser le CDNB par chromatographie liquide à haute performance (CLHP ; cf Matériels et Méthodes §4.2). Avant passage en CLHP, les protéines éventuellement contenues dans les échantillons de LCR et de perfusât ont été éliminées par une précipitation avec de l'acétonitrile suivie d'une centrifugation.

Afin d'évaluer l'effet du DMF sur la pénétration du CDNB dans le LCR, ce protocole a été légèrement adapté. Les tampons de perfusion ont été enrichis en albumine (*bovine serum albumine*, BSA) et en acides aminés précurseurs du GSH : 128 mM NaCl, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4,2 mM KCl, 2,4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,9 mM MgSO<sub>4</sub>, 9 mM D-glucose, 0,2 % BSA, 100 µM L-glutamate, 60 µM L-cystine, 250 µM glycine.

Les constantes de perméabilité ont été calculées comme précédemment décrit (Gheris-Egea et al., 2015).

## 2. Expérimentations *in vitro* et *ex vivo*

### 2.1. Mesure de la capacité de détoxification du peroxyde d'hydrogène par les plexus choroïdes *ex vivo*

Les plexus choroïdes fraîchement disséqués (cf § *Matériels & méthodes 1.3.1*) ont été réchauffés dans du milieu RH à 37°C puis placés dans une solution de 50 µM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. L'évolution de la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans ce milieu d'incubation au cours du temps a été monitorée à partir d'échantillons de milieu prélevés à intervalles réguliers (cf § *Matériels & méthodes 4.1*). En absence de plexus choroïdes, la concentration en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> était stable dans les conditions de l'expérience.

La quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> restant dans le milieu a été représentée en fonction du temps, et l'équation de la courbe exponentielle associée a été obtenue à l'aide du logiciel CurveExpert 1.4. À partir de cette équation, la demi-vie  $t_{1/2 \text{ ex vivo}}$  d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dans ces conditions expérimentales a été calculée. La clairance d'élimination  $Cl_{el}$  d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a ensuite été calculée d'après l'équation suivante :

$$Cl_{el} = V_{d \text{ ex vivo}} \times \frac{\ln 2}{t_{1/2 \text{ ex vivo}}}$$

où  $V_{d \text{ ex vivo}}$  est le volume d'incubation.

Pour chaque type de plexus choroïde, la demi-vie  $t_{1/2 \text{ in vivo}}$  d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a été extrapolée à partir de la clairance initiale d'élimination :

$$t_{1/2 \text{ in vivo}} = V_{d \text{ in vivo}} \times \frac{\ln 2}{Cl_{el}}$$

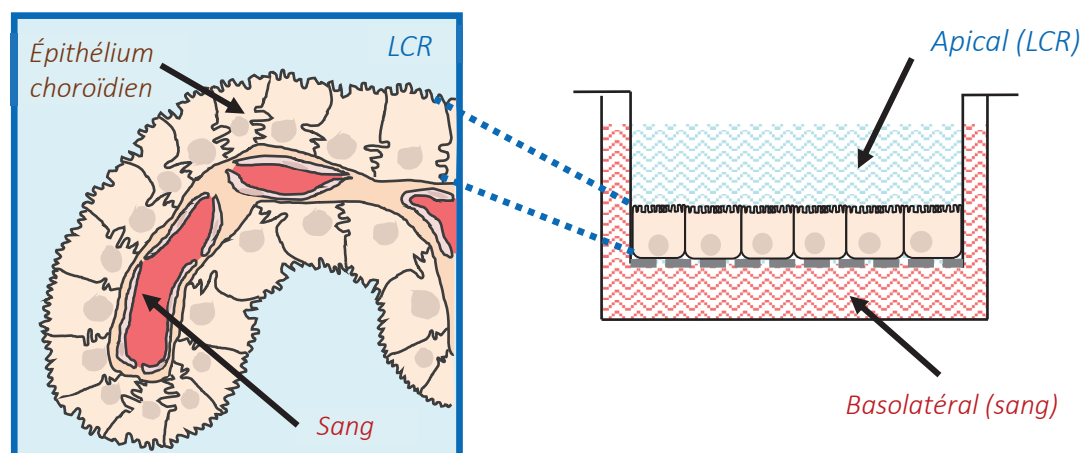
où le volume de distribution  $V_{d \text{ in vivo}}$  est le volume du 4<sup>ème</sup> ventricule ou des deux ventricules latéraux mesurés chez le rat P2 (Gherzi-Egea et al., 2015).

## 2.2. Culture primaire de cellules épithéliales choroïdiennes

### 2.2.1. Description

Les cultures primaires de cellules épithéliales choroïdiennes de rat ont été fournies par la plateforme BIP du Centre de recherche en neurosciences de Lyon (CRNL) (Strazielle et al., 2003; Strazielle & Gherzi-Egea, 1999).

Les cellules épithéliales choroïdiennes de rats P2 ont été isolées et cultivées sur des inserts microporeux recouverts de laminine. La monocouche cellulaire formée sépare un compartiment basolatéral, mimant le sang, et un compartiment apical, mimant le LCR (Figure 32). Les expérimentations ont été réalisées après 7 à 8 jours de culture. L'intégrité et la polarité de l'épithélium formé ont été vérifiées par mesure de la perméabilité envers le [ $^{14}\text{C}$ ]-saccharose et par mesure du transport actif du rouge phénol respectivement.



**Figure 32 | Représentation schématique de la culture primaire de cellules épithéliales choroïdiennes de rat en système bicompartimental.**

Les cellules épithéliales choroïdiennes ont été cultivées sur filtre microporeux. Elles séparent un compartiment basolatéral, mimant le sang, et un compartiment apical, mimant le liquide céphalorachidien (LCR).

D'après (Strazielle et al., 2004).

### 2.2.2. Détoxification du monochlorobimane et mesure de perméabilité

Les cellules ont été mises en contact avec le MCB (5 ou 50  $\mu\text{M}$ ) par leur pôle basolatéral. L'évolution de la quantité de MCB dans le milieu d'incubation au cours du temps a été monitorée à partir d'échantillons de milieux prélevés à intervalles réguliers dans les deux compartiments (cf § *Matériels & méthodes 4.2*). La perméabilité de l'épithélium choroïdien au MCB est exprimée en clairance cumulée. Pour chaque intervalle de temps, le volume de MCB éliminé a été calculé. L'apparition du conjugué au GSH (GS-MCB) dans les compartiments apical et basolatéral, et dans le milieu intracellulaire a été monitorée par spectrofluorimétrie (cf § *Matériels & méthodes 3.1.1*).

Dans certaines expérimentations, les cellules ont été prétraitées avec le probénécide, qui est un inhibiteur des transporteurs d'anions organiques.

### 2.2.3. Détoxification du peroxyde d'hydrogène et mesure de perméabilité

Les cellules ont été mises en contact avec différentes concentrations d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à leur pôle apical (60 ou 100  $\mu\text{M}$ ) ou basolatéral (20 à 500  $\mu\text{M}$ ). L'évolution de la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le milieu d'incubation au cours du temps a été monitorée à partir d'échantillons de milieux prélevés à intervalles réguliers dans les deux compartiments (cf § *Matériels & méthodes 4.1*). En absence de cellules épithéliales choroïdiennes, la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  était stable dans les conditions de l'expérience.

Pour chaque concentration utilisée, la quantité totale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  restant dans le milieu (compartiments apical et basolatéral) a été représentée en fonction du temps. La partie initiale de la courbe a été modélisée selon l'équation :

$$Q_{t\text{H}_2\text{O}_2} = Q_{0\text{H}_2\text{O}_2} \times e^{-k_{el} \times t}$$

où  $Q_{t\text{H}_2\text{O}_2}$  est la quantité totale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le système au temps  $t$ ,  $Q_{0\text{H}_2\text{O}_2}$  est la quantité initiale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le compartiment basolatéral, et  $k_{el}$  est la constante initiale d'élimination.

Les valeurs de  $k_{el}$  ont été utilisées pour calculer la demi-vie  $t_{1/2}$  d' $H_2O_2$  et la vitesse initiale d'élimination  $v$  pour chaque concentration :

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{el}} \quad \text{et} \quad v = \frac{Q_0 H_2O_2 \times k_{el}}{Q_{prot}}$$

où  $Q_{prot}$  est la quantité de protéines.

Dans la gamme de concentrations d' $H_2O_2$  utilisées, l'activité de la catalase peut être assimilée à une réaction de premier ordre, étant donné que la constante d'affinité  $K_m$  catalase est exceptionnellement élevée, de l'ordre de 1 M (Jones & Suggett, 1968). L'implication respective de la catalase et des Gpx dans l'élimination d' $H_2O_2$  ont été évaluées grâce à la modélisation de la vitesse initiale d'élimination  $v$  en fonction de la concentration d' $H_2O_2$  :

$$v = v_{catalase} + v_{Gpx}$$

où :

$$v_{catalase} = \frac{V_{max \text{ catalase}} \times Q_0 H_2O_2}{K_m \text{ catalase}}$$

et

$$v_{Gpx} = \frac{V_{max \text{ Gpx}} \times Q_0 H_2O_2}{K_m \text{ Gpx} + Q_0 H_2O_2}.$$

À partir de ces équations, la constante d'affinité  $K_m$  et la vitesse maximale  $V_{max}$  pour l'activité dépendante des Gpx ont pu être calculées.

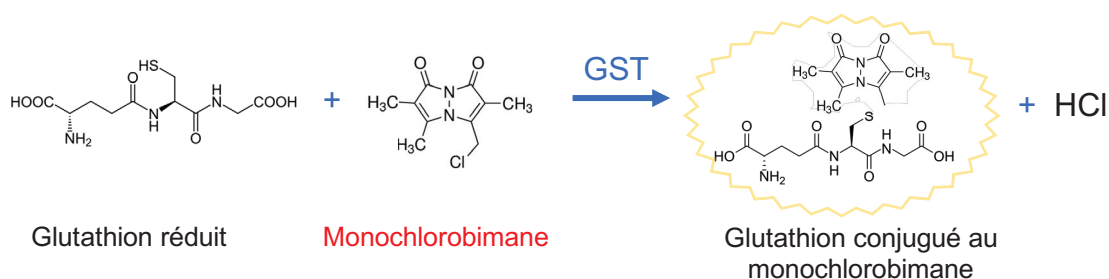
Dans certaines expérimentations, les cellules ont été prétraitées avec des inhibiteurs enzymatiques. Le CDNB agit en se conjuguant au GSH ; le GSH est alors complètement indisponible pour les Gpx, ce qui inhibe leur activité (Gherzi-Egea et al., 2006). Le 3-aminotriazole (3-AT) est un inhibiteur irréversible de la catalase qui agit en se fixant de façon covalente à son site actif (Margoliash & Novogrodsky, 1958). Après ces prétraitements, les cellules ont été exposées à leur pôle basolatéral à  $H_2O_2$  et le coefficient de perméabilité  $P_t$  d' $H_2O_2$  à travers l'épithélium choroïdien a été calculé pour chaque condition (Khuth et al., 2005). La perméabilité au  $[^{14}C]$ -saccharose a été évaluée sur une expérimentation séparée.

### 3. Biochimie et immunohistologie

#### 3.1. Enzymologie

L'activité spécifique est définie en  $\text{nmole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de protéines. La quantité totale de protéines de chaque échantillon a été mesurée par la méthode de Peterson (Peterson, 1977).

##### 3.1.1. Glutathion transférases



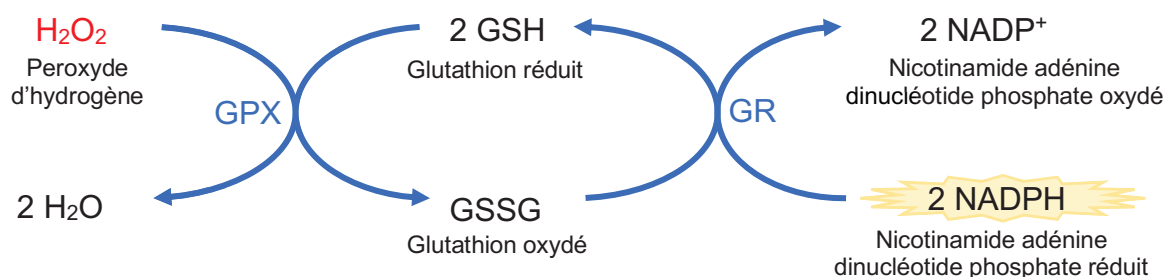
**Figure 33 | Dosage de l'activité glutathion transférase.**

La réaction de conjugaison catalysée par les glutathion transférases (GST) entre le monochlorobimane et le glutathion réduit produit un conjugué au glutathion fluorescent. La quantification de la vitesse d'apparition de ce conjugué par spectrofluorimétrie (longueurs d'ondes d'excitation et d'émission : 355 et 460 nm respectivement) permet de déterminer l'activité GST.

Les tissus prélevés ont été homogénéisés sur glace dans un tampon d'homogénéisation. L'activité enzymatique Gst associée à ces homogénats a été mesurée à 22°C en utilisant le MCB (0,05 mM) comme substrat et le GSH (1 mM) comme cosubstrat. L'activité Gst est mesurée directement en suivant par spectrofluorimétrie l'apparition du MCB conjugué au GSH (GS-MCB ; ex/em : 355/460 nm) (*Figure 33*). La conjugaison non-enzymatique du MCB au GSH a été mesurée pour chaque expérimentation par un essai réalisé dans les mêmes conditions en absence d'homogénat. Avant chaque série de dosage, la qualité des réactifs préparés a été vérifiée par la mesure de l'activité enzymatique d'un échantillon standard. La mesure de la fluorescence émise par un standard de GS-MCB préparé au laboratoire a permis de calibrer le système.

Le standard de GS-MCB a été préparé à l'aide de surnageant de foie de rat adulte. Une quantité connue de MCB a été incubée avec un surnageant de foie (possédant une activité Gst) en présence d'une quantité importante de GSH. La quantité de GS-MCB produite a été calculée à partir des valeurs de MCB résiduelles quantifiées par CLHP (Gherssi-Egea et al., 2006).

### 3.1.2. Glutathion peroxydases



**Figure 34 | Dosage des activités glutathion peroxydase et glutathion réductase.**

Les glutathion peroxydases (GPX) catalysent la réduction d' $H_2O_2$  en utilisant deux molécules de glutathion réduit (GSH), ce qui produit deux molécules d' $H_2O$  et une molécule de glutathion oxydé (GSSG). La glutathion réductase (GR) régénère les deux molécules de GSH à partir du GSSG produit, en oxydant deux molécules de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH). L'activité GPX envers l' $H_2O_2$  peut être mesurée indirectement en suivant par spectrophotométrie (340 nm) la disparition du NADPH en présence d'une quantité définie de GR et de GSH. L'activité GR envers le GSSG peut être mesurée directement en suivant par spectrophotométrie la disparition du NADPH.

D'après (Tayarani et al., 1989).

Les tissus prélevés ont été homogénéisés sur glace dans un tampon d'homogénéisation. L'activité enzymatique Gpx associée à ces homogénats a été mesurée en utilisant l' $H_2O_2$  (0,2 mM) comme substrat oxydant et le GSH (0,5 mM) comme substrat réducteur, en présence de Gr (1 UI) et de NADPH (0,12 mM) à 37°C. L'activité Gpx est mesurée indirectement en suivant par spectrophotométrie (340 nm) l'oxydation du NADPH par la Gr (Figure 34). L'oxydation non-enzymatique du NADPH due à l'action d' $H_2O_2$  a été mesurée pour chaque expérimentation dans un essai réalisé dans les mêmes conditions en



absence d'homogénat. Avant chaque série de dosage, la qualité des réactifs préparés a été vérifiée par la mesure de l'activité enzymatique d'un échantillon standard.

### 3.1.3. Glutathion réductase

Les tissus prélevés ont été homogénéisés sur glace dans un tampon d'homogénéisation. L'activité enzymatique Gr envers le GSSG associée à ces homogénats a été mesurée en présence de NADPH (0,12 mM) à 37°C. L'activité Gr est mesurée directement en suivant par spectrophotométrie (340 nm) l'oxydation du NADPH par la Gr (*Figure 34*). Avant chaque série de dosage, la qualité des réactifs préparés a été vérifiée par la mesure de l'activité enzymatique d'un échantillon standard.

## 3.2. Western-blot

L'expression protéique des sous-unités Gsta3, m1/2, m5 et p1, de l'isoenzyme Gpx1, de la Gr et du facteur de transcription Nfr2 ont été évaluées par analyse Western-blot.

Les échantillons tissulaires ont été homogénéisés dans un tampon adapté, puis les protéines ont été dénaturées par un tampon Laemmli additionné de dithiothréitol, et éventuellement par chauffage. Après migration sur un gel 10 % XT Bis-Tris Criterion (Bio-Rad) dans un tampon MOPS (acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique, Bio-Rad), les protéines ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,2 µm) dans un tampon Tris-glycine (Euromedex) contenant 20 % de méthanol. Les anticorps primaires utilisés pour détecter les protéines d'intérêt sont listés dans le *Tableau 7*

Tableau 7 | Anticorps primaires utilisés.. Les anticorps primaires ont été reconnus par des anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (*Tableau 8*) permettant une révélation sur film photographique après addition d'un substrat luminescent de la peroxydase de raifort.

### 3.3. Immunohistofluorescence

Les localisations cellulaires de la Gr, des isoenzymes Gsta3, m1/2 et m5, des isoenzymes Gpx1 et 4 et du facteur nucléaire Nrf2 ont été évaluées par immunohistofluorescence.

**Tableau 7 | Anticorps primaires utilisés.**

Protéine cible	Espèce	Type	Référence, clone	Fournisseur	Concentration ou dilution	
					WB	IHF
<b>β-actine</b>	souris	monoclonal	A1978	Sigma-Aldrich	0,1 ou 0,05 µg·mL <sup>-1</sup>	/
<b>Gpx1</b>	lapin	polyclonal	ab22604	Abcam	1 µg·mL <sup>-1</sup>	2 µg·mL <sup>-1</sup> (PFA avec démasquage)
<b>Gpx4</b>	lapin	polyclonal	14432-1-AP	Proteintech	/	4,1 µg·mL <sup>-1</sup> (PFA)
<b>Gr</b>	lapin	polyclonal	GTX114199	GeneTex	2 µg·mL <sup>-1</sup>	/
<b>Gsta3</b>	lapin	polyclonal	MBS71363	MyBioSource	0,31 µg·mL <sup>-1</sup>	/
<b>Gstm1/2</b>	lapin	monoclonal	ab108524	Abcam	0,69 µg·mL <sup>-1</sup>	/
<b>Gstm5</b>	lapin	polyclonal	MBS712299	MyBioSource	0,7 µg·mL <sup>-1</sup>	/
<b>Gstp1</b>	lapin	polyclonal	PAB13020	Abnova	1 µg·mL <sup>-1</sup>	/
<b>Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase</b>	souris	monoclonal	NB300-146	Nobus Biologicals	/	1/2000 (PFA avec ou sans démasquage)
<b>Nrf2</b>	lapin			Bioworld	1 µg·mL <sup>-1</sup>	5 µg·mL <sup>-1</sup> (PFA)
<b>Reca1</b>	souris	monoclonal	Clone HIS52, MCA970	Bio-Rad	/	2,5 µg·mL <sup>-1</sup> (PFA)

Abréviations : IHF : immunohistofluorescence, Gpx : glutathion peroxydase, Gr: glutathion réductase, Gst : glutathion transférase, Nrf2 : *Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2*, PFA: paraformaldéhyde, Recal: *rat endothelial cell antigen-1*, WB : Western-blot.

Les cerveaux conservés à -80°C ont été réchauffés à une température d'environ -20°C et inclus dans du Tissu-Tek (Sakura Finetek). Des sections coronales de 10 à 12 µm d'épaisseur ont été coupées à l'aide d'un cryostat Cryostar NX50 (Thermo Scientific),

montées sur des lames de verre et séchées à température ambiante. Ces lames ont été conservées à -20°C.

Après séchage, les coupes de cerveaux ont été fixées 10 min au paraformaldéhyde (4 %) avec ou sans démasquage (3 x 5 min à 850 W). Les anticorps primaires utilisés pour détecter les protéines d'intérêt sont listés dans le

Tableau 7 | Anticorps primaires utilisés.. Les protéines immunoréactives ont été reconnues par des anticorps secondaires couplés à des fluorophores (*Tableau 8*). Le diamidine-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI) a été utilisé pour marquer les noyaux. Les lames ont été montées avec du Fluoprep (BioMérieux). L'immunofluorescence a été visualisée à l'aide d'un microscope à fluorescence Imager Z1 (Zeiss), et les images ont été prises avec le logiciel AxioVs40 (version 4.8, Zeiss).

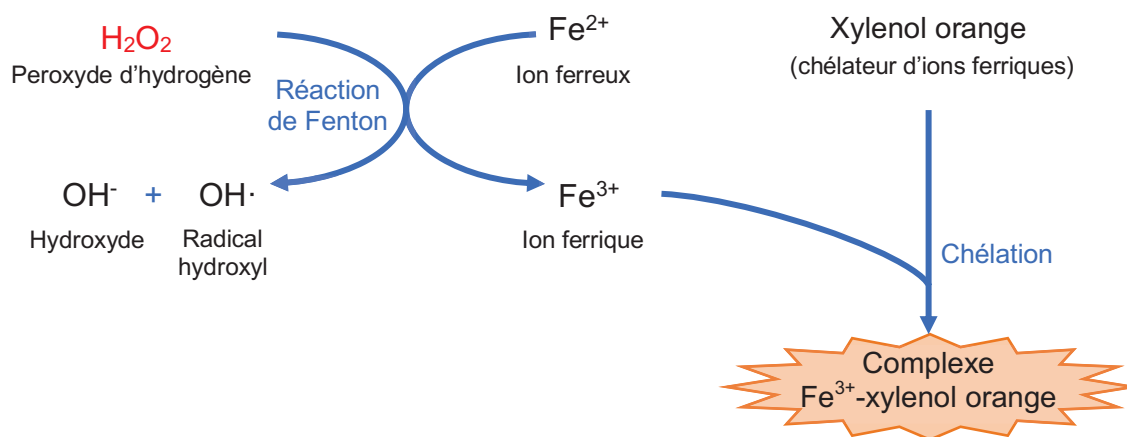
**Tableau 8 | Anticorps secondaires utilisés.**

Protéine cible	Conjugaison	Espèce	Référence, clone	Fournisseur	Dilution	
					WB	IHF
<b>IgG (H+L) (lapin)</b>	Alexa fluor 488	chèvre	A-11034	Invitrogen	/	0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
<b>IgG (H+L) (souris)</b>	Alexa fluor 555	chèvre	A-21422	Invitrogen	/	0,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
<b>IgG (lapin)</b>	Alexa fluor 555	chèvre	A-21429	Invitrogen	/	2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
<b>IgG (lapin)</b>	Peroxydase de raifort	âne	711-036-152	Jackson Immuno-Research	0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Gsta3, Gstm1/2, Gstp1); 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Gpx1); 0,08 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Gstm5, Gr)	/
<b>IgG (lapin)</b>	Peroxydase de raifort	chèvre	111-036-003	Jackson Immuno-Research	0,04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Nrf2)	/
<b>IgG (souris)</b>	Peroxydase de raifort	âne	715-036-151	Jackson Immuno-Research	0,04 ou 0,05 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (actine)	/

Abréviations : Gpx : glutathion peroxydase, Gr : glutathion réductase, Gst : glutathion transférase, IgG : Immunoglobuline, IHF : immunohistofluorescence, Nrf2 : *Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2*.

## 4. Méthodes analytiques

### 4.1. Dosage du peroxyde d'hydrogène



**Figure 35 | Dosage du peroxyde d'hydrogène par la méthode du xylenol orange.**

Ce dosage d' $H_2O_2$  repose sur la réaction de Fenton. En présence d' $H_2O_2$ , le fer ferreux est oxydé en fer ferrique. Une fois formé, le fer ferrique forme un complexe coloré avec le xylenol orange dosable par spectrophotométrie (540 nm).

La concentration en  $H_2O_2$  a été mesurée par un dosage colorimétrique en plaque 96 puits selon une méthode illustrée dans la *Figure 35* (Dringen et al., 1998). Ce dosage repose sur la formation du complexe coloré  $Fe^{3+}$ -xylenol orange lorsque l' $H_2O_2$  oxyde les ions ferreux  $Fe^{2+}$  en ions ferriques  $Fe^{3+}$ . L'absorption a été mesurée à 540 nm par un lecteur de plaque Infinite 200 (Tecan). La concentration en  $H_2O_2$  est calculée grâce à une courbe de calibration établie avec des solutions standard d' $H_2O_2$  préparées extemporanément.

### 4.2. Chromatographie liquide à haute performance

Le MCB, le CDNB et le GSH ont été quantifiés par CLHP (LC10-10AT, Shimadzu) couplée à une détection UV (SPD10A). Pour chaque composé, l'aire sous la courbe du pic d'intérêt a été mesurée et la quantité de composé présente dans l'échantillon a été quantifiée à l'aide d'une courbe de calibration générée à partir d'une solution standard.

Le MCB a été élué de façon isocratique en utilisant une phase mobile constituée d'un mélange 20/80 acétonitrile/eau ( $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ), et détecté à 256 nm.

Le CDNB a été élué de façon isocratique en utilisant une phase mobile constituée d'un mélange 55/10/35 méthanol/tampon phosphate 10 mM pH 6/eau ( $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ), et détecté à 250 nm.

Le GSH a été couplé avec de l'acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque) dans un tampon phosphate 10 mM pH 7,4. Le GSH conjugué a été élué avec un gradient en utilisant une phase mobile constituée d'un mélange méthanol/tampon phosphate (Schmitt et al., 2011), et détecté à 324 nm.

## 5. Statistiques

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD, ou en moyenne  $\pm$  SE.

Le test t de Student, uni- ou bilatéral, a été utilisé pour comparer les moyennes de deux groupes. Pour chaque animal (ou groupe d'animaux), le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule et les plexus choroïdes des ventricules latéraux ont été disséqués et analysés séparément. Le test t de Student pour données appariées a été utilisé pour comparer les moyennes des mesures réalisées à partir de ces deux types de tissus.

Le test ANOVA, à un ou deux facteur(s), a été utilisé pour comparer les moyennes de trois groupes ou plus. Le test ANOVA a été suivi d'une analyse *post-hoc* de Dunnet afin de comparer les moyennes à la moyenne d'un groupe contrôle, ou d'une analyse *post-hoc* de Tukey-Kramer afin de comparer les moyennes des différents groupes entre elles.

Dans chaque groupe expérimental, le nombre d'échantillons N (nombre d'animaux ou nombre de pool) a été choisi à partir d'études similaires antérieures publiées ayant été réalisées dans l'équipe (même type de tissus, approches expérimentales similaires). Le nombre d'échantillons par groupe N est indiqué dans les légendes des tableaux et figures, ou directement sur les figures.

Toutes les données quantitatives présentées dans ce travail ont été produites à partir d'au moins deux lots d'échantillons complètement indépendants.

Les tests statistiques utilisés pour comparer les moyennes des différents groupes expérimentaux sont précisés dans la légende de la figure ou du tableau correspondant. Une valeur- $p < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative. Toutes les analyses ont été réalisées avec le logiciel Prism (version 7.04, Graph Pad).

## RESULTATS & DISCUSSIONS

---





## 1. Glutathion peroxydases choroïdiennes : protection de l'environnement liquidien cérébral envers les hydroperoxydes au cours de la période périnatale

### 1.1. Résultats

#### 1.1.1. Description du système antioxydant choroïdien dépendant des glutathion peroxydases et de la glutathion réductase

##### 1.1.1.1. Activités enzymatiques

Les activités spécifiques Gpx et Gr ont été mesurées dans les tissus cérébraux et par comparaison dans le foie chez le rat à différents stades de développement (*Figure 36* et *Figure 37*). Les animaux mâles et femelles ont été analysés séparément après le sevrage.

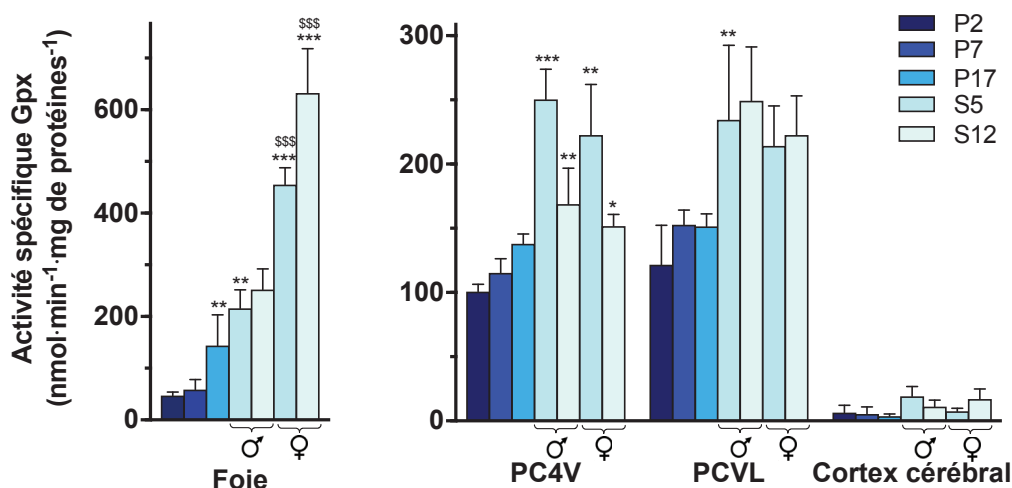
Aux stades précoces de développement postnatal (P2 et P7), l'activité spécifique Gpx choroïdienne est de l'ordre de  $\sim 100$  à  $150 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de protéines. Entre le stade P2 et la 5<sup>ème</sup> semaine de développement (S5), cette activité augmente de 120 % dans le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule et de 80 % dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux (mâles et femelles combinés). Entre les stades subadulte et adulte (S5 et S12 respectivement), l'activité Gpx choroïdienne diminue d'environ 30 % dans le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule et est stable dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux.

Quel que soit le stade de développement étudié, l'activité Gpx choroïdienne est plus de dix fois supérieure à celle mesurée dans le cortex cérébral (*Figure 36, Tableau 9*). Au 17<sup>ème</sup> jour postnatal (P17), cette différence est maximale : les activités Gpx mesurées dans le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule et dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux sont respectivement  $37,4 \pm 2,1$  et  $41,1 \pm 2,7$  fois supérieures à celles mesurées dans le cortex cérébral (moyenne  $\pm$  SD, N=4).

Le foie est l'organe de référence en termes de métabolisme de détoxification enzymatique. Il présente notamment une importante activité SecGpx qui lui permet d'éliminer les ERO produites *in situ* au cours de l'activité hépatique physiologique

(Gromadzinska et al., 1988; Mello et al., 2015; L. Zhang et al., 1989). Aux stades P2 et P7, l'activité Gpx hépatique est de l'ordre de  $\sim 50 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$ , soit deux fois inférieure à l'activité Gpx choroïdienne. L'activité Gpx hépatique augmente de façon importante au cours du développement : chez l'adulte, elle atteint respectivement  $252,0 \pm 39,9$  et  $632,5 \pm 85,7 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  chez les mâles et les femelles (moyenne  $\pm$  SD,  $N = 4$ ). Aucune différence d'activité liée au sexe n'a été observée dans les tissus cérébraux étudiés.

**Figure 36 | Activités glutathion peroxydase dans les tissus cérébraux et dans le foie chez le rat au cours du développement postnatal.**



L'activité spécifique glutathion peroxydase (Gpx) envers le peroxyde d'hydrogène a été mesurée dans des homogénats de foie et de tissus cérébraux préparés à partir de rats de 2, 7, 17 jours postnatal (P2, P7 et P17 respectivement), de rats subadultes (5 semaines, S5) et adultes (12 semaines, S12). L'activité spécifique Gpx est exprimée en nmoles d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> réduit·min<sup>-1</sup>·mg de protéines<sup>-1</sup> (moyenne  $\pm$  SD, ( $N = 4$ , sauf pour les groupes PCVL P2 et cortex cérébral P17 où  $N=3$ , et pour le groupe cortex cérébral P2 où  $N=5$ ).

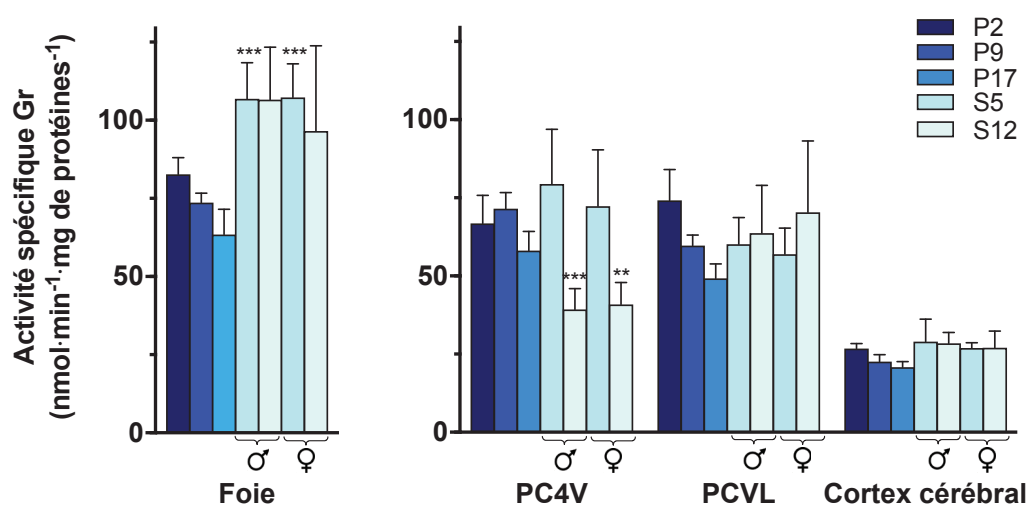
\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$  : statistiquement différent de l'activité mesurée dans le même tissu au stade de développement précédent. §§§ $p < 0,001$  : statistiquement différent de l'activité mesurée dans le même tissu chez le mâle au même stade de développement. À tous les stades de développement étudiés, l'activité Gpx dans les deux types de plexus choroïdes est supérieure à l'activité Gpx mesurée dans le cortex cérébral au même stade de développement ( $p \leq 0.001$ ). L'ensemble des analyses statistiques a été réalisée avec une analyse ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey-Kramer.

Abréviations : PC4V : plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCVL : plexus choroïdes des ventricules latéraux.

**Tableau 9 | Rapport entre les activités spécifiques glutathion peroxydase mesurées dans les plexus choroïdes et dans le cortex cérébral chez le rat au cours du développement postnatal.**

Rapport des activités Gpx	P2	P7	P17	Mâle		Femelle	
				S5	S12	S5	S12
PC4V / Cx	15,5 ± 0,9*	21,8 ± 2,1*	37,4 ± 2,1	13,1 ± 1,2*	15,3 ± 2,5*	29,4 ± 5,2*	8,9 ± 0,5*
PCVL / Cx	18,8 ± 4,7*	28,8 ± 2,2*	41,1 ± 2,7	12,3 ± 3,0*	22,5 ± 3,8*	28,3 ± 4,1*	13,1 ± 1,8*

Les résultats sont exprimées en moyenne ± SD (N ≥ 3). \* p < 0,001 : statistiquement différent du rapport calculé au stade P17, analyse ANOVA à un facteur suivie d'un test de comparaison de Dunnett. Abréviation : Cx : cortex cérébral, P2 : 2 jours postnatal, P7 : 7 jours postnatal, P17 : 17 jours postnatal, PC4V : plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCVL : plexus choroïdes des ventricules latéraux, S5 : 5 semaines de développement, S12 : 12 semaines de développement.



**Figure 37 | Activités glutathion réductase dans les tissus cérébraux et dans le foie chez le rat au cours du développement postnatal.**

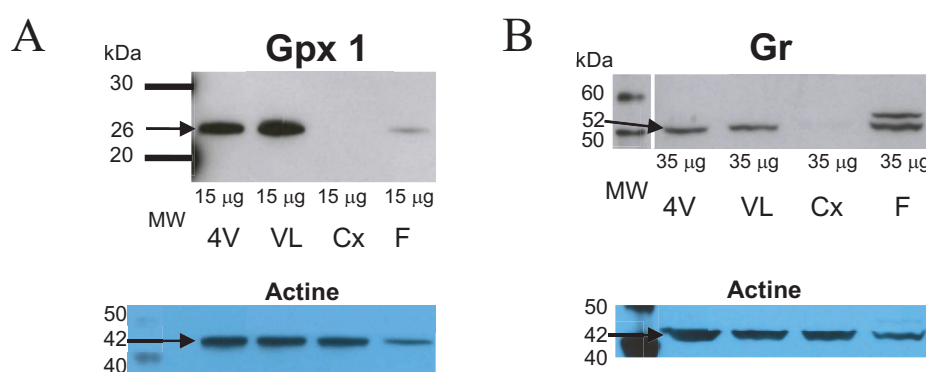
L'activité spécifique glutathion réductase (Gr) a été mesurée dans des homogénats de foie et de tissus cérébraux préparés à partir de rats de 2, 9, 17 jours postnatal (P2, P9 et P17 respectivement), de rats subadultes (5 semaines, S5) et adultes (12 semaines, S12). L'activité spécifique Gr est exprimée en nmoles d' $\text{NADP}^+$  produit·min<sup>-1</sup>·mg de protéines<sup>-1</sup> (moyenne ± SD, N = 4, sauf pour les groupes PCVL P2 et cortex cérébral P17 où N=3, et pour le groupe cortex cérébral P2 où N=5).

\*\*p ≤ 0.01, \*\*\*p ≤ 0.001 : statistiquement différent de l'activité mesurée dans le même tissu au stade de développement précédent. À tous les stades de développement étudiés, l'activité Gr dans les deux types de plexus choroïdes est supérieure à l'activité Gr mesurée dans le cortex cérébral au même stade de développement (p ≤ 0.001). L'ensemble des analyses statistiques a été réalisée avec une analyse ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey-Kramer.

Abréviations : PC4V : plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCVL : plexus choroïdes des ventricules latéraux.

Les activités GR et GPX sont indissociables : la GR régénère deux GSH à partir du GSSG produit par les GPX lors de la réduction des hydroperoxydes. Chez le rat, la Gr présente une activité de l'ordre de  $\sim 60 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  dans les deux types de plexus choroïdes, sans variation développementale notable (*Figure 37*). À l'instar de la Gpx, la Gr a une activité plus élevée dans le tissu choroïdien que dans le cortex cérébral à tous les stades de développement étudiés. Aux stades précoces de développement (P2 à P17), la Gr hépatique a une activité similaire à celle mesurée dans les plexus choroïdes, mais son activité augmente de façon significative pour atteindre  $\sim 100 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  chez les animaux adultes.

#### 1.1.1.2. Expression protéique et localisation cellulaire des isoenzymes glutathion peroxydases 1 et 4, et de la glutathion réductase

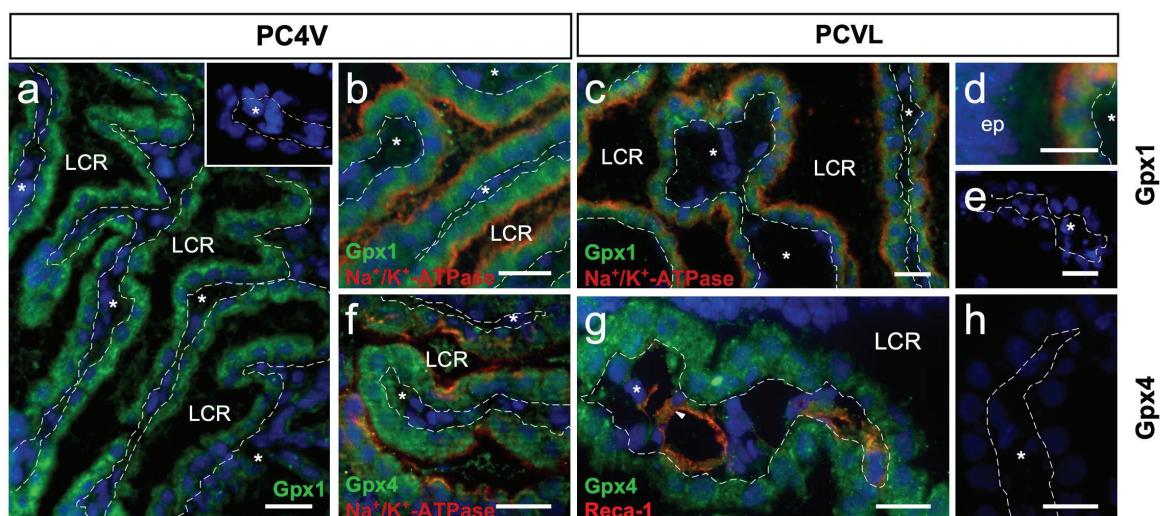


**Figure 38 | Analyse par Western-blot de l'expression protéique de la glutathion peroxydase 1 (Gpx1) et de la glutathion réductase (Gr) dans les tissus cérébraux et dans le foie chez le rat au cours du développement postnatal.**

Les tissus ont été isolés à partir d'animaux de 9 jours postnatal. **A.** L'isoenzyme Gpx1 est exprimée de façon importante dans les deux types de plexus choroïdes et est faiblement exprimée dans le foie (26 kDa). Deux bandes additionnelles non-spécifiques ( $\sim 55$  et  $110$  kDa) sont présentes dans tous les échantillons. **B.** La Gr est bien exprimée dans les tissus choroïdiens et dans le foie (52 kDa). Son expression est plus faible dans le cortex cérébral. Dans le foie, le signal Gr présente deux bandes (52 et 55 kDa). Une bande additionnelle non-spécifique ( $\sim 30$  kDa) est présente dans tous les échantillons. Le niveau d'actine dans le foie est plus faible que dans les autres organes, ce qui explique la différence d'intensité de signal entre le foie et les tissus choroïdiens pour une même quantité de protéines déposée (Sampath et al., 2003). Abréviations : 4V : plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, Cx : cortex cérébral, F : foie, MW : marqueurs de poids moléculaire (*molecular weight*), VL : plexus choroïdes des ventricules latéraux.

Les expressions protéiques de l'isoenzyme Gpx1 et de la Gr ont été mesurées par Western-blot dans des échantillons de tissus cérébraux et de foie de rats P2 et P9 (*Figure 38*). Les conditions dénaturantes utilisées en Western-blot n'étaient pas compatibles avec la détection de l'isoenzyme Gpx4. Aux stades précoces de développement (P2 et P9), l'expression protéique de l'isoenzyme Gpx1 est importante dans les plexus choroïdes en comparaison du cortex cérébral, ce qui est en accord avec les activités enzymatiques mesurées dans les deux types de tissus. À P9, l'expression protéique de la Gpx1 dans les plexus choroïdes est également plus élevée que celle détectée dans le foie. La Gr a un niveau d'expression protéique similaire entre les deux types de plexus choroïdes et dans le foie, et plus faible dans le tissu cortical.

La localisation des deux isoenzymes Gpx1 et Gpx4 au sein du tissu cérébral a ensuite été déterminée par une immunohistochimie réalisée sur des coupes de cerveau de rat P2 (*Figure 39*) et P9 (*résultats non présentés*). Les plexus choroïdes du 4<sup>ème</sup> ventricule et des ventricules latéraux présentent des marquages Gpx1 et Gpx4 homogènes dans l'ensemble des boucles choroïdiennes, sans signe de régionalisation. En comparaison, le parenchyme cérébral et l'épendyme ne montrent que peu ou pas de marquage Gpx1 et Gpx4, ce qui est en accord avec les mesures d'activités enzymatiques Gpx et les niveaux d'expression protéique Gpx1 (Western-blot). Afin de déterminer la localisation cellulaire des deux isoenzymes au sein du tissu choroïdien, des comarquages ont été réalisés avec les protéines Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase et *rat endothelial cell antigen-1* (Reca1) respectivement utilisées pour marquer la membrane apicale de l'épithélium choroïdien et pour marquer les vaisseaux sanguins. Les conditions de marquage utilisées pour mettre en évidence l'isoenzyme Gpx1 étaient incompatibles avec le marquage de la protéine endothéliale Recal. Ces comarquages montrent que les enzymes Gpx1 et Gpx4 choroïdiennes sont localisées au niveau du cytosol des cellules épithéliales formant la barrière sang-LCR.



**Figure 39 | Détection par immunohistofluorescence des isoenzymes glutathion peroxydase 1 et glutathion peroxydase 4 dans les plexus choroïdes chez le rat de 2 jours postnatal.**

**a-e** : Marquage de l'isoenzyme glutathion peroxydase 1 (Gpx1, *vert*) et de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (*rouge*) dans les plexus choroïdes du 4<sup>ème</sup> ventricule ventricule (*a-b*) et des ventricules latéraux (*c-e*). Le marquage de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase permet de délimiter la membrane apicale des cellules épithéliales choroïdiennes et de localiser la Gpx1 dans le compartiment intracellulaire de ces cellules. Le signal Gpx1 n'est pas détecté dans le stroma conjonctif choroïdien (*a-c*, *étoiles*). Ce signal est également absent ou faible dans le parenchyme cérébral et dans l'épendyme (*d*) en comparaison des cellules épithéliales choroïdiennes.

**f-h** : Marquage de l'isoenzyme Gpx4 (*vert*) et de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (*f*, *rouge*) ou de Recal1 (*g*, *rouge* ; marqueur des vaisseaux sanguins) dans les plexus choroïdes du 4<sup>ème</sup> ventricule (*f*) et des ventricules latéraux (*g-h*). L'isoenzyme Gpx4 est localisée dans le compartiment intracellulaire des cellules épithéliales choroïdiennes dans les deux types de plexus choroïdes. Le signal Gpx4 est faible ou absent dans le stroma conjonctif choroïdien (*f-g*, *étoiles*) et dans le parenchyme cérébral.

**Inserts en a, e, h** : Contrôles négatifs obtenus en absence d'anticorps primaires.

Le DAPI a été utilisé pour marquer les noyaux.

Abréviations : ep : épendyme, LCR : liquide céphalorachidien, PC4V : plexus choroïdes du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCLV : plexus choroïdes des ventricules latéraux, Recal1 : *rat endothelial cell antigen-1*.

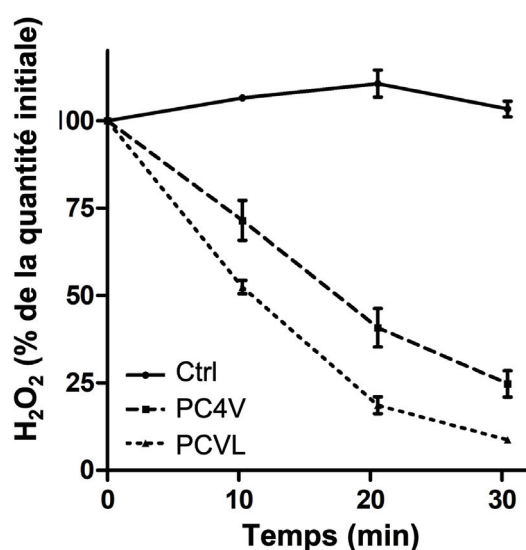
Barre d'échelle : 20  $\mu\text{M}$ .



### 1.1.2. Efficacité du système antioxydant choroïdien dépendant des glutathion peroxydases

#### 1.1.2.1. Capacité des plexus choroïdes isolés à inactiver le peroxyde d'hydrogène

La capacité du système enzymatique choroïdien GPX-GR à protéger le LCR du stress oxydant au cours du développement postnatal a été évaluée *ex vivo*. L' $\text{H}_2\text{O}_2$ , molécule impliquée dans la physiopathologie de nombreuses pathologies périnatales, a été utilisée comme molécule modèle pour cette étude (Hyslop et al., 1995; Jain et al., 2000; Lei et al., 1998). L' $\text{H}_2\text{O}_2$  est une ERO, mais possède une demi-vie relativement longue, compatible avec les conditions d'expérimentation. Cette molécule a par ailleurs l'avantage d'être un substrat commun à l'ensemble des isoenzymes de GPX (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).



**Figure 40 | Détoxification du peroxyde d'hydrogène par des plexus choroïdes isolés de rats de deux jours.**

Deux plexus choroïdes des ventricules latéraux ou un plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule de rats de 2 jours ont été exposés à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans 150  $\mu\text{L}$  de liquide céphalorachidien artificiel (tampon Ringer HEPES).

Pour chaque essai, la quantité de protéines dans les plexus choroïdes a été mesurée afin de normaliser la quantité initiale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à la quantité moyenne de protéines dans les plexus choroïdes isolés de rats Sprague-Dawley de 2

jours. Le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule contient  $69 \pm 9 \mu\text{g}$  de protéines, et les deux plexus choroïdes des ventricules latéraux contiennent  $100 \pm 9 \mu\text{g}$  de protéines (Gherzi-Egea et al., 2015). Les courbes montrent l'évolution de la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  au cours du temps, exprimée en pourcentage de la quantité initiale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le milieu d'incubation (moyenne  $\pm$  SE, N = 5)

Abréviations : Ctrl : incubation contrôle sans plexus choroïdes, PC4V : plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCVL : plexus choroïdes des ventricules latéraux.



Les plexus choroïdes du 4<sup>ème</sup> ventricule et des ventricules latéraux de rats P2 ont été isolés séparément et conservés intacts dans du milieu RH, utilisé comme LCR artificiel. Ces tissus ont ensuite été exposés à une concentration physiopathologique de 50  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans 150  $\mu\text{L}$  de LCR artificiel. La capacité des plexus choroïdes à inactiver l' $\text{H}_2\text{O}_2$  a été évaluée en mesurant l'évolution de la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le LCR artificiel au cours du temps (*Figure 40*). En l'absence de tissu choroïdien, la concentration d' $\text{H}_2\text{O}_2$  était stable au cours de l'expérience. Les deux types de plexus choroïdes ont la capacité d'éliminer rapidement l' $\text{H}_2\text{O}_2$  du LCR artificiel, bien que les tissus aient été incubés dans un volume de LCR artificiel nettement supérieur aux volumes ventriculaires réels du rat P2 ( $V_{d \text{ in vivo}}$ ). La courbe représentant l'évolution de la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  au cours du temps avec le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule est différente de celle générée avec les deux plexus choroïdes des ventricules latéraux, ce qui peut être expliqué par la différence de taille entre les deux tissus : les deux plexus choroïdes des ventricules latéraux contiennent  $100 \pm 9 \mu\text{g}$  de protéines contre  $69 \pm 9 \mu\text{g}$  de protéines pour le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule (moyenne  $\pm$  SD) (Gherzi-Egea et al., 2015).

Pour chaque type de plexus choroïde, la demi-vie  $t_{1/2 \text{ ex vivo}}$  et la clairance initiale d'élimination  $\text{Cl}_{el}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ont été calculées à partir de la courbe quantité-temps présentée sur la *Figure 40*. La clairance initiale d'élimination représente la capacité intrinsèque du tissu à métaboliser  $\text{H}_2\text{O}_2$  ; assumant une valeur identique pour les plexus choroïdes vivants isolés (condition *ex vivo*) et *in situ* (condition *in vivo*), la demi-vie  $t_{1/2 \text{ in vivo}}$  nécessaire pour éliminer la moitié de la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  lors d'un pic à 50  $\mu\text{M}$  dans le LCR emplissant les ventricules cérébraux a été calculée (*Tableau 10*). Les volumes ventriculaires  $V_{d \text{ in vivo}}$  utilisés dans ce calcul ont été mesurés sur des rats P2 de même souche (Gherzi-Egea et al., 2015). Les valeurs de  $t_{1/2 \text{ in vivo}}$  sont estimées à quelques secondes pour les plexus choroïdes des ventricules latéraux et moins d'une minute pour le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule (*Tableau 10*), ce qui démontre le haut degré d'efficacité de ces tissus à inactiver l' $\text{H}_2\text{O}_2$  véhiculé par le LCR.

**Tableau 10 | Paramètres régissant l'élimination du peroxyde d'hydrogène par les plexus choroïdes *ex vivo* (essai) et *in vivo* (extrapolation).**

	<i>Ex vivo</i> (essai)			<i>In vivo</i> (extrapolation)	
	$V_d \text{ ex vivo}$ $\mu\text{L}$	$t_{1/2} \text{ ex vivo}$ min	$Cl_{el}$ $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$	$V_d \text{ in vivo}$ $\mu\text{L}^*$	$t_{1/2} \text{ in vivo}$ min
<b>PCVL</b>	150	$9,6 \pm 0,3$	$123,7 \pm 6,1$	2,95	$10,0 \pm 0,5$
<b>PC4V</b>	150	$17,2 \pm 2,4$	$113,0 \pm 13,3$	6,56	$37,6 \pm 5,5$

Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  SE ( $N \geq 4$ ). Ces résultats ont été générés en utilisant une concentration initiale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  de 50  $\mu\text{M}$ . Cf *Matériels et Méthodes* § 2.1 pour les définitions des différents paramètres d'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . \* $V_d \text{ in vivo}$  est le volume ventriculaire mesuré chez des animaux de deux jours (Gheresi-Egea et al., 2015).

Abréviation : PC4V : plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCVL : plexus choroïdes des ventricules latéraux.

#### 1.1.2.2. Rôle des glutathion peroxydases dans l'inactivation du peroxyde d'hydrogène par les cellules épithéliales choroïdiennes *in vitro*

Deux systèmes enzymatiques distincts sont capables d'inactiver des quantités importantes d' $\text{H}_2\text{O}_2$  : les GPX et la catalase. Afin de déterminer l'importance relative de ces deux systèmes dans l'inactivation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par l'épithélium choroïdien, nous avons utilisé un modèle cellulaire de la barrière sang-LCR choroïdienne.

Ce modèle est réalisé à partir d'une culture primaire de cellules épithéliales choroïdiennes de rat (P2) cultivée sur un filtre perméable. Il s'agit d'un modèle bicaméral : la monocouche de cellules épithéliales choroïdiennes sépare un compartiment apical, mimant le LCR, et un compartiment basolatéral, mimant le sang. Ce modèle cellulaire reproduit l'étanchéité et la polarité de l'épithélium choroïdien *in vivo*, et a été validé pour l'étude des fonctions de barrière et de transport (Gheresi-Egea et al., 2006; Strazielle et al., 2003; Strazielle & Gheresi-Egea, 1999). En particulier, ce modèle a été utilisé pour étudier des fonctions métaboliques impliquant le GSH. Contrairement aux plexus choroïdes isolés, ce modèle cellulaire bicaméral permet d'exposer les cellules épithéliales à  $\text{H}_2\text{O}_2$  par leur pôle basal ou apical afin de mimer une exposition via le sang ou le LCR respectivement. Il peut donc permettre de mesurer *in vitro* la perméabilité de

la barrière sang-LCR à l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (cf *Résultats §1.1.2.3*). Enfin, ce modèle cellulaire nous a permis de réaliser des études mécanistiques nécessitant des expositions de longues durées avec des inhibiteurs enzymatiques, tout en limitant le nombre d'animaux utilisés.

Nous avons d'abord vérifié que les cellules épithéliales choroïdiennes en culture conservaient bien la forte activité spécifique Gpx mise en évidence dans les plexus choroïdes des rats au stade postnatal ( $\sim 100$  à  $150 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de protéines). Les cellules en culture présentent une activité Gpx de  $200,8 \pm 57,0 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}$  de protéines $^{-1}$  (moyenne  $\pm$  SD, N = 5 mesures issues de 2 lots de cellules différents) similaire à celle mesurée dans les plexus choroïdes de rats.

La capacité des cellules épithéliales choroïdiennes en culture à inactiver l' $\text{H}_2\text{O}_2$  a été évaluée en mesurant l'évolution de la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le milieu de culture au cours d'une exposition à  $60 \mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à leur pôle apical ou basolatéral. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  est éliminé à la même vitesse, quel que soit le pôle cellulaire exposé : la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  réduit sur une période de 14 min est de  $213,0 \pm 63,69 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$  de protéines $^{-1}$  lorsque l' $\text{H}_2\text{O}_2$  a été ajouté dans le compartiment basolatéral, et  $164,4 \pm 20,8 \text{ nmol} \cdot \text{mg}$  de protéines $^{-1}$  lorsqu'il a été ajouté dans le compartiment apical (moyenne  $\pm$  SD, N = 4, pas de différence significative selon le test bilatéral de Student pour variances inégales). L'utilisation d'une concentration supérieure d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $100 \mu\text{M}$ ) donne des résultats comparables (*résultats non présentés*).

Afin de déterminer si l'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par les cellules épithéliales choroïdiennes en culture fait intervenir des composants antioxydants (enzymatiques ou non enzymatiques) sécrétés dans le milieu de culture, nous avons testé la capacité du milieu préconditionné par les cellules épithéliales choroïdiennes à éliminer  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Le milieu préconditionné a été obtenu en incubant des filtres recouverts d'une monocouche de cellules épithéliales choroïdiennes avec du RH frais, après avoir été rincés avec du RH. Après 7,5 ou 25 min d'incubation avec les cellules, le milieu préconditionné a été prélevé des compartiments apical et basolatéral, et immédiatement mis en contact avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (concentration finale :  $44 \mu\text{M}$ ) pour une durée égale à la durée d'incubation. Dans ces

conditions, la concentration d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est stable (*Tableau 11*). Ce résultat indique que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  doit diffuser dans les cellules épithéliales choroïdiennes pour être inactivé.

**Tableau 11 | Absence d'élimination du peroxyde d'hydrogène par le milieu préconditionné des cellules épithéliales choroïdiennes.**

	Temps (min)		
	0	7,5	25
<b>[<math>\text{H}_2\text{O}_2</math>] (%)</b>			
Milieu apical	$100 \pm 3,5$	non déterminé	$98,0 \pm 2,3$
Milieu basolatéral	$100 \pm 3,5$	$106,5 \pm 2,9$	$104,8 \pm 3,2$

Les cellules épithéliales en culture ont été rincées et mises en contact avec du tampon Ringer-HEPES pendant 7,5 ou 25 min. Du milieu préconditionné a été prélevé dans les compartiments apical et basolatéral puis mis en contact avec de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  (concentration finale  $44 \mu\text{M}$ ). Après une durée égale à la durée de préconditionnement (7,5 ou 25 min), la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  a été mesurée.

Les valeurs sont exprimées en pourcentage de la concentration d' $\text{H}_2\text{O}_2$  mesurée en condition contrôle (milieu Ringer-HEPES non préconditionné) (moyenne  $\pm$  SD, N = 4).

Toutes les expériences suivantes ont été réalisées en ajoutant l' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le compartiment basolatéral. Cette configuration permet d'une part l'utilisation de plus faibles concentrations d' $\text{H}_2\text{O}_2$  restant compatibles avec la limite de détection du dosage (prélèvement de plus grands volumes), et d'autre part d'explorer l'existence d'une barrière métabolique limitant le passage d' $\text{H}_2\text{O}_2$  entre le sang et le LCR.

Les paramètres cinétiques régissant l'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par l'épithélium choroïdien ont été déterminés en exposant les cellules à des concentrations d' $\text{H}_2\text{O}_2$  allant de 20 à  $450 \mu\text{M}$  (*Figure 41*). La *Figure 41B* représente l'évolution de la quantité totale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  restant dans le système (milieux apical et basolatéral) au cours du temps. Tout d'abord, ces données montrent que quelle que soit la concentration initiale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le compartiment basolatéral, les cellules épithéliales choroïdiennes inactivent efficacement l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Par ailleurs, la partie linéaire de la représentation logarithmique de ces courbes d'élimination (*Figure 41B insert*) permet de déterminer la période pouvant être utilisée pour calculer la constante initiale d'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$   $k_{el}$  pour chaque concentration d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ces constantes  $k_{el}$  ont été utilisées pour calculer la demi-vie d'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$ .

$t_{1/2}$  pour chaque concentration (*Tableau 12*). Plus la concentration initiale d' $H_2O_2$  est faible, plus la valeur de  $t_{1/2}$  est faible ; ce résultat indique que le mécanisme d'élimination d' $H_2O_2$  implique une composante saturable.

Pour mieux caractériser ce mécanisme, nous avons calculé pour chaque concentration la vitesse initiale d'élimination d' $H_2O_2$   $v$  à partir des constantes  $k_{el}$  (*Tableau 12*). La *Figure 41C* représente cette vitesse initiale d'élimination d' $H_2O_2$   $v$  en fonction de la concentration initiale d' $H_2O_2$ . La courbe obtenue a été modélisée en partant du postulat que l'élimination d' $H_2O_2$  résultait de deux réactions enzymatiques coexistantes : une réaction de premier ordre attribuée à la catalase, et une réaction mixte attribuée aux Gpx. À partir de cette modélisation, les vitesses initiales d'élimination d' $H_2O_2$   $v$  correspondant à l'activité de la catalase et à l'activité des Gpx dans les cellules épithéliales choroïdiennes en culture ont été calculées pour chaque concentration (*Tableau 12*). Ces valeurs  $v$  indiquent que l'activité des Gpx est dominante dans l'inactivation d' $H_2O_2$  lorsque la concentration initiale d' $H_2O_2$  est inférieure à 250  $\mu M$ . Pour l'activité de la catalase, ces données permettent de calculer le rapport  $V_{max}/K_m = 0,163 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$ , qui est un indice de l'efficacité catalytique. Pour l'activité des Gpx, ces valeurs permettent de calculer les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  qui sont respectivement de 272,7  $\mu M$  et 88,5  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  dans les cellules épithéliales en culture (vivantes). La représentation de Hanes-Woolf de la cinétique des Gpx est présentée dans la *Figure 41D*. Les paramètres cinétiques de l'élimination d' $H_2O_2$  ont également été mesurés dans des homogénats de plexus choroïdes de rats P2 en utilisant la méthode enzymatique spécifique des Gpx ; dans ces conditions, les constantes  $K_m$  et  $V_{max}$  sont respectivement de 10,3  $\mu M$  et 116,3  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  (*Figure 41D*). L'importante différence dans les valeurs de  $K_m$  entre les deux conditions expérimentales (cellules vivantes en culture et homogénat de plexus choroïdes) peut être expliquée par un changement d'affinité des Gpx pour l' $H_2O_2$  induit par la culture cellulaire, ou par une accessibilité réduite à l' $H_2O_2$  dans les cellules vivantes par rapport à l'homogénat. Afin d'étudier ces deux hypothèses, les paramètres cinétiques de l'élimination d' $H_2O_2$  ont été mesurés dans des homogénats de cellules épithéliales choroïdiennes issues de culture cellulaire, en utilisant la méthode enzymatique spécifique des Gpx ; dans ces conditions, les constantes  $K_m$  et  $V_{max}$  sont respectivement de 7,9  $\mu M$  et 232,6  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  (*Figure*

41D). La constante d'affinité  $K_m$  a une valeur similaire à celle mesurée à partir des homogénats de plexus choroïdes, ce qui indique que l'accessibilité au substrat (plutôt que l'activité enzymatique) est le paramètre limitant dans l'élimination d' $H_2O_2$  par les Gpx choroïdiennes. La constante  $V_{max}$  est quant à elle un peu plus élevée que celle mesurée à partir des homogénats de plexus choroïdes, ce qui pourrait être expliqué par la présence de tissu stromal et vasculaire, à faible activité Gpx, dans les homogénats de plexus choroïdes « totaux ». Cette étude cinétique suggère que les Gpx ont un rôle majeur dans l'inactivation d' $H_2O_2$  par les plexus choroïdes puisque le facteur limitant de ce mécanisme d'inactivation est la diffusion du substrat à travers la membrane plasmique des cellules épithéliales choroïdiennes.

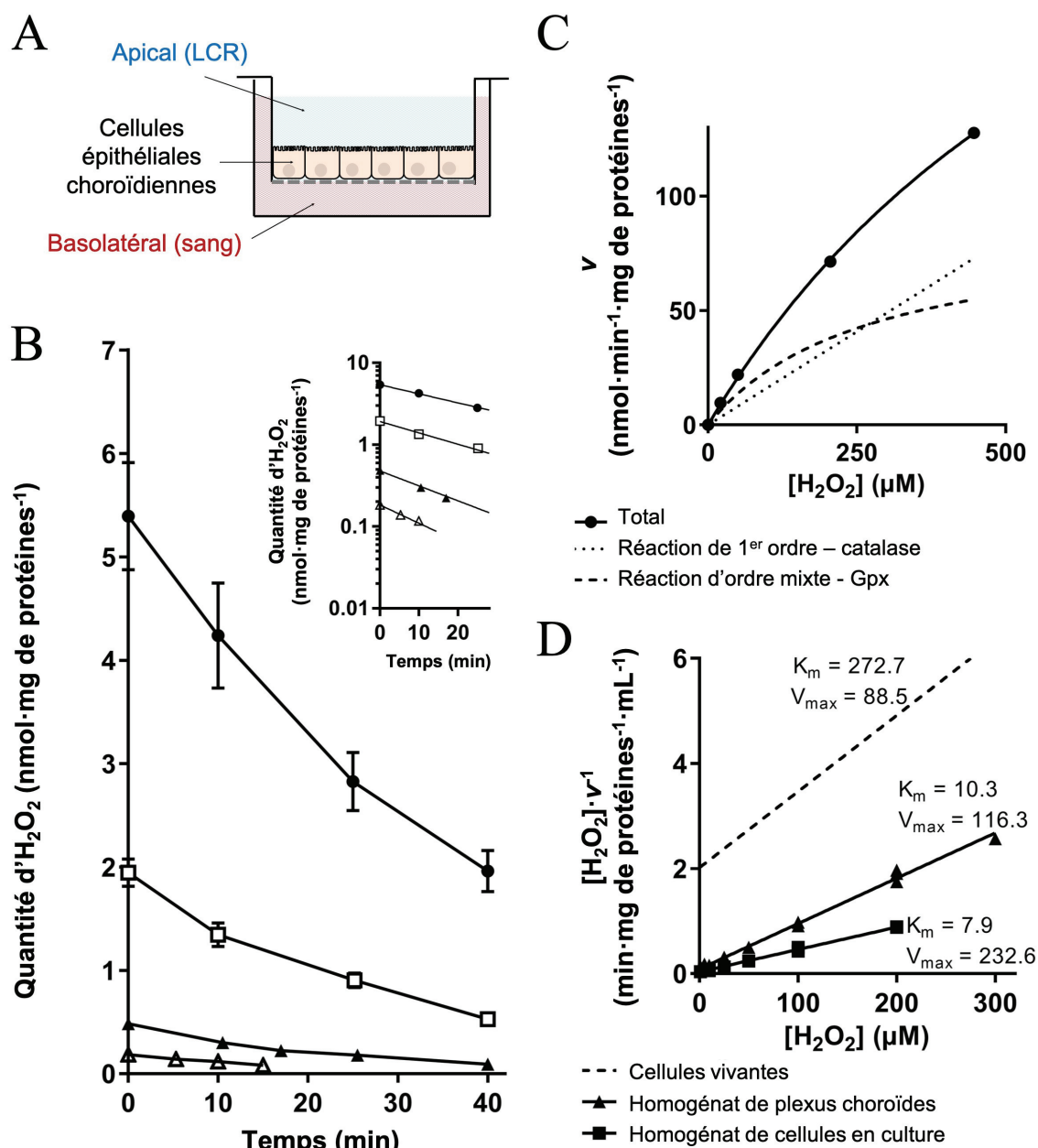
**Tableau 12 | Demi-vies d'élimination et vitesses d'élimination du peroxyde d'hydrogène dans les cellules épithéliales choroïdiennes.**

[H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] initiale (μM)	Quantité initiale d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (μmol·mg de protéines <sup>-1</sup> )	Constante d'élimination initiale $k_{el}$ (min <sup>-1</sup> )	Demi-vie d'élimination $t_{1/2}$ (min)	Vitesse d'élimination d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> v (nmol·min <sup>-1</sup> ·mg de protéines <sup>-1</sup> )		
				Total	Réaction de 1 <sup>er</sup> ordre (Catalase)	Réaction d'ordre mixte (Gpx)
446.7 ± 21.8	5.4 ± 0.5	0.0241	28.8	127.6	72.79	54.80
205.4 ± 16.3	1.9 ± 0.1	0.0371	18.7	71.4	33.46	37.95
50.2 ± 7.4	0.5 ± 0.0	0.0459	15.1	21.9	8.18	13.75
20.8 ± 0.7	0.2 ± 0.0	0.0521	13.3	9.6	3.38	6.26

Les concentrations et quantités initiales d' $H_2O_2$  sont exprimées en moyenne ± SE, N = 3.

Cf *Matériels et Méthode* §2.2.3 pour les définitions des différents paramètres d'élimination d' $H_2O_2$ .

Abréviations : Gpx : glutathion peroxydases.



**Figure 41 | Cinétique d'élimination du peroxyde d'hydrogène par les cellules épithéliales choroïdiennes de rats.**

**A.** Représentation schématique de la barrière sang – liquide céphalorachidien (LCR) choroïdienne *in vitro*. Les cellules épithéliales choroïdiennes sont cultivées sur un filtre poreux ; elles séparent un compartiment apical mimant le LCR et un compartiment basolatéral mimant le stroma et le sang.

**B.** Évolution de la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le milieu d'incubation au cours du temps en fonction de la concentration initiale d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les cellules épithéliales choroïdiennes ont été exposées à 20 ( $\Delta$ ), 50 ( $\blacktriangle$ ), 200 ( $\square$ ) ou 450 ( $\blacksquare$ )  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  pendant 15 min (pour 20  $\mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ou 40 min (pour les autres concentrations). La quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est exprimée en nmol·mg de protéines<sup>-1</sup> (moyenne  $\pm$  SE, N = 4 filtres recouverts de cellules). La quantité moyenne de protéines sur chaque filtre est

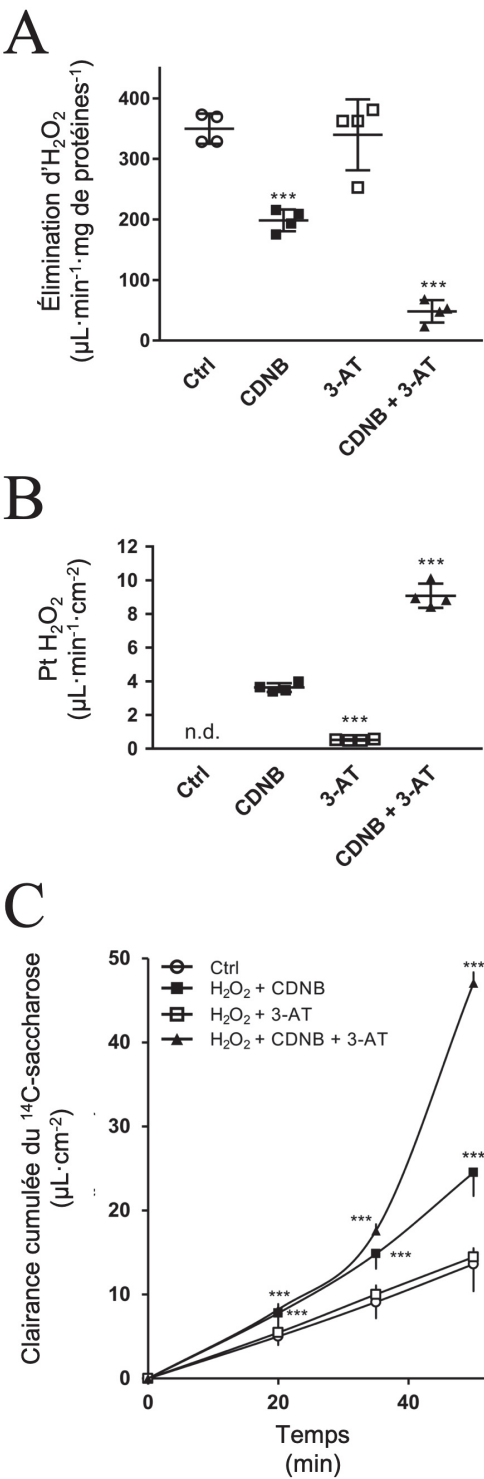
de  $0,129 \text{ mg}\cdot\text{cm}^2$ . *Insert* : Représentation semi-logarithmique des données obtenues au cours de la période initiale d'exposition à  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**C.** Vitesse initiale d'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$   $v$  en fonction de la concentration initiale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (*ligne continue*). Les vitesses initiales d'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$  attribuées à la catalase (*ligne pointillée*) et aux glutathion peroxydases (Gpx, *ligne discontinue*) ont été modélisées.

**D.** Représentation de Hanes-Woolf des paramètres cinétiques de l'activité Gpx dans les cellules épithéliales en culture calculés à partir de  $C$  (*ligne discontinue*). Ces paramètres ont également été mesurés dans des homogénats de plexus choroïdes (*ligne continue* ▲) et dans des homogénats de cellules épithéliales choroïdiennes cultivées *in vitro* (*ligne continue* ■) en utilisant la méthode de mesure spécifique de l'activité Gpx. Les valeurs  $K_m$  et  $V_{\max}$  sont exprimées en  $\mu\text{M}$  et en  $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}$  de protéines<sup>-1</sup>, respectivement.

Afin de s'assurer que les Gpx ont bien un rôle prépondérant dans l'inactivation choroïdienne d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , nous avons évalué la capacité des cellules épithéliales en culture à inactiver  $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence de différents inhibiteurs enzymatiques (*Figure 42A*). Les cellules en culture ont été traitées avec du 3-AT et/ou du CDNB, qui inhibent la catalase et les GPX respectivement. L'inhibition de la catalase n'a aucun effet sur la clairance d'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , alors que l'inhibition des Gpx diminue de façon substantielle ce paramètre. L'inhibition simultanée des deux systèmes enzymatiques abolit presque complètement la clairance d'élimination d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ce dernier résultat confirme l'efficacité du 3-AT à inhiber la catalase dans nos conditions expérimentales. Il suggère également que, lorsqu'il est utilisé seul, l'effet inhibiteur du 3-AT sur la catalase est compensé (et donc masqué) par l'importante activité de détoxification des Gpx.





**Figure 42 | Effets de l'inhibition de la catalase et des glutathion peroxydases sur l'élimination, le passage et la toxicité du peroxyde d'hydrogène dans la barrière sang – liquide céphalorachidien.**

Les cellules épithéliales choroïdiennes ont été préincubées avec 50 μM de 1,2-dichloro-4-nitrobenzène (CDNB), 10 mM de 3-aminotriazole (3-AT), ou les deux. Les cellules ont ensuite été exposées à 50 μM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence des inhibiteurs (CDNB et/ou 3-AT). Les milieux des compartiments apical et basolatéral ont été prélevés séparément après 20 min et leurs concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été mesurées. Les cellules contrôles (Ctrl) n'ont pas été traitées. **A.** Quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> éliminée après 20 min. Les résultats sont exprimés en volume de clairance d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (moyenne ± SD, N = 4). \*\*\*p ≤ 0.001 : statistiquement différent du volume de clairance dans la condition contrôle, analyse ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett. **B.** Passage d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> du compartiment basolatéral au compartiment apical au cours des 20 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en constante de perméabilité Pt (moyenne ± SD, N = 4). \*\*\*p ≤ 0.001 : statistiquement différent de la constante de perméabilité mesurée lorsque les cellules sont traitées avec le CDNB, analyse ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett. **C.** Evaluation de l'intégrité de la barrière sang – liquide céphalorachidien. Les cellules ont été pré-traitées avec les inhibiteurs enzymatiques (CDNB et/ou 3-AT) puis exposées à 50 μM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence des inhibiteurs et de [<sup>14</sup>C]-saccharose. Le passage du [<sup>14</sup>C]-saccharose du compartiment basolatéral au compartiment apical a été mesuré au cours de 3 périodes consécutives. Les résultats sont exprimés en clairance cumulée du [<sup>14</sup>C]-saccharose (moyenne ± SD, N = 3). \*\*\*p ≤ 0.001 : statistiquement différent des valeurs contrôles pour chaque intervalle de temps, analyse ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

Les cellules épithéliales choroïdiennes ont été préincubées avec 50 μM de 1,2-dichloro-4-nitrobenzène (CDNB), 10 mM de 3-aminotriazole (3-AT), ou les deux. Les cellules ont ensuite été exposées à 50 μM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence des inhibiteurs (CDNB et/ou 3-AT). Les milieux des compartiments apical et basolatéral ont été prélevés séparément après 20 min et leurs concentrations en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ont été mesurées. Les cellules contrôles (Ctrl) n'ont pas été traitées. **A.** Quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> éliminée après 20 min. Les résultats sont exprimés en volume de clairance d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (moyenne ± SD, N = 4). \*\*\*p ≤ 0.001 : statistiquement différent du volume de clairance dans la condition contrôle, analyse ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett. **B.** Passage d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> du compartiment basolatéral au compartiment apical au cours des 20 min d'incubation. Les résultats sont exprimés en constante de perméabilité Pt (moyenne ± SD, N = 4). \*\*\*p ≤ 0.001 : statistiquement différent de la constante de perméabilité mesurée lorsque les cellules sont traitées avec le CDNB, analyse ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett. **C.** Evaluation de l'intégrité de la barrière sang – liquide céphalorachidien. Les cellules ont été pré-traitées avec les inhibiteurs enzymatiques (CDNB et/ou 3-AT) puis exposées à 50 μM d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en présence des inhibiteurs et de [<sup>14</sup>C]-saccharose. Le passage du [<sup>14</sup>C]-saccharose du compartiment basolatéral au compartiment apical a été mesuré au cours de 3 périodes consécutives. Les résultats sont exprimés en clairance cumulée du [<sup>14</sup>C]-saccharose (moyenne ± SD, N = 3). \*\*\*p ≤ 0.001 : statistiquement différent des valeurs contrôles pour chaque intervalle de temps, analyse ANOVA à deux facteurs suivie d'un test de Dunnett.

### 1.1.2.3. Barrière enzymatique choroïdienne entre le sang et le liquide céphalorachidien envers le peroxyde d'hydrogène *in vitro*

La capacité de l'épithélium choroïdien à limiter le passage d' $\text{H}_2\text{O}_2$  entre le sang et le LCR a été évaluée sur le modèle cellulaire de barrière sang-LCR. Les cellules ont été exposées à leur pôle basolatéral à une concentration de  $50\ \mu\text{M}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , et le passage d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le compartiment supérieur a été mesuré (*Figure 42B*). Les cellules épithéliales choroïdiennes empêchent le flux basolatéral à apical d' $\text{H}_2\text{O}_2$  : le coefficient de perméabilité  $P_t$  est inférieur à  $0,1\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , qui est la limite de détection de la technique de quantification d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans ces conditions expérimentales.

L'utilisation du 3-AT et/ou du CDNB a permis d'étudier l'implication de la catalase et des Gpx dans ce phénomène de barrière (*Figure 42B*). L'inhibition de la catalase n'a qu'un effet très limité sur la perméabilité de l'épithélium choroïdien à  $\text{H}_2\text{O}_2$ , qui est alors à peine mesurable dans le compartiment apical. En revanche, l'inhibition des Gpx augmente significativement la perméabilité à  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Cette perméabilité est encore plus importante lorsque les cellules ont été traitées simultanément avec les inhibiteurs de Gpx et de catalase : le coefficient de perméabilité  $P_t$  est alors proche du coefficient de perméabilité mesuré sur des filtres sans cellules recouverts uniquement de laminine ( $12,5 \pm 0,5\ \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ , moyenne  $\pm$  SE,  $N = 3$ ). Ces résultats démontrent que les GPX jouent un rôle crucial dans la fonction de barrière de l'épithélium choroïdien envers l' $\text{H}_2\text{O}_2$  véhiculé par le sang.

Enfin, afin de tester la sensibilité des cellules épithéliales choroïdiennes à l' $\text{H}_2\text{O}_2$ , l'effet des traitements inhibiteurs 3-AT et/ou CDNB sur l'intégrité de la barrière a été évalué dans une expérience séparée en mesurant la perméabilité des cellules épithéliales choroïdiennes au saccharose, marqueur polaire de petit poids moléculaire non perméable, en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (*Figure 42C*). L' $\text{H}_2\text{O}_2$ , seul ou en association avec le 3-AT, n'a aucun effet sur la perméabilité au saccharose. Le CDNB, seul ou en association avec le 3-AT, augmente significativement la perméabilité au saccharose en présence d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . L'augmentation de perméabilité engendrée par le CDNB est déjà visible après 20 min d'exposition à  $\text{H}_2\text{O}_2$ , et est ensuite cumulative. Le CDNB en soi n'altère pas la perméabilité de la barrière choroïdienne lorsqu'il est appliqué en l'absence d' $\text{H}_2\text{O}_2$  sur une

période de 60 minutes (Gherzi-Egea et al., 2006). Ces résultats indiquent donc que, s'ils ne sont pas rapidement éliminés, quelques dizaines de micromolaires d' $\text{H}_2\text{O}_2$  suffisent à modifier l'intégrité de la barrière sang-LCR choroïdienne. Les GPX choroïdiennes sont donc importantes pour protéger la barrière sang-LCR des hydroperoxydes circulant dans le sang.

## 1.2. Discussion

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré que les plexus choroïdes présentent une activité Gpx élevée par rapport au parenchyme cérébral tout au long du développement postnatal chez le rat. Au cours des premiers jours de développement postnatal, l'activité Gpx choroïdienne est même supérieure à l'activité Gpx mesurée dans le foie. Des analyses par Western-blot et immunohistofluorescence ont mis en évidence l'expression choroïdienne spécifique des isoenzymes Gpx1 et Gpx4 chez le rat nouveau-né. Un niveau similaire d'activité Gpx et une immunopositivité Gpx1 avaient précédemment été décrits chez le rat et la souris adultes respectivement (Tayarani et al., 1989; Trépanier et al., 1996). Des expérimentations *ex vivo* et *in vitro* nous ont ensuite permis de démontrer que les plexus choroïdes du rat nouveau-né possèdent une importante capacité d'inactivation d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dépendante des Gpx. L'expression et la fonctionnalité élevées des Gpx dès les stades précoces de développement postnatal indiquent une maturation précoce du tissu choroïdien. Nos résultats montrent donc que les plexus choroïdes sont des structures cérébrales neuroprotectrices efficaces dès les stades précoces de développement postnatal alors même que le foie est encore immature pour sa fonction de détoxification. Il est intéressant de noter qu'il existe une différence d'activité hépatique Gpx entre les mâles et les femelles chez les rats subadultes (S5) et adultes (S12). Cette différence, déjà observée chez la souris adulte, est spécifique de cet organe car elle n'est pas observée dans les tissus cérébraux (Liang et al., 2011; Sverko et al., 2004).

Une analyse transcriptomique de l'expression des différentes isoenzymes de *Gpx* a montré que les *Gpx1* et *4* sont exprimées à haut niveau en comparaison des *Gpx2* et *3* dans les plexus choroïdes du rat en développement (Kratzer et al., 2013). Ces résultats transcriptomiques, associés à nos données immunohistologiques, suggèrent que les Gpx1 et 4 sont les principales isoenzymes responsables de l'importante activité Gpx choroïdienne mesurée au cours du développement. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est un substrat commun à l'ensemble des isoenzymes GPX (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013). La GPX1 peut également accepter comme substrat des hydroperoxydes solubles de faibles poids moléculaires comme l'hydroperoxyde de *tert*-butyle (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013).

La GPX1 est principalement impliquée dans la défense antioxydante ; les souris KO-*Gpx1* sont en effet très sensibles aux stress oxydants aigus (W.-H. Cheng et al., 1998). La GPX4 est capable de réduire à la fois des petits hydroperoxydes et des hydroperoxydes lipidiques plus complexes, y compris ceux insérés dans les membranes. Cette isoenzyme est impliquée dans divers processus physiologiques, tels que le contrôle de l'apoptose ou la synthèse des leucotriènes en régulant les activités 12,15- et 5-lipoxygénase respectivement (Brigelius-Flohé & Maiorino, 2013; Imai et al., 1998). Les deux isoenzymes GPX choroïdiennes semblent avoir des fonctions complémentaires, ce qui suggère que les plexus choroïdes pourraient être impliqués dans des processus physiologiques de signalisation et dans la détoxification des produits du stress oxydant.

Au cours de ce travail, nous avons démontré que l'expression élevée des Gpx choroïdiennes est bien corrélée à une remarquable capacité de détoxification d' $\text{H}_2\text{O}_2$  des plexus choroïdes isolés vivants chez le rat. Cependant, la catalase et les peroxyrédoxines sont également capables de réduire l' $\text{H}_2\text{O}_2$ . La catalase peut participer à la détoxification d' $\text{H}_2\text{O}_2$ , en particulier dans le peroxysome. Cette enzyme présente toutefois une affinité pour l' $\text{H}_2\text{O}_2$  nettement moins forte que les GPX ( $K_m \text{ catalase} = \sim 1 \text{ M}$ ) (Jones & Suggett, 1968). Les peroxyrédoxines interviennent plutôt dans la détection du statut redox de la cellule que dans la détoxification d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Il est peu probable que les peroxyrédoxines aient pu participer à l'activité peroxydase GSH-dépendante mesurée dans les plexus choroïdes étant donné que les peroxyrédoxines n'utilisent pas le GSH comme cosubstrat et ont une constante catalytique inférieure de trois ordres de grandeur à celle des GPX (Hofmann et al., 2002; Saccoccia et al., 2014). Notre travail a montré que les GPX sont les principales enzymes impliquées dans l'inactivation choroïdienne d' $\text{H}_2\text{O}_2$  pour des concentrations allant jusqu'à  $250 \mu\text{M}$ .

L'importante capacité choroïdienne de détoxification des hydroperoxydes peut avoir plusieurs fonctions.

Premièrement, l'activité peroxydase peut permettre la **protection du plexus choroïde lui-même envers le stress oxydant produit *in situ***. Les cellules épithéliales choroïdiennes ont en effet une demande énergétique élevée liée à leur importante activité métabolique. Par exemple, ces cellules maintiennent l'étanchéité de la barrière sang-LCR,

sécrètent le LCR, synthétisent et sécrètent des polypeptides impliqués dans le développement du cerveau et la régulation neuroimmune, et possèdent de multiples processus de transport dépendants de l'ATP (Gherzi-Egea, Strazielle, et al., 2018). Les cellules épithéliales choroïdiennes possèdent un nombre élevé de mitochondries qui leur permet de répondre à ces besoins énergétiques importants (Cornford et al., 1997); la phosphorylation oxydative génère cependant des quantités importantes d' $\text{H}_2\text{O}_2$  et d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Les GPX choroïdiennes pourraient intervenir dans l'élimination de ces ERO. *In vitro*, l'exposition des cellules épithéliales choroïdiennes à des taux élevés d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Xiang et al., 2012), ou à un taux modéré d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en présence d'un inhibiteur des GPX (nos données), induit une altération de l'étanchéité de la barrière sang-LCR. Le contrôle de la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les cellules épithéliales choroïdiennes est donc essentiel au maintien de l'intégrité de la barrière sang-LCR. Les GPX choroïdiennes sont également capables d'empêcher la propagation de la peroxydation lipidique et la formation de sous-produits toxiques (e.g. malondialdéhyde) (Ayala et al., 2014).

Deuxièmement, la forte capacité d'inactivation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  du tissu choroïdien peut participer à la **terminaison du signal d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ou des hydroperoxydes lipidiques** lorsqu'ils sont libérés en conditions non-pathologiques. Pendant le développement du cerveau,  $\text{H}_2\text{O}_2$  est un médiateur de signalisation intra- et intercellulaire impliqué dans le développement et la prolifération des cellules, le guidage axonal, la transmission synaptique GABAergique, et dans la régulation de la mort cellulaire par contrôle des processus redox cellulaires (Avshalumov et al., 2003; Bienert et al., 2006; Gauron et al., 2016; Safiulina et al., 2006). La diffusion ou le drainage des hydroperoxydes dans le LCR à partir du liquide interstitiel cérébral, couplés à leurs inactivations par les plexus choroïde, peuvent participer au contrôle des niveaux extracellulaires d'hydroperoxydes. Au cours du développement cérébral, cette fonction choroïdienne peut être essentielle car les capacités réductrices des cellules gliales ne sont pas encore pleinement fonctionnelles et le volume occupé par le LCR dans la cavité crânienne est proportionnellement plus élevé que chez l'adulte (Gherzi-Egea et al., 2015).

Troisièmement, la capacité des GPX choroïdiennes à inactiver les hydroperoxydes représente un mécanisme puissant de **neuroprotection contre le stress oxydant central**. Le stress oxydant est une composante commune aux événements oxydatifs,

inflammatoires, infectieux ou toxiques. Les effets nocifs de l'exposition du cerveau en développement à des concentrations supra-physiologiques d' $\text{H}_2\text{O}_2$  ont été mis en évidence dans diverses pathologies. Les personnes atteintes du syndrome de Down souffrent très tôt d'un stress oxydant excessif ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) lié à une suractivité de la superoxyde dismutase (Muchová et al., 2014). Chez les nouveau-nés ayant souffert d'asphyxie, la survenue d'une encéphalopathie est plus fréquente lorsque les taux d'hydroperoxydes dans le LCR sont élevés (Hussein et al., 2010). Les taux d'ERO, y compris  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sont élevés dans le LCR des nouveau-nés et des enfants souffrant de méningites bactériennes aiguës ; les patients ayant les taux les plus élevés d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le LCR sont plus susceptibles de développer des séquelles neurologiques (Jain et al., 2000). Des expérimentations réalisées *ex vivo* chez le rat ont montré que l' $\text{H}_2\text{O}_2$  généré au cours d'une infection bactérienne pouvait entraîner des modifications de l'épendyme bordant les ventricules cérébraux comme une inhibition de l'activité ciliaire (Hirst et al., 2000). Cette inhibition peut affecter la maturation du système ventriculaire et être nuisible aux progéniteurs neuraux présents dans les régions sous-épendymaires et contribuant à la gliogenèse et à la neurogenèse au cours du développement. En réduisant la concentration d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les liquides cérébraux sous son niveau toxique, les plexus choroïdes contribuent à limiter les dommages cérébraux induits par cette ERO lors des phénomènes inflammatoires, infectieux ou hypoxiques, ou lors de l'exposition à un médicament ou un toxique au cours de la période périnatale.

Peu d'études ont mesuré expérimentalement la concentration d' $\text{H}_2\text{O}_2$  dans les liquides cérébraux au cours de stress oxydants, inflammatoires ou infectieux. La microdialyse a été utilisée pour mesurer *in vivo* l'évolution de la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  dans le striatum chez le rat et la gerbille adultes au cours d'un épisode d'ischémie-reperfusion (Hyslop et al., 1995; Lei et al., 1998). Chez le rat, la concentration basale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est de  $\sim 20 \mu\text{M}$  et augmente à  $\sim 70\text{-}120 \mu\text{M}$  après un épisode ischémique de 30 min suivi de 30 min de reperfusion (Hyslop et al., 1995). Chez la gerbille, la concentration basale d' $\text{H}_2\text{O}_2$  est de  $\sim 1\text{-}2 \mu\text{M}$  et double après un épisode ischémique de 5 min suivi de 10 min de reperfusion (Lei et al., 1998). Chez l'homme, les concentrations d' $\text{H}_2\text{O}_2$  mesurées dans des prélèvements de LCR au cours de pathologies pédiatriques sont de l'ordre de plusieurs dizaines de micromolaires (Jain et al., 2000). Ces données, relativement limitées,

suggèrent que l'intervalle de concentration en  $H_2O_2$  dans lequel les GPX choroïdiennes sont les plus efficaces (moins de 250  $\mu M$ ) est pertinent avec les niveaux physiopathologiques d' $H_2O_2$  libérés dans les liquides cérébraux lors d'un événement pathologique postnatal. Le seuil de concentration au-dessus duquel l' $H_2O_2$  devient toxique *in vivo* n'est pas connu. Une concentration d' $H_2O_2$  de l'ordre de  $\sim 50 \mu M$  est toxique pour les cellules nerveuses *in vitro* (Gülden et al., 2010) ; *in vivo*, les effets neurotoxiques médiés par  $H_2O_2$  sont susceptibles de se produire à des concentrations plus faibles en raison de la génération du radical hydroxyle  $\cdot OH$ . Ce radical, hautement réactif, est formé en présence d'ion ferrique par la réaction non-enzymatique de Fenton, qui peut se produire dans le LCR (Spasojević et al., 2010).

Le sang véhicule par ailleurs de faibles quantités d' $H_2O_2$  (Forman et al., 2016; Halliwell et al., 2000) ; divers stress périphériques peuvent augmenter les niveaux d'hydroperoxydes dans le plasma. Les nourrissons atteints de sepsis présentent des concentrations sanguines en  $H_2O_2$  de  $\sim 35 \mu M$  ; ces concentrations sont plus de six fois supérieures à celles mesurées chez des nourrissons en bonne santé (Pherwani et al., 1999). Au cours de ce travail, nous avons montré que l'épithélium choroïdien forme une barrière enzymatique empêchant la diffusion de l' $H_2O_2$  véhiculé par le sang dans le LCR et plus largement dans le cerveau. Cette barrière enzymatique pourrait avoir un rôle particulièrement important au cours du développement, car les plexus choroïdes sont alors une voie d'entrée majeure dans le cerveau pour les molécules circulant dans le sang (Gherzi-Egea, Saudrais, et al., 2018).

La comparaison des paramètres cinétiques régissant l'élimination d' $H_2O_2$  Gpx-dépendante dans les cellules vivantes et dans les homogénats tissulaires indique que la perméabilité à  $H_2O_2$  de la membrane des cellules épithéliales choroïdienne est l'étape limitant son élimination. Le mécanisme par lequel  $H_2O_2$  traverse la membrane des cellules épithéliales reste à déterminer. L' $H_2O_2$  pourrait traverser la membrane plasmique par simple diffusion ou par diffusion facilitée à l'aide de protéines canaux de la superfamille des AQP comme l'AQP1 (Bienert & Chaumont, 2014; Bienert et al., 2006). Le canal AQP1 participe au transport de l'eau au cours de la sécrétion du LCR (Praetorius & Damkier, 2017). L'AQP1 est localisée sur la membrane apicale des cellules épithéliales



choroïdiennes et, en moindre mesure, sur la membrane basolatérale (Praetorius & Damkier, 2017). Au cours de nos essais, aucune différence dans le taux d'inactivation d' $\text{H}_2\text{O}_2$  n'a été observée entre les conditions d'exposition apicale et basolatérale. Ce résultat suggère que la diffusion simple plutôt que la diffusion facilitée AQP1-dépendante permet le passage de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  extracellulaire au compartiment intracellulaire.

En conclusion, ce travail a permis d'identifier les plexus choroïdes comme des sites majeurs d'inactivation des hydroperoxydes dans le cerveau pendant la période postnatale, et a montré que les GPX sont les principales enzymes responsables de cette inactivation. L'importante activité peroxydase choroïdienne est un élément de la barrière enzymatique choroïdienne. Cette barrière enzymatique est efficace dès les stades précoces de développement postnatal et pourrait donc avoir un rôle prépondérant dans l'inactivation des niveaux supra-physiologiques d'hydroperoxydes générés lors d'évènements pathologiques péri- et postnataux. Les GPX choroïdiennes semblent également essentielles au maintien de l'intégrité de la barrière sang-LCR, en détoxifiant les ERO produites par le métabolisme basal de cette interface hautement énergétique.

## 2. Glutathion transférases choroïdiennes : protection de l'environnement liquidien cérébral envers les xénobiotiques circulant dans le sang au cours de la période périnatale

### 2.1. Résultats

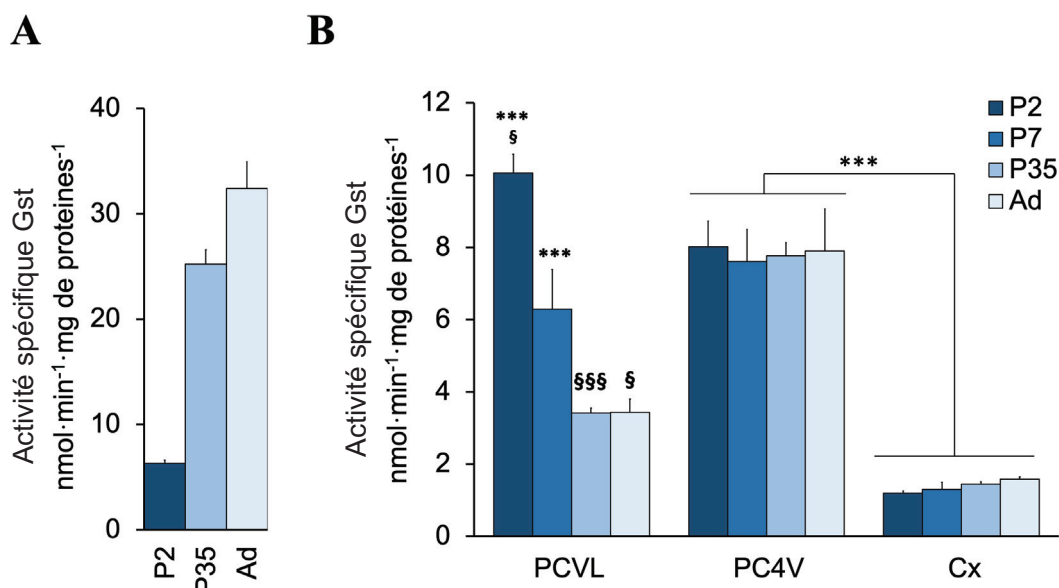
#### 2.1.1. Description du système de détoxification choroïdien dépendant des glutathion transférases

##### 2.1.1.1. Activités enzymatiques

L'activité spécifique Gst envers le MCB a été mesurée dans les tissus cérébraux et par comparaison dans le foie chez le rat à différents stades de développement (*Figure 43*). Le MCB est un substrat commun à l'ensemble des isoenzymes de Gst impliquées dans la détoxification des xénobiotiques (Eklund et al., 2002; Hayes et al., 2005).

Le foie est l'organe de référence en termes de métabolisme enzymatique. Au stade P2, l'activité Gst hépatique est de  $6,3 \pm 0,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  (moyenne  $\pm$  SE), soit quatre fois inférieure à l'activité Gst mesurée à P35. Cette augmentation importante de l'activité Gst hépatique au cours du développement postnatal indique une relative immaturité du foie à la naissance chez le rat. Chez l'adulte, l'activité Gst atteint  $32,4 \pm 2,6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  (moyenne  $\pm$  SE) chez les mâles.

Au stade P2, l'activité spécifique Gst choroïdienne est déjà élevée dans les deux types de plexus choroïdes, et est huit à dix fois supérieure à l'activité mesurée dans le cortex cérébral. Entre les stades P2 et P35, l'activité Gst mesurée dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux diminue progressivement, pour atteindre  $3,4 \pm 0,1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  (moyenne  $\pm$  SE) ; cette activité se maintient ensuite chez l'adulte. Entre les stades P2 et adulte, l'activité Gst mesurée dans le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule est stable ( $\sim 8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$ ) et reste significativement supérieure à l'activité mesurée dans le cortex cérébral.



**Figure 43 | Activités glutathion transférases dans les tissus cérébraux et dans le foie chez le rat au cours du développement postnatal.**

L'activité spécifique glutathion transférase (Gst) envers le monochlorobimane a été mesurée dans des homogénats de foie (A) et de tissus cérébraux (B) préparés à partir de rats de 2, 7 ou 35 jours postnatal et d'adultes. Les animaux n'ont pas été sexés avant le sevrage ; après le sevrage (stades 35 jours postnatal et adulte), les analyses ont été réalisées sur des mâles uniquement. L'activité spécifique Gst est exprimée sous forme de moyenne  $\pm$  SE (N = 4-8).

\*\*\*p < 0,001 : statistiquement différent de l'activité mesurée dans le cortex cérébral au même stade de développement, one-way ANOVA suivi d'une analyse post-hoc Tukey-Kramer. §p < 0,05, §§§p < 0,001 : statistiquement différent de l'activité mesurée dans le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule au même stade de développement, test t de Student bilatéral.

Abréviations : Ad : adulte, Cx : cortex cérébral, P2 : 2 jours postnatal, P7 : 7 jours postnatal, P35 : 35 jours postnatal, PC4V : plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCVL : plexus choroïdes des ventricules latéraux.

Une étude de compétition réalisée avec l'aide d'Ouliana Barnéoud-Rousset, étudiante EPHE, montre par ailleurs que les Gst choroïdiennes sont capables de prendre en charge de nombreux substrats (*Tableau 13*). Ces résultats suggèrent que l'activité Gst mesurée dans les plexus choroïdes est générée par plusieurs isoenzymes.

**Tableau 13 | Inhibition de l'activité glutathion transférase choroïdienne envers le 1,2-dichloro-4-nitrobenzène en présence de toxiques environnementaux et de molécules pharmacologiques.**

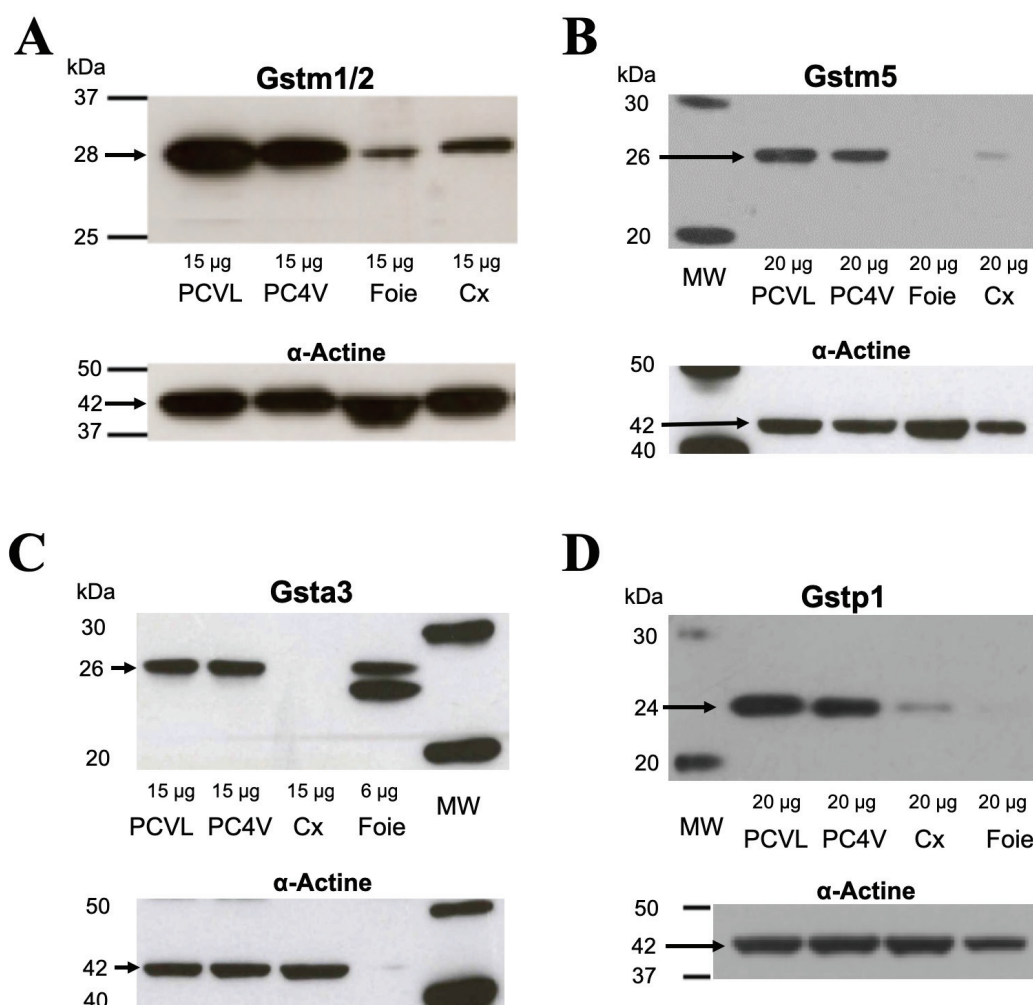
Substrat potentiel		Concentration du substrat de référence (µM)	Pourcentage d'inhibition	
Nom	Concentration (µM)		PC4V	PCVL
Acide éthacrynique	5	200	91,7 ± 1,5	81,2 ± 4,9
Bromosulphthaléine	40	200	72,0 ± 3,5	73,3 ± 3,8
Ménadione	80	200	41,2 ± 7,4	50,0 ± 19,5
Monochlorobimane	200	200	77,7 ± 1,5	82,7 ± 2,1
Chlorambucile	200	200	83,5 ± 3,8	84,6 ± 2,7
Benzyl-isothiocyanate	500	200	84,7 ± 3,2	79,5 ± 6,7
Sulforaphane	200	50	26,7 ± 5,5	19,5 ± 6,2
Trans-4-phenyl-3-butèn-2-one	500	50	58,1 ± 7,0	53,5 ± 6,9
Acroléine	500	50	53,4 ± 10,1	48,4 ± 10,3
Cisplatine	500	50	41,5 ± 9,3	27,7 ± 10,3

Les substrats potentiels des glutathion transférases (Gst) incluent des médicaments (*vert*), des compléments alimentaires et des agents aromatisants (*bleu*), des produits extraits de plantes (*marron*), et des polluants environnementaux (*rouge*). Le 1,2-dichloro-4-nitrobenzène (CDNB) a été utilisé comme substrat de référence dans ces essais de compétition ; c'est un substrat commun à l'ensemble des isoenzymes de Gst impliquées dans la détoxification des xénobiotiques. La concentration de ce substrat de référence a été fixée à 200 µM. Lorsqu'un composé ne générerait qu'une faible inhibition, la concentration du CDBN a été baissée à 50 µM pour augmenter l'action inhibitrice du composé.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (N = 3 à 4, à partir de différents pools de plexus choroïdes).

En absence d'inhibiteur, les activités spécifiques Gst mesurées dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux étaient de  $96 \pm 22 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  et  $54 \pm 10 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  pour 200 µM et 50 µM de CDBN respectivement. Dans les mêmes conditions, les activités spécifiques Gst mesurées dans le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule étaient de  $87 \pm 15 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  et  $48 \pm 10 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de protéines}^{-1}$  (moyenne ± SD, N=3). Les échantillons tissulaires ont été prélevés sur des animaux de 2 jours postnatal.

### 2.1.1.2. Expressions protéiques des isoenzymes de glutathion transférases



**Figure 44 | Analyse par Western-blot de l'expression protéique de différentes sous-unités de glutathion transférase dans les tissus cérébraux et dans le foie chez le rat au cours du développement postnatal.**

Les tissus ont été isolés à partir d'animaux de 2 (A, C, D) et 9 jours (B) postnatal. A. La sous-unité Gstm1/2 est exprimée de façon importante dans les deux types de plexus choroïdes, dans le cortex cérébral et dans le foie. L'anticorps utilisé ne permet pas de distinguer les sous-unités Gstm1 et m2. B. La sous-unité Gstm5 est exprimée au même niveau dans les deux types de plexus choroïdes. L'expression de Gstm5 détectée dans les tissus choroïdiens est bien supérieure à celle détectée dans le cortex cérébral et dans le foie. C. La sous-unité Gsta3 est abondante dans le tissu choroïdien en comparaison du cortex cérébral. Cette sous-unité est également bien exprimée dans le foie. D. La sous-unité Gstp1 est abondante dans le tissu choroïdien en comparaison du cortex cérébral et du foie. Toutes les analyses Western-blot ont été répétées sur 2 lots d'échantillons différents.

Abréviations : Cx : cortex cérébral, MW : marqueurs de poids moléculaires (*molecular weight*), PC4V : plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCVL : plexus choroïdes des ventricules latéraux.

Afin de déterminer les isoenzymes de Gst responsables de l'importante activité Gst choroïdienne au stade périnatal, nous avons étudié l'expression protéique de différentes sous-unités de Gst par Western-blot.

L'expression protéique des sous-unités Gstm1, m2, m5, a3 et p1 dans les tissus choroïdiens aux stades précoces de développement a été démontrée par Western-blot (*Figure 44*). Ces sous-unités présentent une expression protéique plus importante dans les plexus choroïdes que dans le cortex cérébral. L'expression protéique choroïdienne de ces sous-unités est également supérieure à l'expression hépatique, à l'exception de la sous-unité Gsta3. La Gstm5 ne présente pas de différence d'expression protéique entre les plexus choroïdes des ventricules latéraux et du 4<sup>ème</sup> ventricule.

Ces résultats suggèrent que l'importante activité de conjugaison mesurée dans les plexus choroïdes au cours du développement postnatal peut être catalysée par les isoenzymes Gstm1-1, m2-2, a3-3 et p1-1.

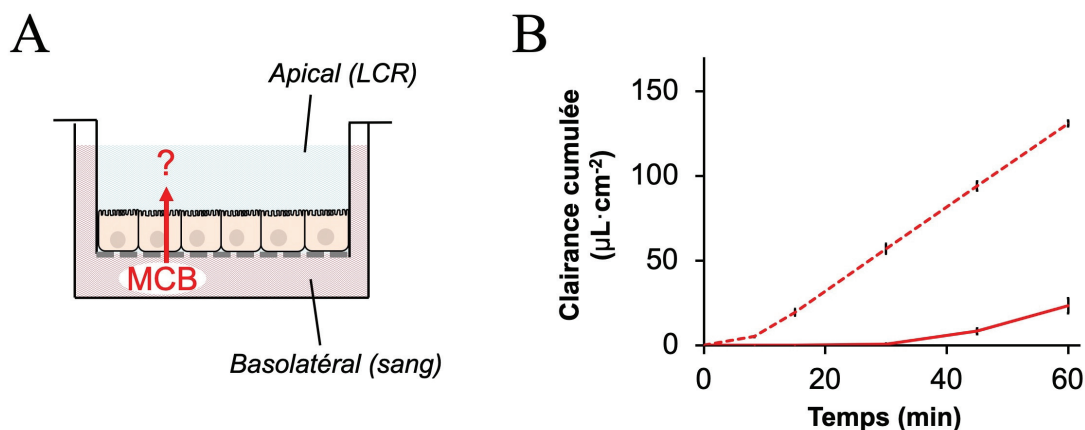
### 2.1.2. Efficacité du système de détoxification choroïdien dépendant des glutathion transférases

#### 2.1.2.1. Perméabilité de la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne au monochlorobimane *in vitro*

Des travaux préliminaires réalisés au sein du laboratoire par Kati Mönkkönen et Ingrid Kratzer ont montré que les plexus choroïdes d'animaux en développement présentaient une activité Gst envers le MCB *ex vivo*. Cette activité était localisée au niveau des cellules épithéliales choroïdiennes, et le conjugué au GSH formé semblait excrété au pôle basolatéral de ces cellules.

L'activité Gst choroïdienne étant localisée au niveau des cellules épithéliales choroïdiennes, nous avons utilisé un modèle cellulaire de la barrière sang-LCR choroïdienne pour étudier l'activité de conjugaison des Gst choroïdiennes, et caractériser l'excrétion des conjugués au GSH formés. Les caractéristiques de ce modèle sont détaillées dans la partie *Résultats §1.1.2.2* et dans la *Figure 32*. En particulier, les cellules

en culture conservent l'importante activité Gst mesurée sur les homogénats de plexus choroïdes (Strazielle & Gherzi-Egea, 1999; Strazielle & Preston, 2003).



**Figure 45 | Les cellules épithéliales choroïdiennes en culture forment une barrière prévenant le passage du monochlorobimane du compartiment basolatéral au compartiment apical.**

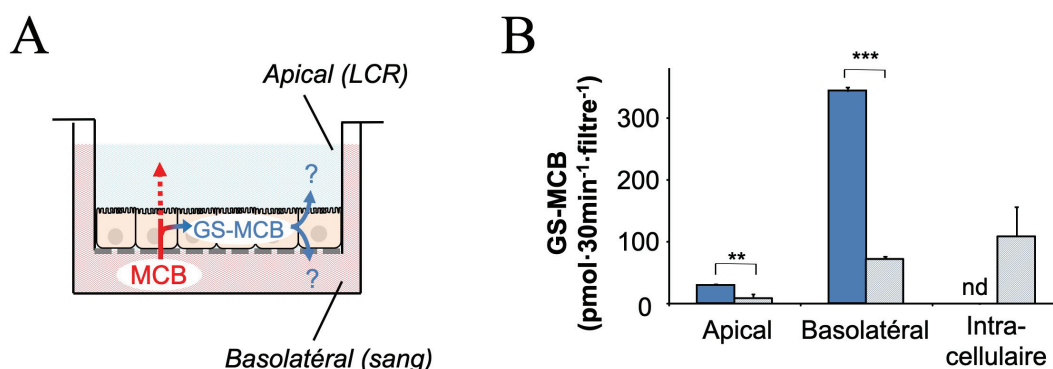
**A.** Illustration du modèle cellulaire bicompartimental permettant l'étude de la perméabilité de la barrière sang – liquide céphalorachidien (LCR) au monochlorobimane (MCB). Les cellules sont exposées au MCB (5 ou 50  $\mu\text{M}$ ) par leur pôle basolatéral. L'évolution de la concentration du MCB dans le compartiment accepteur (apical) est mesurée par chromatographie liquide à haute performance.

**B.** Lorsque les cellules sont exposées à une concentration de 5  $\mu\text{M}$  de MCB (*ligne continue*), le passage du MCB dans le compartiment apical est nul pendant 30 min, puis reste faible ensuite. Lorsque les cellules sont exposées à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  de MCB (*ligne pointillée*), l'effet barrière ne dure que 10 min ; la clairance du MCB augmente ensuite de façon importante.

Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SE (N=4).

Nous avons d'abord étudié la capacité des cellules épithéliales choroïdiennes en culture à limiter le passage d'un substrat des GST, le MCB, du compartiment basolatéral au compartiment apical (*Figure 45*). Lorsque les cellules sont exposées à une concentration de 5  $\mu\text{M}$  de MCB, la diffusion de ce composé à travers l'épithélium choroïdien est nulle durant les 30 premières minutes de l'exposition puis reste très faible. Pendant toute la durée de l'expérimentation (60 min), la clairance du MCB est en effet inférieure à la clairance du saccharose, marqueur de la perméabilité paracellulaire ( $\text{Pe} = 0,43 \pm 0,01 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$ , moyenne  $\pm$  SE). Ce résultat suggère que l'épithélium

choroïdien forme une barrière enzymatique qui prévient le passage du MCB du compartiment basolatéral au compartiment apical en le conjuguant. Lorsque les cellules sont exposées à une concentration de 50  $\mu\text{M}$  de MCB, l'effet barrière est annulé après une dizaine de minutes.



**Figure 46 | Les cellules épithéliales choroïdiennes en culture forment une barrière enzymatique.**

**A.** Illustration du modèle cellulaire bicompartimental permettant l'étude de l'excrétion du monochlorobimane conjugué au glutathion (GS-MCB) par barrière sang – liquide céphalorachidien (LCR) choroïdienne. Les cellules sont exposées au monochlorobimane (MCB, 5  $\mu\text{M}$ , 30 min) par leur pôle basolatéral, avec ou sans préincubation avec du probénécide (3 mM). L'apparition du GS-MCB dans les compartiments apical, basolatéral et intracellulaire est mesurée par spectrofluorimétrie.

**B.** En présence de MCB (*barres bleu foncé*), les cellules épithéliales en culture produisent du GS-MCB qui est très majoritairement excrété dans le compartiment basolatéral. Le GS-MCB n'est pas détecté dans le compartiment intracellulaire. Lorsque les cellules sont préincubées avec du probénécide avant d'être exposées au MCB (*barres bleu clair*), l'excrétion du GS-MCB est fortement réduite aux pôles apical et basolatéral, et le GS-MCB s'accumule dans le compartiment intracellulaire. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne  $\pm$  SE (N=4). Ces résultats sont représentatifs de trois expérimentations réalisées avec des préparations cellulaires différentes. \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 : test t de Student unilatéral pour variances inégales.

Abréviations : nd : non détecté.

Afin de confirmer que l'épithélium choroïdien forme une barrière au passage du MCB par un mécanisme de conjugaison au GSH, nous avons mesuré les taux de GS-MCB par spectrofluorimétrie dans les compartiments apical et basolatéral ainsi que dans les cellules

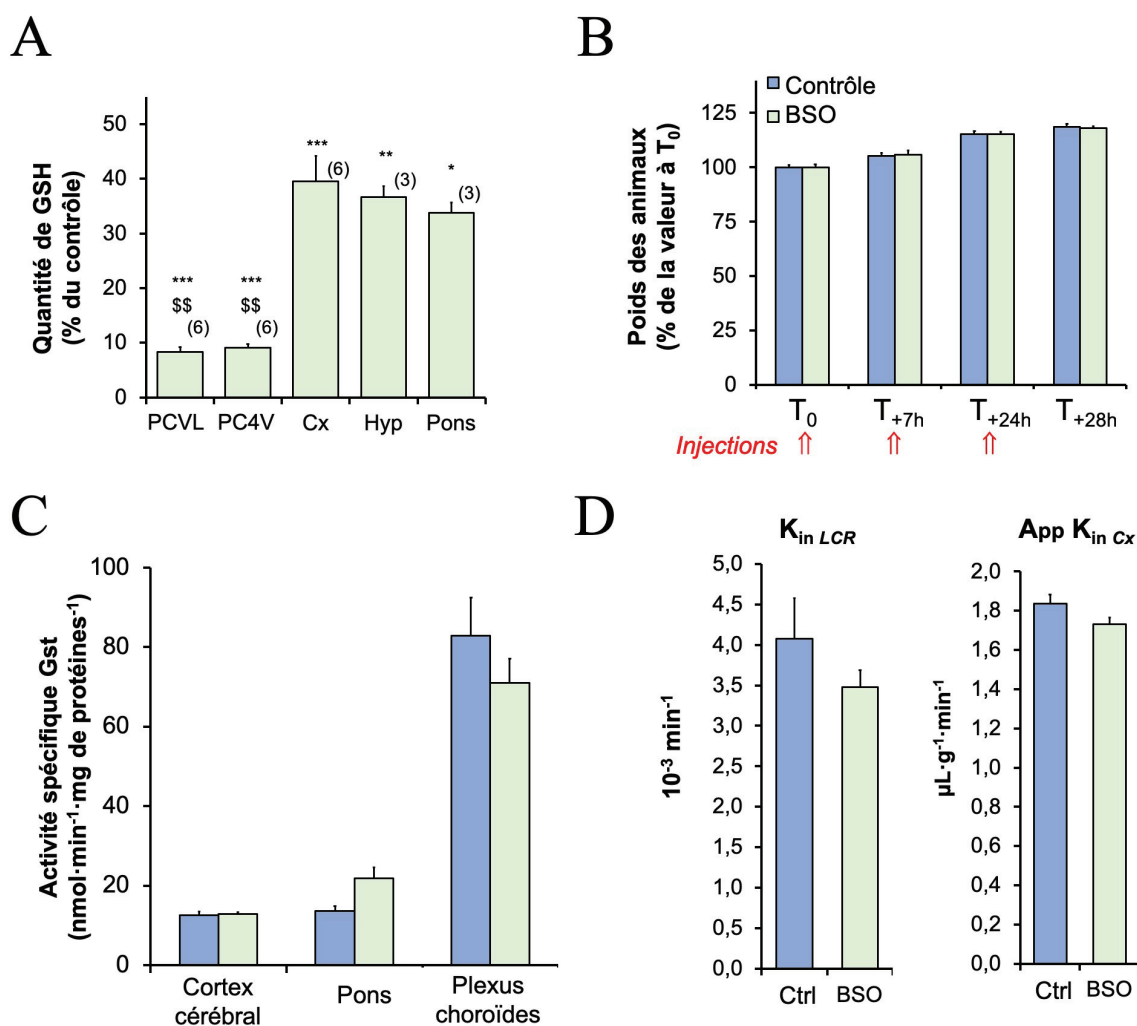


épithéliales après 30 min d'exposition au MCB (5  $\mu$ M) (*Figure 46A*). Le GS-MCB est bien produit par les cellules épithéliales choroïdiennes et est excrété dans les compartiments apical et basolatéral ; l'excrétion du GS-MCB est dix fois plus importante à la membrane basolatérale (*Figure 46B*). La concentration intracellulaire en GS-MCB est inférieure à la limite de détection. Lorsque les cellules sont exposées à 50  $\mu$ M de MCB, l'excrétion du GS-MCB est fortement augmentée et reste polarisée vers le compartiment basolatéral. Lorsque les cellules sont prétraitées avec le probénécide, inhibiteur des transporteurs d'anions organiques, l'excrétion du conjugué diminue de façon importante aux membranes apicale et basolatérale, et la concentration intracellulaire augmente (*Figure 46B*). Collectivement, ces résultats confirment que les Gst sont impliquées dans l'effet barrière observé envers le MCB et indiquent que le mécanisme d'excrétion du GS-MCB, à forte capacité, implique des transporteurs d'anions organiques aux deux membranes.

### 2.1.2.1. Perméabilité de la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne au chlorodinitrobenzène *in vivo*

L'efficacité des Gst choroïdiennes à protéger le LCR des xénobiotiques circulant dans le sang au cours de la période postnatale a ensuite été étudiée *in vivo* chez le rat. Pour cela, la perméabilité sang-LCR au CDNB a été mesurée chez des rats présentant une capacité choroïdienne de conjugaison au GSH normale ou réduite.

Le CDNB est un substrat commun à l'ensemble des isoenzymes de Gst détectées dans les plexus choroïdes. Comparé au MCB, le CDNB a l'avantage de pouvoir être facilement dosé dans les fluides biologiques (CLHP), et d'être soluble à haute concentration. L'utilisation du CDNB à haute concentration (500  $\mu$ M) permet d'approcher la capacité maximale de conjugaison au GSH de la barrière sang-LCR.



**Figure 47 | Caractérisation des animaux ayant une diminution de la quantité de glutathion réduit choroïdien.**

**A.** Niveaux tissulaires de glutathion réduit (GSH) chez les animaux traités avec le DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO). Le tissu choroïdien est appauvri de plus de 90 % en GSH alors que les autres tissus cérébraux étudiés ne sont appauvris que de 65 à 70 %. La quantité de GSH a été calculée en  $\mu\text{M} \cdot \text{mg de tissu}^{-1}$  et est exprimée en pourcentage par rapport à la valeur mesurée sur les animaux contrôles (traités avec le véhicule) (moyenne  $\pm$  SE, (N)). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  : statistiquement différent de la quantité de GSH mesurée dans les tissus des animaux contrôles, test t de Student bilatéral. \$\$p < 0,01 : statistiquement différent de la quantité de GSH mesurée dans le cortex cérébral, l'hypothalamus et le pons, test t de Student bilatéral.

**B.** Évolution du poids des animaux après traitement au BSO. Le traitement est initié à T<sub>0</sub> chez des animaux de deux jours postnatal ; il comporte trois injections de BSO ou de véhicule (animaux contrôles). Les animaux sont sacrifiés 4h après la dernière injection (T<sub>+28h</sub>). Le poids des animaux

est exprimé en pourcentage du poids mesuré à  $T_0$  (moyenne  $\pm$  SE,  $N=6$ ). Aucune différence n'a été observée entre les deux groupes d'animaux.

**C.** Activités spécifiques Gst mesurées envers le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB) dans des homogénats tissulaires prélevés sur des animaux contrôles (*bleu*) ou traités avec le BSO (*vert*) (moyenne  $\pm$  SE,  $N=3$ ). Le traitement avec le BSO ne modifie pas l'activité spécifique Gst.

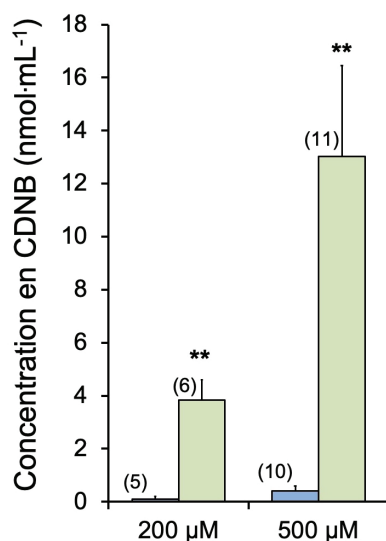
**D.** Constante de perméabilité sang – liquide céphalorachidien ( $K_{in\ LCR}$ ) et constante apparente de perméabilité sang – cortex cérébral ( $App\ K_{in\ Cx}$ ) au  $[^{14}C]$ -saccharose chez les animaux contrôles (*bleu*) et traités avec le BSO (*vert*) (moyenne  $\pm$  SE,  $N=5$ ). Le traitement au BSO ne modifie pas la perméabilité au  $[^{14}C]$ -saccharose, ce qui indique que l'intégrité des interfaces sang-cerveau et sang – liquide céphalorachidien est préservée.

Abréviations : BSO : DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine, Cx : cortex cérébral, GSH : glutathion réduit, Gst : glutathion transférases, Hyp : hypothalamus, LCR : liquide céphalorachidien, PC4V : plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCVL : plexus choroïdes des ventricules latéraux.

Les animaux fonctionnellement inhibés pour l'activité Gst choroïdienne ont été obtenus par trois injections intrapéritonéales de BSO réparties sur 2 jours (*cf Matériels & Méthodes §1.2.3*). Le BSO inhibe sélectivement la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase qui catalyse la première étape, limitante, de la synthèse du GSH (Rae & Williams, 2017). Quatre heures après la dernière injection, la quantité de GSH dans la barrière sang-LCR choroïdienne est réduite de 92 %, contre 60 à 65 % dans les autres structures cérébrales étudiées (*Figure 47A*). Les Gst choroïdiennes sont donc dans l'incapacité de fonctionner (KO fonctionnel). Ce traitement n'induit aucune toxicité apparente : ni le comportement alimentaire ni l'évolution pondérale des animaux ne sont modifiés (*Figure 47B*). Ce traitement n'altère pas l'activité Gst intrinsèque des tissus cérébraux (*Figure 47C*). Enfin, le traitement avec le BSO n'altère pas l'intégrité des interfaces sang-cerveau étant donné que les constantes de perméabilité sang-LCR et sang – cortex cérébral du saccharose sont identiques chez les animaux traités et contrôles (*Figure 47D*).

Quatre heures après la dernière injection de BSO ou de véhicule, les animaux ont été exposés au CDBN par perfusion intracardiaque puis du LCR a été prélevé dans la *cisterna magna*. Le protocole de perfusion intracardiaque n'altère pas la morphologie des plexus choroïdes, qui a été observée sur des coupes de cerveau avec des marquages hématoxyline et phloxine, et un immunomarquage de la Cldn1. Chez les animaux contrôles, le CDBN n'est pas détecté dans le LCR lorsque la concentration en CDBN dans le perfusât est

inférieur ou égale à 200  $\mu\text{M}$ , et est détecté à faible niveau lorsque la concentration en CDNB dans le perfusât est de 500  $\mu\text{M}$  (Figure 48). En supposant que la concentration plasmatique en CDNB augmente linéairement de 0 à 500  $\mu\text{M}$  au cours des 5 min de perfusion chez ces animaux contrôles, la constante de perméabilité sang-LCR du CDNB  $K_{\text{in LCR}}$  serait de  $0,3 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , et donc largement inférieure à la constante de perméabilité sang-LCR du saccharose utilisé comme marqueur polaire de l'intégrité de la barrière sang – LCR (Figure 47). Chez les animaux ayant une quantité de GSH choroïdien réduite, le passage du CDNB dans le LCR est beaucoup plus important : il est multiplié par 30 lorsque les animaux sont exposés à 500  $\mu\text{M}$  de CDNB (Figure 48). Le traitement au BSO ne modifie pas la concentration en CDNB du perfusât à la sortie de l'oreillette cardiaque ; l'augmentation du passage du CDNB dans le LCR chez les animaux traités avec le BSO n'est donc pas due à un défaut de métabolisation périphérique du CDNB. Ces résultats démontrent qu'une barrière enzymatique choroïdienne dépendante du GSH contribue à protéger l'environnement cérébral des composés chimiques circulant dans le sang au cours de la période postnatale.



**Figure 48 | Efficacité de la barrière enzymatique choroïdienne dépendante du glutathion lors d'une exposition toxique au 1,2-dichloro-4-nitrobenzène chez le rat au stade postnatal.**

Des rats de trois jours fonctionnellement inhibés pour l'activité Gst choroïdienne (*barres vertes*) ou contrôles (*barres bleues*) ont été exposés par perfusion intracardiaque au 1,2-dichloro-4-nitrobenzène (CDNB) à la concentration de 200 ou 500  $\mu\text{M}$ . Après 5 min de perfusion, la concentration du CDNB dans le liquide céphalorachidien (LCR) a été mesurée par chromatographie liquide à haute performance.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SE (N).

\*\*  $p < 0,01$  : statistiquement différent de la concentration

en CDNB mesurée dans le LCR des animaux contrôles, test t de Student unilatéral pour variances inégales.

Les rats fonctionnellement inhibés pour l'activité Gst choroïdienne ont été obtenus par traitement avec le DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO) ; les animaux contrôles ont été traités avec le véhicule.

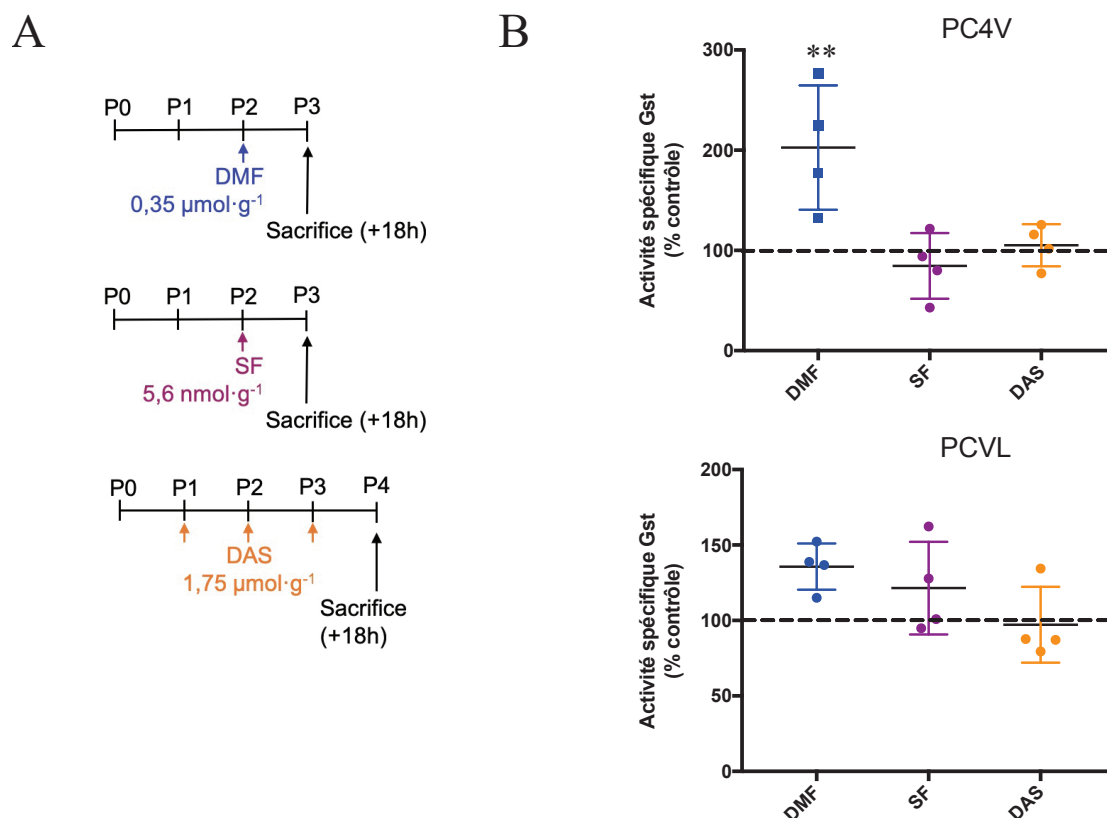
### 2.1.3. Induction des mécanismes de barrière choroïdiens liés au glutathion au cours de la période périnatale

#### 2.1.3.1. Activité glutathion transférase

La capacité de trois molécules pharmacologiques (DMF, SF et DAS) à induire les activités enzymatiques choroïdiennes dépendantes du GSH au cours de la période postnatale a été testée *in vivo*. Le DMF et le SF sont des activateurs de la voie NRF2 (Linker et al., 2011; Ping et al., 2010; Zhao et al., 2015). Le DAS est majoritairement connu comme activateur de la voie CAR mais des expérimentations réalisées *in vitro* et *in vivo* chez la souris *Nrf2*<sup>-/-</sup> ont montré qu'il peut également induire la voie NRF2 (Fisher et al., 2007). Les études utilisant le DAS ont été réalisées en collaboration avec Liam Koehn, étudiant en thèse à l'Université de Melbourne.

Les animaux ont été traités avec du DMF, du SF ou du DAS selon des schémas d'administration déterminés par des expérimentations préliminaires (DMF, SF) ou adaptés de la littérature (DAS) ayant permis d'activer les enzymes du foie (*Figure 49A*). Les animaux contrôles ont été traités avec le véhicule (DMF, SF) ou n'ont pas été traités (DAS) (cf *Matériels et Méthodes §1.2.1*). Dix-huit heures après la dernière administration, des échantillons de tissus choroïdiens et de foie (DAS) ont été prélevés afin de réaliser des mesures d'activités enzymatiques.

Pour les quatre molécules testées, l'activité Gst a été mesurée dans les deux types de plexus choroïdes (*Figure 49B*). Dans le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, le DMF double l'activité Gst : elle est de  $4,6 \pm 0,1$  nmol·min<sup>-1</sup>·mg de protéines<sup>-1</sup> chez les animaux traités avec le véhicule, et de  $9,3 \pm 2,7$  nmol·min<sup>-1</sup>·mg de protéines<sup>-1</sup> chez les animaux traités avec le DMF (moyenne  $\pm$  SD, N = 4). Dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux, le DMF induit une légère augmentation de l'activité Gst statistiquement non significative. Dans les conditions expérimentales utilisées, le SF n'induit pas les activités Gst choroïdiennes. Le DAS n'induit pas les activités Gst choroïdiennes alors qu'il induit l'activité hépatique de  $\sim 40$  % ( $p = 0,012$ ).



**Figure 49 | Effets de différentes molécules pharmacologiques sur l'activité spécifique glutathion transférase choroïdienne chez le rat au stade postnatal.**

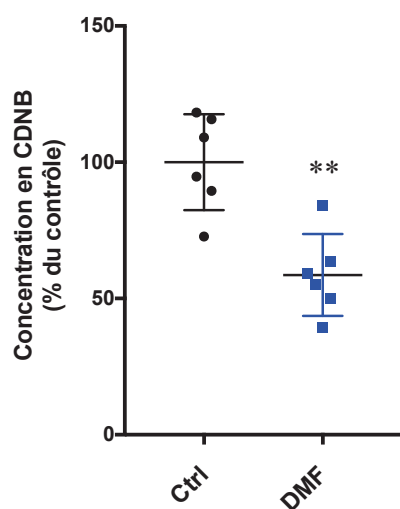
**A.** Schémas de traitement. Les animaux ont été traités par voie intrapéritonéale avec différentes molécules pharmacologiques dans le but d'induire l'activité glutathion transférase (Gst) choroïdienne. Les schémas de traitement, propres à chaque molécule, ont été déterminés à partir des données de la littérature ou d'expérimentations préliminaires. Les schémas de traitement du diméthylfumarate (DMF) et du sulforaphane (SF) comprennent une injection intrapéritonéale unique, réalisée à deux jours postnatal (P2). Le schéma de traitement du diallyl sulfide (DAS) comprend trois injections intrapéritonéales, réalisées à P1, P2 et P3. Les animaux sont sacrifiés 18h après la dernière injection. Les animaux contrôles ont été traités avec le véhicule (DMF, SF) ou n'ont pas été traités (DAS).

**B.** L'activité spécifique Gst envers le monochlorobimane a été mesurée dans des homogénats des deux types de plexus choroïdes préparés à partir de rats P3 (DMF, SF) ou P4 (DAS). L'activité spécifique Gst est exprimée sous forme de pourcentage par rapport à l'activité mesurée chez les animaux contrôles (moyenne  $\pm$  SD, N = 4). \*\*p < 0,005 : statistiquement différent de l'activité mesurée dans les plexus choroïdes des animaux contrôles, analyse ANOVA à un facteur suivie d'un test de Dunnett.

Abréviations : PC4V : plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCVL : plexus choroïdes des ventricules latéraux.

### 2.1.3.2. Effets de l'induction des glutathion transférases choroïdiennes par le diméthylfumarate sur les propriétés de neuroprotection de la barrière sang – liquide céphalorachidien choroïdienne *in vivo*

Nous avons ensuite évalué l'effet de l'induction des Gst choroïdiennes par le DMF sur les propriétés de neuroprotection de la barrière sang-LCR au cours de la période postnatale. Dix-huit heures après l'administration du DMF ou du véhicule, les animaux ont été exposés à 1 mM de CDNB par perfusion intracardiaque puis du LCR a été prélevé dans la *cisterna magna*. Cette concentration en CDNB mime une exposition toxique : à partir de la concentration initiale de 200  $\mu$ M dans le perfusât, les propriétés de détoxification de la barrière sang-LCR choroïdienne sont proches de la saturation, elles sont dépassées à 1 mM. Le CDNB est alors détecté dans le LCR (*Figure 48*). Afin que l'apport en GSH ne soit pas l'élément limitant dans cette étude, le perfusât a été enrichi en acides aminés précurseurs du GSH à des concentrations physiologiques.



**Figure 50 | Effet du diméthylfumarate sur la perméabilité de la barrière enzymatique choroïdienne au 1,2-dichloro-4-nitrobenzène chez le rat au stade postnatal.**

Des rats de 3 jours traités avec du diméthylfumarate (DMF) ou avec le véhicule ont été exposés par perfusion intracardiaque au 1,2-dichloro-4-nitrobenzène (CDNB) à une concentration de 1 mM. Après 5 min de perfusion, la concentration du CDNB dans le liquide céphalorachidien (LCR) a été mesurée par chromatographie liquide à haute performance.

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD (N=6). \*\*p < 0,005 : statistiquement différent de la concentration en CDNB mesurée dans le LCR des animaux

contrôles, test de Mann Whitney.

Abréviations : Ctrl : contrôles (traités avec le véhicule).

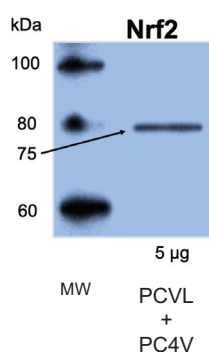
Chez les animaux contrôles perfusés avec 1 mM de CDNB pendant 5 min, la concentration de CDNB dans le LCR est de  $30,0 \pm 10,0 \mu$ M (moyenne  $\pm$  SD, N=6 animaux issus de deux portées différentes). Les concentrations de CDNB mesurées dans le LCR sont proches au sein d'une même portée, mais différent de façon importante d'une

portée à l'autre, ce qui explique l'écart-type observé. Afin de faciliter l'interprétation des résultats, la concentration de CDNB dans le LCR des animaux traités avec le DMF est exprimé en pourcentage de la concentration mesurée dans le LCR des animaux contrôles issus de la même portée (*Figure 50*). Le passage du CDNB dans le LCR est réduit de plus de 40 % lorsque les animaux ont été traités avec le DMF. Ce résultat démontre que l'induction des Gst choroïdiennes permet de renforcer la barrière enzymatique choroïdienne dépendante du GSH au cours de la période postnatale.

#### 2.1.3.3. Implication de la voie du *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2* dans l'induction des glutathion transférases choroïdiennes par le diméthylfumarate

Le DMF est connu pour activer la voie du facteur de transcription NRF2. Ce facteur de transcription pourrait être impliqué dans les effets neuroprotecteurs du DMF envers les xénobiotiques circulants dans le sang précédemment décrits.

Nous avons tout d'abord démontré par Western-blot que le facteur Nrf2 est bien exprimé dans les plexus choroïdes de l'animal en développement (*Figure 51*).

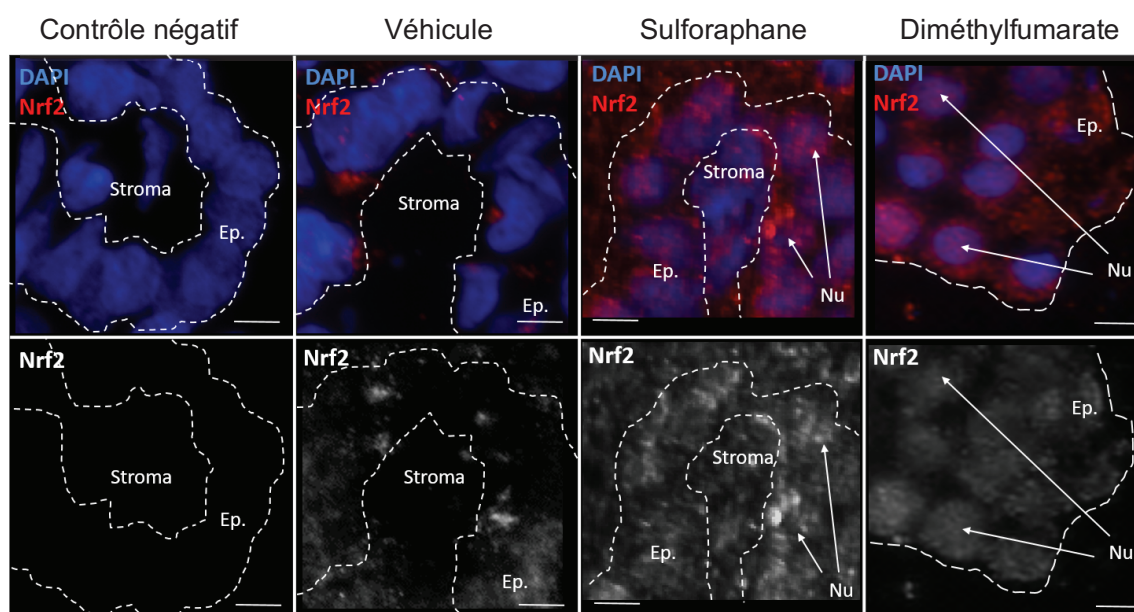


**Figure 51 | Analyse par Western-blot de l'expression protéique du *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2) dans les tissus choroïdiens du rat au cours du développement postnatal.**

Les tissus choroïdiens ont été isolés à partir d'animaux de 8 jours postnatal. Un homogénat mixte de plexus choroïdes des ventricules latéraux et du 4<sup>ème</sup> ventricule a été préparé dans un homogénéisateur de type dounce (2 allers-retours avec le piston A et 8 allers-retours avec le piston B). Cet homogénat a été centrifugé 15 min à 1500 g (4°C) ; le surnageant a été prélevé et centrifugé 20 min à 20800 g (4°C). Le Western-blot a été réalisé sur le surnageant obtenu, enrichi en protéines cytosoliques.

Abréviations : MW : poids moléculaires (*molecular weight*), PC4V : plexus choroïdes du 4<sup>ème</sup> ventricule, PCLV : plexus choroïde des ventricules latéraux.





**Figure 52 | Effet du diméthylfumarate sur la localisation cellulaire du *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2* dans le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule chez le rat au cours du développement postnatal.**

Marquage du facteur nucléaire *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2) par immunohistofluorescence dans les plexus choroïdes du 4<sup>ème</sup> ventricule du rat de 2 jours traité ou non avec du sulforaphane (SF) ou du diméthylfumarate (DMF). Les animaux ont été sacrifiés 1h30 après l'administration intrapéritonéale des traitements pharmacologiques. Le marquage du facteur Nrf2 est très faiblement présent dans les noyaux des cellules épithéliales choroïdiennes des rats traités avec le véhicule NaCl/EtOH. Les mêmes résultats ont été observés avec le véhicule NaCl/DMSO (*non présentés*). La migration nucléaire du facteur Nrf2 est visible dans les noyaux des cellules épithéliales choroïdiennes des rats traités avec le DMF ou le SF. Quel que soit le traitement, Nrf2 est très peu présent dans les noyaux des cellules épendymaires (*non présenté*). Le DAPI a été utilisé pour marquer les noyaux. Le contrôle négatif a été obtenu en omettant l'anticorps primaire.

Abréviations : Nu : noyau, Ep : épithélium choroïdien.

Barre d'échelle 20  $\mu$ m.

Pour être actif, le facteur NRF2 doit migrer dans le noyau afin de pouvoir se fixer sur la séquence ARE de ses gènes cibles. Afin d'étudier la migration nucléaire de ce facteur nucléaire, une analyse par immunohistofluorescence a été réalisée sur des coupes de cerveau de rats P2 traités avec le DMF ou le véhicule et sacrifié 1h30 après l'administration (*Figure 52*). L'immunohistofluorescence montre que le marquage de

Nrf2 est ubiquitaire au sein du SNC, et relativement diffus dans les cellules chez les animaux traités avec le véhicule. Le traitement au DMF induit une augmentation de la localisation nucléaire du facteur Nrf2 dans la majorité des cellules épithéliales choroïdiennes. Ce phénomène n'est pas observé dans les cellules épendymaires. Il est à noter que ce résultat est également observé chez les animaux traités avec le SF.

## 2.2. Discussion

Au cours de ce travail, nous avons montré que les GST participent à la formation d'une barrière enzymatique entre le sang et le LCR. Cette barrière enzymatique dépendante du GSH, particulièrement active au début du développement postnatal, empêche le passage cérébral des composés toxiques circulant dans le sang. Nous avons ensuite démontré que le DMF, connu pour induire la voie du facteur NRF2, peut renforcer les propriétés de barrière de l'épithélium choroïdien en induisant les activités GST choroïdiennes. L'implication de la voie NRF2 dans ce phénomène nécessite d'être confirmée.

Les activités Gst mesurées dans des homogénats de tissus de rats à différents stades de développement indiquent que, pendant la période postnatale, la capacité de conjugaison au GSH des plexus choroïdes est importante. Dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux, cette activité est près de trois fois supérieure à l'activité mesurée chez le rat adulte. Dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux, l'activité Gst est stable au cours du développement. Quel que soit le stade de développement, l'activité Gst choroïdienne est particulièrement élevée par rapport à celle du tissu cérébral. Aux stades précoces de développement postnatal, l'activité Gst choroïdienne est également supérieure à l'activité mesurée dans le foie, organe de référence des processus de détoxification (Gundert-Remy et al., 2014). Ces données concordent avec les résultats d'une étude transcriptomique réalisée par Kati Mönkkönen et Nathalie Strazielle au sein du laboratoire : l'expression des *Gstm1*, *m2*, *m5*, *a3*, et *a4* est en effet plus importante dans les plexus choroïdes que dans le cortex cérébral aux stades précoces de développement postnatal chez le rat, et les *Gstm1*, *m2*, *m5* et *p1* ont une expression plus importante dans les tissus choroïdiens que dans le tissu hépatique à ces stades de développement. Ces données concordent également avec nos résultats de Western-blot, qui montrent l'expression élevée de plusieurs sous-unités de Gst dans les plexus choroïdes par rapport au cortex et au foie au cours du développement postnatal chez le rat. Les travaux de Kati Mönkkönen et Ingrid Kratzer ont par ailleurs permis de visualiser la formation de conjugués au GSH au sein de plexus choroïdes isolés de rats P5 et ainsi illustrer la fonctionnalité précoce de la voie de détoxification médiée par les Gst. Le KO fonctionnel de l'activité choroïdienne de conjugaison au GSH a ensuite démontré que

l'importante activité Gst choroïdienne formait une barrière enzymatique entre le sang et le LCR efficace dès les stades précoces de développement postnatal, empêchant ainsi la pénétration et l'accumulation de substrats des Gst dans le LCR. La perméabilité de la barrière sang-LCR au CDNB, composé lipophile substrat des GST, est en effet inférieure à celle du saccharose, composé polaire marqueur de l'intégrité de la barrière, chez les animaux témoins. L'appauvrissement en GSH choroïdien multiplie par trente la perméabilité au CDNB, sans affecter l'intégrité de la barrière. La barrière enzymatique formée par les GST est en outre couplée à l'excrétion polarisée des conjugués au GSH formés au niveau de la membrane basolatérale de l'épithélium en vue de leur élimination par la circulation sanguine choroïdienne. La faible quantité de conjugués au GSH excrétés au niveau de la membrane apicale de l'épithélium choroïdien pourrait être éliminée du SNC par la circulation du LCR. La puissante barrière enzymatique sang-LCR que nous avons décrite chez le rat au stade postnatal devrait également être efficace dans le cerveau du nouveau-né chez l'homme. En effet, l'activité spécifique GST mesurée dans des tissus choroïdiens de fœtus humains est largement supérieure à celle mesurée dans le parenchyme cérébral des mêmes individus, et est égale ou supérieure à celle mesurée dans des tissus choroïdiens de rats nouveau-nés (Gherssi-Egea et al., 2006).

Les GST forment une famille multigénique d'enzymes dont les membres présentent des spécificités de substrats différentes, bien que partiellement chevauchantes. La fonctionnalité des différentes isoenzymes Gst choroïdiennes chez le rat au stade postnatal a été évaluée en mesurant l'inhibition de l'activité Gst envers le CDNB lorsqu'il est en compétition avec des substrats plus ou moins spécifiques de certaines isoenzymes GST. Par exemple, la bromosulfophtaléine et la trans-4-phényl-3-butène-2-one sont des substrats préférentiels des isoenzymes Gst Mu, le cisplatine est un substrat préférentiel de la Gstp1-1, et l'acide étacrynique est un substrat préférentiel des Gstp1-1 et a4-4 chez le rongeur (Hayes & Pulford, 1995; Nagar et al., 2015; Sano et al., 2002). L'acide étacrynique et son conjugué au GSH sont aussi inhibiteurs d'autres isoenzymes Gst de rat, en particulier les Gst Mu, avec des valeurs de  $CI_{50} < 5 \mu M$  (Ploemen et al., 1990). L'acroléine est un substrat préférentiel des GST Pi alors que l'isothiocyanate de benzyle est préférentiellement métabolisé par les isoenzymes GSTM1-1 et P1-1 chez l'homme (Berhane & Mannervik, 1990; Kolm et al., 1995). Notre étude de compétition a montré

que la conjugaison au CDNB, substrat commun à l'ensemble des isoenzymes de GST, était partiellement ou totalement inhibée en présence de différents produits chimiques, substrats plus ou moins spécifiques de certaines isoenzymes GST. Ces résultats indiquent que plusieurs isoenzymes Gst sont actives dans les plexus choroïdes au début de la période postnatale chez le rat, ce qui est cohérent avec les niveaux d'expressions protéiques élevés des sous-unités Gstm1, m2, a3, a4 et p1 mesurés dans les plexus choroïdes du rat en développement. Il est intéressant de noter que le foie de l'adulte, extrêmement performant dans son activité de conjugaison au GSH, présente également un panel étendu d'isoenzymes GST. Pour l'ensemble des composés testés, l'étude de compétition n'a pas montré de différence majeure de niveau d'inhibition de la conjugaison du CDNB entre les deux types de plexus choroïdes. Ces résultats indiquent que les interfaces sang-LCR du cerveau antérieur et du cerveau postérieur présentent des spectres de détoxification aux xénobiotiques similaires, ce qui est cohérent avec les résultats de Western-blot. Ces interfaces peuvent métaboliser une large gamme de produits chimiques non apparentés, y compris des médicaments ; des composés électrophiles cytotoxiques, cancérogènes ou génotoxiques issus d'attaques oxydatives ; des polluants environnementaux ; ou des additifs alimentaires (*Tableau 13*). La barrière enzymatique sang-LCR permet donc de prévenir le développement neural anormal induit par des substances chimiques, et de réduire les risques de tumeurs périventriculaires et méningées.

Pour être pleinement efficaces, les GST travaillent en collaboration avec des systèmes d'efflux cellulaires capables d'exporter les conjugués au GSH hors des cellules productrices. Certains conjugués au GSH étant inhibiteurs de GST, ces systèmes d'efflux peuvent même régir la sensibilité des cellules aux substances toxiques (Paumi et al., 2001). Nous avons montré que les conjugués au GSH formés au niveau intracellulaire sont exportés hors les cellules épithéliales choroïdiennes par un ou plusieurs transporteur(s) d'anions organiques sensible(s) au probénécide. Le transporteur d'anions organiques Slc21a5 et les transporteurs d'efflux Abcc1 et Abcc4 sont capables de prendre en charge les conjugués au GSH et sont présents au niveau de la membrane basolatérale de l'épithélium choroïdien (B. Gao et al., 1999; Ghersi-Egea et al., 2006; Leggas et al., 2004; Rao et al., 1999; Wijnholds et al., 2000); ces transporteurs participent probablement

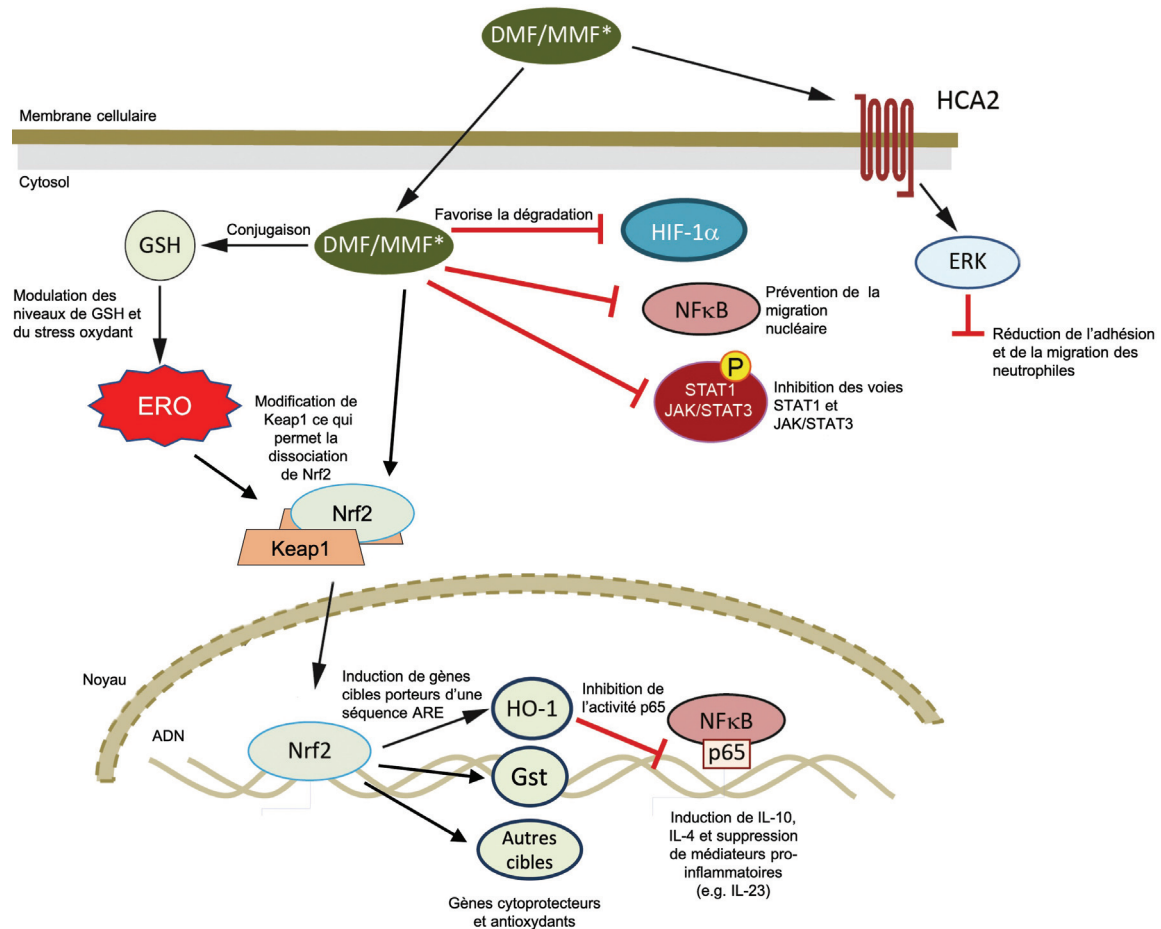
à la barrière enzymatique GSH-dépendante choroïdienne. Par ailleurs, l'échangeur glutamate-cystine  $X_c^-$  exprimé dans les cellules épithéliales choroïdiennes de l'homme et du rongeur devrait favoriser la synthèse de GSH *de novo* permettant de reconstituer en permanence le pool intracellulaire de ce cofacteur essentiel (Burdo et al., 2006; Lee et al., 2012).

Au cours de ce travail, nous avons également testé la capacité de plusieurs molécules pharmacologiques connues pour activer la voie du facteur NRF2, à induire les activités Gst choroïdiennes chez le rat au cours du développement postnatal : le DMF, le SF et le DAS (Dinkova-Kostova et al., 2017; Fisher et al., 2007; Linker et al., 2011). Le DMF est une molécule thérapeutique utilisée dans le traitement de fond de la sclérose en plaque de forme rémittente récurrente (Tecfidera®) et dans le traitement du psoriasis modéré ou sévère (Skilarence®, Fumaderm®). Le SF et le DAS sont respectivement extraits des végétaux crucifères (e.g. brocolis, choux) et de l'ail. Nous avons montré que le DMF a une importante capacité d'induction de l'activité Gst choroïdienne chez le rat au cours du développement postnatal alors que le SF et le DAS n'induisent pas cette activité dans les conditions expérimentales testées. L'effet du DMF est limité au plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule. La différence de réponse au DMF entre les deux types de plexus choroïdes pourrait être due à l'induction spécifique de certaines isoenzymes de Gst non-exprimées dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux ; cette hypothèse est cependant peu probable étant donné les résultats obtenus par l'étude de compétition et les analyses Western-blot. L'induction des Gst choroïdiennes dans les plexus choroïdes des ventricules latéraux pourrait également être masquée par la diminution concomitante de l'activité Gst basale dans ce tissu. En effet, l'activité Gst du plexus choroïdes du 4<sup>ème</sup> ventricule est stable au cours du développement alors que l'activité Gst des plexus choroïdes des ventricules latéraux diminue de plus de 30 % entre le stade P2 et le stade P7. Par ailleurs le plexus choroïde du 4<sup>ème</sup> ventricule bénéficie d'un débit sanguin légèrement plus élevé que les plexus choroïdes des ventricules latéraux et pourrait donc avoir un accès plus important au DMF (Szmydynger-Chodobska et al., 1994). L'absence d'induction de l'activité Gst choroïdienne observée avec le traitement SF peut s'expliquer par la particularité du SF d'être à la fois inducteur NRF2 et substrat des GST (Tableau 13). Une fois conjugué au GSH par les GST, le SF ne serait plus apte à interagir avec

KEAP1, ce qui inhiberait l'activation de la voie NRF2 (Dinkova-Kostova et al., 2017). Une étude réalisée chez l'homme a ainsi montré qu'une alimentation riche en légumes crucifères permettait d'induire l'expression sérique des sous-unités GSTA1 et A2, et que cette induction était plus marquée chez les individus dépourvus de *GSTT1* et de *GSTM1* (Navarro et al., 2009). Le SF est en particulier substrat des isoenzymes GSTM1-1 et GSTP1-1 (Kolm et al., 1995), qui sont particulièrement bien exprimées dans le plexus choroïde au cours du développement postnatal (*Figure 44*). Le DAS n'a pas d'effet sur l'activité Gst des tissus cérébraux mais induit cependant l'activité Gst hépatique chez le rat nouveau-né. L'induction des activités Gst hépatique et pulmonaire par le DAS est par ailleurs décrite chez le rat adulte (C.-Y. Ho et al., 2012). Ces résultats pourraient s'expliquer par l'induction de certaines isoenzymes de Gst plus exprimées dans les tissus hépatiques. Le schéma de traitement pourrait également ne pas être adapté ; les réponses hépatiques et choroïdiennes pourraient être décalées.

Nous avons ensuite montré *in vivo* que l'induction de l'activité Gst choroïdienne médiée par le DMF permet de renforcer les propriétés de barrière de l'épithélium choroïdien envers des molécules toxiques substrats des Gst. Le traitement au DMF réduit en effet de 40 % le passage du CDNB dans le LCR au cours d'une exposition toxique (1 mM dans la perfusion intracardiaque). L'induction de l'activité Gst choroïdienne est donc une stratégie thérapeutique pertinente dans le cadre d'une exposition majeure à des composés toxiques substrats des GST. Cette stratégie est également intéressante dans le cadre de pathologies périnatales altérant la capacité de détoxification basale de l'interface sang-LCR choroïdienne. Par exemple, l'exposition périnatale à des bactéries productrices de méthylmercure chez la souris réduit l'activité Gst du cerveau antérieur, ce qui peut sensibiliser le cerveau à d'autres stress toxiques (endogènes et exogènes), et accentuer l'effet toxique du méthylmercure (Ahmad, 2018).





**Figure 53 | Possibles mécanismes d'action du diméthylfumarate et voies de signalisation intracellulaires impliquées.**

Après administration par voie orale, la majorité du diméthylfumarate (DMF) est rapidement métabolisée en monométhylfumarate (MMF). Dans certains modèles expérimentaux, le DMF et le MMF ont montré des propriétés pharmacologiques distinctes.

Abréviations : ERK : *extracellular signal-regulated kinase*, ERO : espèces réactives de l'oxygène, GSH : glutathion réduit, Gst: glutathion transférases, HCA2 : *hydroxy-carboxylic acid receptor-2*, HIF-1α : *hypoxia-inductible factor 1-alpha*, HO-1 : hème oxygénase, JAK : janus kinase, Keap1 : *Kelch-like ECH-associated protein-1*, NF-κB : *nuclear factor-kappa B*, Nrf2 : *Nuclear Factor (Erythroid-derived 2)-Like 2*, STAT: *signal transducers and activators of transcription*.

Modifié d'après (Brück et al., 2018).

Le mécanisme d'action du DMF sur l'activité Gst choroïdienne nécessite encore d'être caractérisé. Plusieurs études ont montré que le DMF permet d'induire la voie Nrf2, y compris dans le SNC (Linker et al., 2011; Scannevin et al., 2012). Le DMF a par ailleurs montré une capacité d'induction de l'expression transcriptomique de certaines isoenzymes *Gst* dans le foie, et de l'activité Gst cytosolique envers le CDNB dans



différents organes chez la souris adulte (Belcher et al., 2014; Spencer et al., 1990). Une étude transcriptomique, réalisée par Ingrid Kratzer, a montré que *Nrf2* est bien exprimé dans les plexus choroïdes au cours de la période périnatale chez le rat (Kratzer et al., 2013). Au cours de ce travail, nous avons tout d'abord démontré par Western-blot que le facteur Nrf2 est bien exprimé dans les tissus choroïdiens au stade postnatal : l'anticorps utilisé a détecté un signal unique à 75 kDa, le poids moléculaire réel de NRF2 étant de ~ 60 kDa. Nous avons ensuite montré par immunohistofluorescence que le traitement au DMF (ainsi qu'au SF) induit la migration nucléaire du facteur Nrf2 dans les cellules épithéliales des plexus choroïdes du rat nouveau-né. Cet effet n'est pas homogène sur l'ensemble des cellules épithéliales choroïdiennes. Il est à noter que les études menées par Lau puis Kemmerer ont montré que la qualité des anticorps anti-Nrf2 du commerce est relativement inégale. Le signal Nrf2 attendu en Western-blot est de ~ 95-110 kDa selon ces auteurs. Nos résultats d'immunofluorescence suggèrent que notre anticorps est bien spécifique du facteur Nrf2 puisque le DMF induit une augmentation de l'intensité du signal de fluorescence couplée à une relocalisation nucléaire. Les rats *Nrf2*<sup>-/-</sup>, récemment obtenus par l'équipe du Professeur Julien Lombard de l'Université du Wisconsin (cf *Matériels et Méthodes* §1.2.2), peuvent être un outil de choix pour étudier l'implication du facteur Nrf2 dans l'induction de l'activité Gst par le DMF. L'effet du DMF sur l'activité Gst de rats nouveau-nés *Nrf2*<sup>-/-</sup> est actuellement en cours d'évaluation au laboratoire. Nos résultats préliminaires montrent que l'activité Gst choroïdienne basale n'est pas altérée chez ces animaux. Cette souche de rat sera également utile pour valider les anticorps anti-Nrf2.

La description du mécanisme d'action du DMF sur l'activité Gst choroïdienne permettra d'identifier une/des cible(s) thérapeutique(s) intéressante(s) pour améliorer la neuroprotection au cours du développement périnatal (*Figure 53*). Nos résultats préliminaires suggèrent que la voie du facteur Nrf2 est impliquée dans l'effet neuroprotecteur du DMF que nous avons observé. Le DMF peut activer la **voie du facteur NRF2** selon deux mécanismes distincts. Premièrement, le monométhylfumarate, métabolite du DMF, est capable de modifier le résidu cystéine 151 de la protéine KEAP1, ce qui modifie sa conformation et permet la libération du facteur NRF2 qui va s'accumuler dans le noyau et induire la transcription de ses gènes cibles (Linker et al.,

2011). Après administration par voie orale, le monométhylfumarate est le principal métabolite du DMF, chez l'homme comme chez le rat (Dibbert et al., 2013; Gill & Kolson, 2013; Litjens et al., 2004) : le DMF est en effet rapidement hydrolysé en monométhylfumarate soit spontanément, soit par l'action des estérases de la muqueuse intestinale (Mrowietz et al., 2018). La pharmacocinétique du DMF administré par voie intrapéritonéale n'est pas décrite dans la littérature. Une partie du DMF injecté est probablement hydrolysée spontanément. Une fois dans la circulation sanguine, le DMF restant peut être hydrolysé par les estérases du foie (Werdenberg et al., 2003). La proportion de DMF et de monométhylfumarate qui atteint les cellules épithéliales choroïdiennes n'est toutefois pas connue. Deuxièmement, le DMF peut se fixer au GSH intracellulaire, ce qui induit une réduction fonctionnelle en GSH, modifie le statut redox de la cellule et inhibe indirectement le répresseur de NRF2, KEAP1 (Brück et al., 2018; Lehmann et al., 2007). Ce mécanisme n'est probablement pas pertinent dans le cadre de notre étude : le DMF est susceptible d'être rapidement hydrolysé en monométhylfumarate après administration intrapéritonéale (Werdenberg et al., 2003), et les cellules épithéliales choroïdiennes ne sont donc potentiellement pas ou peu exposées au DMF lui-même. Le DMF a aussi montré des effets indépendants de la voie NRF2 via, par exemple, l'inhibition de l'activité des **protéines de la famille des *nuclear factor-kappa B*** ou du **récepteur couplé aux protéines G *hydroxy-carboxylic acid receptor-2*** (Figure 53). L'induction de l'expression et/ou de l'activité des GST cytosoliques par ces mécanismes de signalisation indépendants de NRF2 n'est cependant pas décrite dans la littérature.

En conclusion, la remarquable capacité choroïdienne de détoxification dépendante du GSH pendant la période postnatale identifie les plexus choroïdes comme des acteurs clés dans la neuroprotection au cours du développement, à un moment où le réseau astrocytaire est encore immature et où le métabolisme hépatique des xénobiotiques est limité. L'induction de l'activité détoxifiante des Gst choroïdiennes pourrait permettre d'augmenter efficacement la capacité de neuroprotection de l'interface sang-LCR choroïdien



## DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES

---



La fonctionnalité de la barrière sang-LCR choroïdienne au cours du développement périnatal a été démontrée très tôt par les expérimentations pionnières de Lewis Weed et George Wislocki (Weed, 1917a, 1917b; Wislocki, 1920). Ces résultats pourtant hautement concluants ont été éclipsés par l'apparition du paradigme d'immaturité des interfaces sang-cerveau au cours du développement, qui a persisté plus de 60 ans (Saunders et al., 2014). La caractérisation de la barrière sang-LCR choroïdienne a par ailleurs été globalement délaissée au profit de la BHE jugée de plus grande importance au vu des différences de surfaces d'échange entre les deux interfaces chez l'adulte. Les plexus choroïdes présentent pourtant des fonctions spécifiques qui ne sont pas assurées par la BHE (e.g. transport de la vitamine C), et représentent une importante porte d'entrée dans le SNC au cours la période périnatale. En effet, les plexus choroïdes se développent et mûrissent très tôt au cours du développement embryonnaire, alors même que le tissu cérébral n'est encore que peu vascularisé (Caley & Maxwell, 1970; Saunders et al., 2012). L'interface sang-LCR est d'autant plus importante au cours du développement périnatal que le LCR occupe alors un volume crânien proportionnellement plus important que chez l'adulte (Gherssi-Egea et al., 2015; Hüppi et al., 1998).

Ce travail de thèse montre que les plexus choroïdes sont des structures cérébrales majeures dans la neuroprotection envers les stress toxiques et oxydants au cours de la période postnatale chez le rat, à un moment où le foie est encore immature dans son activité métabolique. Nous avons montré que les Gst, particulièrement exprimées dans les plexus choroïdes au cours du développement postnatal, permettent de limiter le passage cérébral de composés toxiques circulant dans le sang. Les Gpx choroïdiennes interviennent quant à elles dans la protection envers les ERO produites *in situ*, apportées par le sang ou par le LCR. L'activité de ces enzymes est supportée par l'importante capacité de production de GSH des tissus choroïdiens (Okonkwo et al., 1974; Tate et al., 1973). Nos résultats, obtenus chez le rat, semblent pouvoir être transposés à l'homme. Une activité choroïdienne de conjugaison a en effet été mesurée sur des tissus choroïdiens de fœtus humains âgés de 16 à 36 semaines de gestation (Gherssi-Egea et al., 2006). Par ailleurs, une activité GPX a été mesurée dans de nombreuses régions cérébrales chez l'homme adulte, et l'isoenzyme GPX1 est fortement exprimée dans les cellules épithéliales de la barrière sang-LCR du fœtus (Kish et al., 1985; Marttila et al., 1988;

Vasiljevic, 2017). Les travaux réalisés par Workman et collaborateurs permettent de comparer le niveau de maturation neurodéveloppementale du rat et de l'homme au cours du développement périnatal (Workman et al., 2013). Les auteurs ont développé pour 18 espèces mammifères un modèle efficace de prédiction de la « maturité » du SNC en fonction de l'âge post-conception de l'animal. Un « *event score* » de 0 à 1 évalue ce degré de « maturité » en fonction de la survenue d'un panel de 271 événements neurodéveloppementaux scorés (e.g. apparition de la capsule externe du cortex cérébral - score : 0,215 ; ouverture des yeux – score : 0,663). Par exemple, la souris (*Mus Musculus*) naît 18 jours post-conception avec un score de ~ 0,56 alors que l'homme naît ~ 270 jours post-conception avec un score de ~ 0,68 ; la souris n'atteint ce niveau de « maturité » neurodéveloppementale (0,68) qu'au 8<sup>ème</sup> jour postnatal. Les travaux de Workman et collaborateurs suggèrent que les niveaux de maturation neurodéveloppementale du rat nouveau-né et du rat de 7 jours sont respectivement comparables à ceux d'un fœtus humain de six à huit mois et d'un nouveau-né (Workman et al., 2013). Notre travail suggère donc que les plexus choroïdes sont des structures clés dans la neuroprotection envers les stress toxiques et oxydants au cours de la période périnatale chez l'homme.

Notre étude participe à la description de la barrière enzymatique choroïdienne au cours du développement périnatal. En plus des aspects neurotoxicologiques, la connaissance des enzymes du métabolisme des xénobiotiques et des transporteurs d'efflux présents et fonctionnels dans les interfaces sang-cerveau au cours du développement périnatal est intéressante pour prédire la biodisponibilité cérébrale des médicaments à ces stades précoces de développement. Ces données peuvent tout d'abord permettre d'identifier les risques liés à l'utilisation hors-AMM de certains médicaments chez la femme enceinte, le nourrisson et l'enfant. Par exemple, chez l'homme comme chez le rongeur, le transporteur d'efflux ABCB1/Abcb1 (P-glycoprotéine) est moins exprimé dans les cellules endothéliales de la BHE au stade périnatal qu'au stade adulte (Daood et al., 2008; Gazzin et al., 2008). De nombreux médicaments à visée périphérique sont substrats de ce transporteur d'efflux (e.g. digoxine, lopéramide, doxorubicine) ; la biodisponibilité cérébrale de ces médicaments est susceptible d'être augmentée chez le nourrisson et l'enfant, ce qui peut entraîner des effets indésirables centraux. La description du métabolisme enzymatique siégeant au niveau des interfaces sang-cerveau peut également

être utile lors du développement de nouveaux médicaments ciblant spécifiquement la population pédiatrique (Giacomini et al., 2010). L'expression transcriptomique choroïdienne de la *Sult1a1* et des flavines monooxygénases 1 et 2 est augmentée au cours du développement périnatal chez le rat (Kratzer et al., 2013); il serait intéressant d'étudier l'expression protéique et la fonctionnalité de ces enzymes au cours du développement périnatal.

Au cours de ce travail, nous avons également étudié la capacité de plusieurs inducteurs de la voie NRF2 à induire la capacité de neuroprotection de l'interface sang-LCR choroïdienne au cours du développement périnatal.

Le facteur NRF2 est une cible thérapeutique particulièrement intéressante dans le cadre de la neuroprotection et est donc actuellement très étudié (Sandberg et al., 2014). Premièrement, le facteur Nrf2 est exprimé de façon ubiquitaire dans l'ensemble des tissus chez l'homme adulte (Uhlén et al., 2015), et est probablement bien exprimé dans les cellules des interfaces sang-cerveau au cours du développement périnatal. La fonctionnalité de la voie du facteur Nrf2 dans les cellules épithéliales choroïdiennes de la barrière sang-LCR a en effet été démontrée *in vitro* sur une culture primaire réalisée à partir de tissus choroïdiens de rats P2 (Xiang et al., 2012). Le transcrit *Nrf2* a également été détecté dans les tissus choroïdiens de la souris et du rat au cours de la période périnatale (D'Angelo et al., 2013; Kratzer et al., 2013); le niveau d'expression transcriptomique du facteur Nrf2 est par ailleurs similaire dans les tissus choroïdiens du rat aux stades embryonnaire et adulte (Kratzer et al., 2013). La fonctionnalité de la voie Nrf2 a également été démontrée dans les cellules de la BHE *in vivo* chez le rat adulte (Alfieri et al., 2013). Deuxièmement, le facteur NRF2 est induit par des médicaments actuellement utilisés en clinique et par des composés naturellement présents dans l'alimentation. Par exemple, il peut être activé dans un contexte inflammatoire par la mélatonine, actuellement utilisée contre les troubles du sommeil chez l'enfant et l'adolescent (Wang et al., 2012). Le DMF, utilisé dans le traitement de la sclérose en plaque et du psoriasis, a montré une capacité d'induction de la voie Nrf2 dans des contextes pathologiques (hémorragie intracérébrale, neuroinflammation) chez le rongeur (Linker et al., 2011; Zhao et al., 2015). Le SF et le DAS, extraits des plantes crucifères et de l'ail respectivement, peuvent également activer la voie Nrf2 (Fisher et al., 2007; Ping



et al., 2010). Troisièmement, la voie du facteur Nrf2 peut induire un panel impressionnant d'enzymes et de transporteurs impliqués dans la détoxification et dans la protection envers les stress oxydants (Qiang Ma, 2013). En particulier, le facteur Nrf2 a montré la capacité d'induire l'expression d'enzymes et de transporteurs liés au GSH (e.g. Gr, certaines isoenzymes Gpx et Gst, la sous-unité xCT de l'échangeur glutamate-cystine  $X_c^-$ ) *in vitro* et/ou *in vivo* dans différents types cellulaires et/ou tissus (Qiang Ma, 2013; Xiang et al., 2012). Le facteur Nrf2 est même impliqué dans l'expression basale de certains gènes dans certains organes. Par exemple, il contrôle l'expression basale de certaines isoenzymes Gst de classes Alpha et Mu dans le foie chez la souris adulte (Hayes et al., 2000). Enfin, l'activation de la voie NRF2 n'a jusqu'à présent pas montré d'effets délétères. À titre de comparaison, l'activation de la voie Car par le phénobarbital et le TCPOBOP est reliée à l'apparition d'hépatomégalie et de tumeurs hépatiques chez la souris (Huang et al., 2005).

Les résultats de notre étude indiquent que le DMF induit l'activité neuroprotectrice des Gst choroïdiennes du rat nouveau-né via un mécanisme impliquant probablement le facteur Nrf2. Afin de conclure sur l'implication réelle du facteur Nrf2 dans l'effet neuroprotecteur du DMF, il serait intéressant d'étudier l'effet de ce médicament sur l'activité Gst choroïdienne et sur la perméabilité sang-LCR *in vivo* au CDNB chez des rats Nrf2<sup>-/-</sup>. Dans le cas où l'implication du facteur Nrf2 serait avérée, il serait pertinent de compléter ces résultats par une visualisation de la migration nucléaire du facteur Nrf2 par microscopie confocale. Il est par ailleurs intéressant de noter que nos résultats préliminaires montrent que l'activité Gst choroïdienne basale n'est pas altérée chez les rats Nrf2<sup>-/-</sup>, alors que l'expression hépatique basale des sous-unités Gsta1/2, a4, m1 et m5 est réduite chez les souris Nrf2<sup>-/-</sup>. Ces disparités suggèrent que la régulation de l'expression basale des GST diffère selon les organes. Pour finir, il pourrait être judicieux d'évaluer l'effet du DMF sur d'autres cibles du facteur NRF2, comme la GR ou l'échangeur glutamate-cystine  $X_c^-$ .

Le DMF, qu'il agisse ou non via la voie du facteur Nrf2, est capable d'induire l'activité choroïdienne des enzymes de détoxification Gst au cours de la période postnatale chez le rat, ce qui réduit la perméabilité sang-LCR de molécules toxiques substrats de ces enzymes. Selon la littérature, le DMF peut également améliorer la réponse cellulaire au

stress oxydant, favoriser la production de cytokines anti-inflammatoires (e.g. interleukine 10) par les cellules présentatrices d'antigènes et la différenciation des lymphocytes T auxiliaires Th2 (Brück et al., 2018). Le DMF présente donc des propriétés variées qui pourraient être intéressantes, si elles s'avèrent pertinentes au niveau cérébral, dans le cadre de pathologies périnatales impliquant l'exposition à des composés toxiques, à un stress oxydant ou inflammatoire. Par ailleurs, l'étude de la pharmacocinétique du DMF par administration intrapéritonéale pourrait permettre de connaître l'évolution réelle de la concentration plasmatique du DMF et de ses métabolites, notamment le monométhylfumarate, dans nos conditions expérimentales (rat nouveau-né). Ces données seraient utiles pour pouvoir comparer nos résultats avec des études *in vivo* utilisant une administration orale de DMF, et pour connaître les concentrations en DMF et en métabolites à utiliser lors d'expérimentations *in vitro* sur des cellules épithéliales choroïdiennes.

Plus globalement, l'induction de la capacité de neuroprotection des interfaces sang-cerveau au cours du développement périnatal peut être une stratégie thérapeutique pertinente en cas de pathologies périnatales ayant une composante toxique, oxydative ou inflammatoire.

Premièrement, les effets neurotoxiques consécutifs à l'exposition à une molécule toxique peuvent être directement ou indirectement réduits par l'activation des enzymes et des transporteurs siégeant au sein des interfaces sang-cerveau. L'induction des enzymes du métabolisme des xénobiotiques intervenant dans le métabolisme de la molécule toxique va favoriser son élimination et réduire son passage cérébral. Par exemple, les GST catalysent la conjugaison au GSH de plusieurs contaminants environnementaux (e.g. benzo[g]chrysène diol époxyde, benzo[a]pyrène diol époxyde) ; l'activation des GST au sein des interfaces sang-cerveau pourrait donc réduire la perméabilité sang-cerveau de ces toxiques. L'activation des mécanismes de neuroprotection peut aussi permettre de contrecarrer le mécanisme d'action délétère de la molécule toxique. Par exemple, la toxicité neurodéveloppementale du paraquat (herbicide) est attribuée à son effet oxydant (peroxydation lipidique, déséquilibre de la balance redox) (Ait-Bali et al., 2016; Q. Chen et al., 2010). L'induction des systèmes antioxydants des interfaces sang-cerveau pourrait permettre de limiter indirectement les effets toxiques centraux du paraquat.

Deuxièmement, l'induction des enzymes et des transporteurs des interfaces sang-cerveau peut permettre de restaurer la capacité basale de neuroprotection de ces interfaces lorsqu'elle est altérée par des pathologies périnatales. Par exemple, l'administration systémique de lipopolysaccharide chez la souris P9 induit une diminution rapide de l'expression des gènes codants pour les sous-unités de la  $\gamma$ -glutamylcystéine synthétase et pour l'hème oxygénase 1, créant potentiellement un défaut de défense antioxydante (D'Angelo et al., 2013). L'exposition périnatale au manganèse réduit les activités superoxyde dismutase et Gst dans le cortex préfrontal chez le rat adulte, le rendant plus sensible aux stress oxydants (Bałasz et al., 2015). La caractérisation complète d'un modèle de pathologie périnatale pertinent en clinique serait intéressante pour mieux comprendre les conséquences de ces « défauts de neuroprotection », et évaluer l'intérêt de la restauration de ces mécanismes de défense. En ce sens, Emmanuel Rault, étudiant en master 2 au laboratoire, va développer un modèle expérimental de pathologie périnatale induite par une hypoxie couplée à une hypoglycémie et à un stress infectieux chez le rat. Ce modèle permettra d'évaluer l'évolution de l'état de la barrière sang-LCR après ces événements pathologiques, du stade périnatal au stade adulte. Par ailleurs, ce modèle expérimental permettra de tester l'efficacité de différentes stratégies thérapeutiques (incluant le DMF) à prévenir ou limiter l'apparition de séquelles neurologiques. Cette étude multidimensionnelle (moléculaire, fonctionnelle et comportementale) pourrait en particulier permettre d'évaluer l'intérêt thérapeutique de la voie Nrf2 dans le contexte physiopathologique de l'hypoxie périnatale associée à une inflammation.

Enfin, le contrôle du passage des cellules immunes dans le SNC en cas de pathologies périnatales à composantes infectieuse ou inflammatoire pourrait potentiellement réduire la sévérité des séquelles neurologiques associées à ces pathologies. La présence d'une inflammation cérébrale est en effet un facteur pronostic négatif en cas de pathologie périnatale (Hagberg et al., 2015). Le niveau de cytokines proinflammatoires dans le LCR (e.g. interleukines 6 et 8) est par exemple plus élevé chez les nouveau-nés qui développent des encéphalopathies hypoxiques-ischémiques suite à une asphyxie néonatale chez l'homme (Sävman et al., 1998). Les plexus choroïdes ont été identifiés comme une voie d'entrée privilégiée des cellules immunes dans le SNC. Les plexus choroïdes de la souris

expriment en effet les récepteurs *Toll-like* 1, 2, 3 et 4 (Tlr ; mRNA) dès le stade postnatal ; ces récepteurs interviennent dans l'immunité innée en reconnaissant des motifs moléculaires conservés chez différents pathogènes (Stridh et al., 2013). En présence d'agonistes spécifiques, l'expression transcriptomique des Tlr choroïdien est rapidement induite chez ces animaux (Stridh et al., 2013). En particulier, l'activation du Tlr2 par le Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> entraîne la production de différentes cytokines pro-inflammatoires (e.g. *tumor necrosis factor*  $\alpha$ , interleukines 1 $\beta$  et 6) par les cellules épithéliales choroïdiennes et l'infiltration importante de cellules de l'immunité innée dans le LCR (monocytes de phénotype inflammatoire, polynucléaires neutrophiles) (Du et al., 2011; Mottahedin et al., 2017; Stridh et al., 2013). Dans ces conditions expérimentales, le passage des cellules immunes dans le LCR s'effectue très majoritairement par les plexus choroïdes (Mottahedin et al., 2017). Les souris exposées de façon répétées à l'agoniste Tlr2 Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> au stade périnatal présentent des troubles du développement cérébral (e.g. défaut de myélinisation de la substance blanche) dépendant de Tlr2 (Du et al., 2011). L'étude de West et collaborateurs a démontré que le Tlr2 peut être activé par des produits de la peroxydation lipidique, les carboxyalkylpyrroles (West et al., 2010). En conséquence, l'exposition des cellules épithéliales choroïdiennes à ces composés issus du stress oxydant peut induire le passage cérébral des leucocytes. Les polynucléaires neutrophiles et les monocytes peuvent eux-mêmes générer des ERO (Hoffmann & Griffiths, 2018), et donc potentiellement favoriser la production de carboxyalkylpyrroles. L'activation des mécanismes antioxydants choroïdiens pourrait donc être pertinente pour limiter le passage des cellules immunes dans le LCR en cas d'inflammation ou d'infection systémique chez le nouveau-né, l'enfant ou l'adulte.

En conclusion, ce travail a permis de mettre en évidence le rôle des plexus choroïdes, et en particulier des enzymes antioxydantes et détoxifiantes choroïdiennes, dans la protection du cerveau au cours du développement périnatal. Ce travail de thèse propose également de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer la neuroprotection en cas de pathologies périnatales impliquant un stress toxique.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott, J. N.** (2004). "Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology." *Neurochemistry International*, 45(4), 545–552. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.11.006>
- Abbott, J. N., Pizzo, M. E., Preston, J. E., Janigro, D., & Thorne, R. G.** (2018). "The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system?" *Acta Neuropathologica*, 135(3), 387–407. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1812-4>
- Abbott, J. N., Rönnbäck, L., & Hansson, E.** (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." *Nature Reviews Neuroscience*, 7(1), 41–53. <https://doi.org/10.1038/nrn1824>
- Absinta, M., Ha, S.-K., Nair, G., Sati, P., Luciano, N. J., Palisoc, M., Louveau, A., Zaghoul, K. A., Pittaluga, S., Kipnis, J., & Reich, D. S.** (2017). "Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI." *eLife*, 6, 1–15. <https://doi.org/10.7554/eLife.29738.001>
- Ahmad, M.** (2018). "Mercuric resistant bacteria *Aeromonas* exhibits neurologic toxic effects on the developmental motor reflexes, and brain oxidative stress in mice offspring." *Microbial Pathogenesis*, 114, 169–175. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.11.063>
- Ahmadinejad, F., Geir Møller, S., Hashemzadeh-Chaleshtori, M., Bidkhor, G., & Jami, M.-S.** (2017). "Molecular mechanisms behind free radical scavengers function against oxidative stress." *Antioxidants*, 6(51), 1–15. <https://doi.org/10.3390/antiox6030051>
- Ait-Bali, Y., Ba-M'hamed, S., & Bennis, M.** (2016). "Prenatal Paraquat exposure induces neurobehavioral and cognitive changes in mice offspring." *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.008>
- Alebouyeh, M., Takeda, M., Onozato, M. L., Tojo, A., Noshiro, R., Hasannejad, H., Inatomi, J., Narikawa, S., Huang, X.-L., Khamdang, S., Anzai, N., & Endou, H.** (2003). "Expression of human organic anion transporters in the choroid plexus and their interactions with neurotransmitter metabolites." *Journal of Pharmacological Sciences*, 93(4), 430–436. <https://doi.org/10.1254/jphs.93.430>
- Alfieri, A., Srivastava, S., Siow, R. C. M., Cash, D., Modo, M., Duchon, M. R., Fraser, P. A., Williams, S. C. R., & Mann, G. E.** (2013). "Sulforaphane preconditioning of the Nrf2/HO-1 defense pathway protects the cerebral vasculature against blood-brain barrier disruption and neurological deficits in stroke." *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 1012–1022. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.190>
- Allen Institute for Brain Sciences.** (2018). "Allen Brain Map."
- Allen, N. J., & Lyons, D. A.** (2018). "Glia as architects of central nervous system formation and function." *Science*, 362(6411), 181–185. <https://doi.org/10.1126/science.aat0473>
- Arauz, J., Ramos-Tovar, E., & Muriel, P.** (2016). "Redox state and methods to evaluate oxidative stress in liver damage: From bench to bedside." *Annals of Hepatology*, 15(2), 160–173. <https://doi.org/10.5604/16652681.1193701>
- Armulik, A., Genové, G., & Betsholtz, C.** (2011). "Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises." *Developmental Cell*, 21(2), 193–215. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M. H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., Johansson, B. R., & Betsholtz, C.** (2010). "Pericytes regulate the blood-brain barrier." *Nature*, 468(7323), 557–561. <https://doi.org/10.1038/nature09522>

- Autret-Leca, E.** (2010). "Le bon usage des médicaments en pédiatrie." *Médecine & Enfance*, (octobre), 374–379.
- Avshalumov, M. V., Chen, B. T., Marshall, S. P., Peña, D. M., & Rice, M. E.** (2003). "Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>." *The Journal of Neuroscience*, 23(7), 2744–2750. <https://doi.org/23/7/2744> [pii]
- Ayala, A., Muñoz, M. F., & Argüelles, S.** (2014). "Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014(May), 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Baeten, K. M., & Akassoglou, K.** (2011). "Extracellular matrix and matrix receptors in blood-brain barrier formation and stroke." *Developmental Neurobiology*, 71(11), 1018–1039. <https://doi.org/10.1002/dneu.20954>
- Bałasz, M., Szkilnik, R., Brus, R., Malinowska-Borowska, J., Kasperczyk, S., Nowak, D., Kostrzewa, R. M., & Nowak, P.** (2015). "Perinatal manganese exposure and hydroxyl radical formation in rat brain." *Neurotoxicity Research*, 27(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s12640-014-9474-z>
- Banizs, B., Pike, M. M., Millican, C. L., Ferguson, W. B., Komlosi, P., Sheetz, J., Bell, P. D., Schwiebert, E. M., & Yoder, B. K.** (2005). "Dysfunctional cilia lead to altered ependyma and choroid plexus function, and result in the formation of hydrocephalus." *Development and Disease*, 132(23), 5329–5339. <https://doi.org/10.1242/dev.02153>
- Baud, O., Greene, A. E., Li, J., Wang, H., Volpe, J. J., & Rosenberg, P. A.** (2004). "Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes." *The Journal of Neuroscience*, 24(7), 1531–1540. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3989-03.2004>
- Bélanger, M., & Magistretti, P. J.** (2009). "The role of astroglia in neuroprotection." *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 11(3), 281–295.
- Belcher, J. D., Nguyen, J., Chen, C., Abdulla, F., Nguyen, P., Nguyen, M., Zhang, P., Xu, P., Slipek, N. J., & Vercellotti, G. M.** (2014). "Dimethyl fumarate induces cytoprotection and inhibits inflammation and vaso-occlusion in transgenic sickle mice." *Blood*, 124(21), 219.
- Bellis, J. R., Kirkham, J. J., Nunn, A. J., & Pirmohamed, M.** (2013). "Adverse drug reactions and off-label and unlicensed medicines in children: a prospective cohort study of unplanned admissions to a paediatric hospital." *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(3), 545–553. <https://doi.org/10.1111/bcp.12222>
- Bellmann, C., Schreivogel, S., Günther, R., Dabrowski, S., Schümann, M., Wolburg, H., & Blasig, I. E.** (2014). "Highly conserved cysteines are involved in the oligomerization of occludin - redox dependency of the second extracellular loop." *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(6), 855–867. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5288>
- Ben-Zvi, A., Lacoste, B., Kur, E., Andreone, B. J., Mayshar, Y., Yan, H., & Gu, C.** (2014). "Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier." *Nature*, 509(7501), 507–511. <https://doi.org/10.1038/nature13324>
- Benjamin Kandel.** (2014). "Comparative analysis of the nuclear receptors CAR, PXR and PPARα in the regulation of hepatic energy homeostasis and xenobiotic metabolism." Retrieved from [https://elib.uni-stuttgart.de/bitstream/11682/8280/1/Dissertation\\_Benjamin\\_Kandel\\_2014.pdf](https://elib.uni-stuttgart.de/bitstream/11682/8280/1/Dissertation_Benjamin_Kandel_2014.pdf)



- Berhane, K., & Mannervik, B.** (1990). "Inactivation of the genotoxic aldehyde acrolein by human glutathione transferases of classes alpha, mu, and pi." *Molecular Pharmacology*, 37, 251–254.
- Bield, A., & Kraus, R.** (1898). "Über einen bisher unbekannte toxische Wirkung der Gallensäuren auf das Centralnervensystem" (Breitkopf). *Zentralblatt für Innere Medizin*.
- Bienert, G. P., & Chaumont, F.** (2014). "Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide." *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(5), 1596–1604. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.017>
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P.** (2006). "Membrane transport of hydrogen peroxide." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(8), 994–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.02.015>
- Bodó, A., Bakos, É., Szeri, F., Váradi, A., & Sarkadi, B.** (2003). "The role of multidrug transporters in drug availability, metabolism and toxicity." *Toxicology Letters*, 140–141, 133–143. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(02\)00497-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(02)00497-6)
- Bouffard, M. G.** (1906). "Injection des couleurs de benzidine aux animaux normaux. - Etude expérimentale et histologique." *Annales de l'Institut Pasteur : Journal de Microbiologie*, (Décembre).
- Bozinovski, S., Seow, H. J., Crack, P. J., Anderson, G. P., & Vlahos, R.** (2012). "Glutathione peroxidase-1 primes pro-inflammatory cytokine production after LPS challenge in vivo." *PLoS ONE*, 7(3), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033172>
- Bradbury, M. W. B.** (1993). "The blood-brain barrier." *Experimental Physiology*, 48, 453–472. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63432-0.00003-7>
- Brannan, T. S., Maker, H. S., & Weiss, C.** (1981). "Developmental study of rat brain glutathione peroxidase and glutathione reductase." *Neurochemical Research*, 6(1), 41–44.
- Brigelius-Flohé, R.** (2006). "Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors." *Biological Chemistry*, 387(10–11), 1329–1335. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.166>
- Brigelius-Flohé, R., & Maiorino, M.** (2013). "Glutathione peroxidases." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3289–3303. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.11.020>
- Brück, J., Dringen, R., Amasuno, A., Pau-Charles, I., & Ghoreschi, K.** (2018). "A review of the mechanisms of action of dimethylfumarate in the treatment of psoriasis." *Experimental Dermatology*, 27(6), 611–624. <https://doi.org/10.1111/exd.13548>
- Buonocore Giuseppe, G., Perrone, S., & Bracci, R.** (2001). "Free radicals and brain damage in the newborn." *Biology of Neonate*, 79, 180–186. <https://doi.org/10.1159/000047088>
- Burdo, J., Dargusch, R., & Schubert, D.** (2006). "Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc- in the brain, kidney, and duodenum." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(5), 549–557. <https://doi.org/10.1369/jhc.5A6840.2006>
- Burns, C. J., McIntosh, L. J., Mink, P. J., Jurek, A. M., & Li, A. A.** (2013). "Pesticide exposure and neurodevelopmental outcomes: review of the epidemiologic and animal studies." *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 16(3–4), 127–283. <https://doi.org/10.1080/10937404.2013.783383>
- Caley, D. W., & Maxwell, D. S.** (1970). "Development of the blood vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat cerebral cortex." *Journal of Comparative Neurology*, 138(1), 31–47. <https://doi.org/10.1002/cne.901380104>

- Cammer, W., Tansey, F., Abramovitz, M., Ishigaki, S., & Listowsky, I.** (1989). "Differential localization of glutathione-S-transferase Yp and Yb subunits in oligodendrocytes and astrocytes of rat brain." *Journal of Neurochemistry*, 52(3), 876–883. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb02536.x>
- Campos, Y., Qiu, X., Gomero, E., Wakefield, R., Horner, L., Brutkowski, W., Han, Y. G., Solecki, D., Frase, S., Bongiovanni, A., & D'Azzo, A.** (2016). "Alix-mediated assembly of the actomyosin-tight junction polarity complex preserves epithelial polarity and epithelial barrier." *Nature Communications*, 7(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms11876>
- Carder, P. J., Hume, R., Fryer, A. A., Strange, R. C., Lauder, J., & Bell, J. E.** (1990). "Glutathione S-transferase in human brain." *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 16(4), 293–303. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1990.tb01264.x>
- Chen, J., & Berry, M. J.** (2003). "Selenium and selenoproteins in the brain and brain diseases." *Journal of Neurochemistry*, 86(1), 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01854.x>
- Chen, Q., Niu, Y., Zhang, R., Guo, H., Gao, Y., Li, Y., & Liu, R.** (2010). "The toxic influence of paraquat on hippocampus of mice: Involvement of oxidative stress." *NeuroToxicology*, 31(3), 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.02.006>
- Cheng, J., Korte, N., Nortley, R., Sethi, H., Tang, Y., & Attwell, D.** (2018). "Targeting pericytes for therapeutic approaches to neurological disorders." *Acta Neuropathologica*, 136(4), 507–523. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1893-0>
- Cheng, W.-H., Ho, Y.-S., Valentine, B. A., Ross, D. A., Combs, G. F., & Lei, X. G.** (1998). "Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice." *The Journal of Nutrition*, 128(7), 1070–1076.
- Choi, B. H.** (1988). "Developmental events during the early stages of cerebral cortical neurogenesis in man." *Acta Neuropathologica*, 75, 441–447.
- Conrad, M., Schneider, M., Seiler, A., & Bornkamm, G. W.** (2007). "Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals." *Biological Chemistry*, 388(10), 1019–1025. <https://doi.org/10.1515/BC.2007.130>
- Cornford, E. M., Varesi, J. B., Hyman, S., Damian, R. T., & Raleigh, M. J.** (1997). "Mitochondrial content of choroid plexus epithelium." *Experimental Brain Research*, 116(3), 399–405. <https://doi.org/10.1007/PL00005768>
- Couto, N., Wood, J., & Barber, J.** (2016). "The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network." *Free Radical Biology and Medicine*, 95, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>
- Cserr, H. F., Depasquale, M., Patlak, C. S., & Pullen, R. G.** (1986). "Convection of cerebral interstitial fluid and its role in brain volume regulation." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 481, 123–134.
- Cserr, H. F., Harling-Berg, C. J., & Knopf, P. M.** (1992). "Drainage of brain extracellular fluid into blood and deep cervical lymph and its immunological significance." *Brain Pathology*, 2, 269–276. <https://doi.org/10.1080/08870440008407364>
- Cui, Y. J., Cheng, X., Weaver, Y. M., & Klaassen, C. D.** (2009). "Tissue distribution, gender-divergent expression, ontogeny, and chemical induction of multidrug resistance transporter genes (Mdr1a, Mdr1b, Mdr2) in mice." *Drug Metabolism and Disposition*, 37(1), 203–210. <https://doi.org/10.1124/dmd.108.023721>

- Cutler, R. W. P., Page, L., Galicich, J., & Watters, G. V.** (1968). "Formation and absorption of cerebrospinal fluid in man." *Brain*, 91(4), 707–720.
- D'Angelo, B., Ek, C. J., Sandberg, M., & Mallard, C.** (2013). "Expression of the Nrf2-system at the blood-CSF barrier is modulated by neonatal inflammation and hypoxia-ischemia." *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(3), 479–490. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9551-5>
- Damkier, H. H., Brown, P. D., & Praetorius, J.** (2013). "Cerebrospinal fluid secretion by the choroid plexus." *Physiological Reviews*, 93, 1847–1892. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2016>
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., & Barres, B. A.** (2010). "Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis." *Nature*, 468(7323), 562–566. <https://doi.org/10.1038/nature09513>
- Daood, M. J., Tsai, C., Ahdab-Barmada, M., & Watchko, J. F.** (2008). "ABC transporter (P-gp/ABCB1, MRP1/ABCC1, BCRP/ABCG2) expression in the developing human CNS." *Neuropediatrics*, 39(4), 211–218. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1103272>
- Dauchy, S., Dutheil, F., Weaver, R. J., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P. O., Scherrmann, J. M., 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(6), 1518–1528. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05720.x>
- Davson, H., & Segal, M. B.** (1996). "Physiology of the CSF and blood-brain barriers." Boca Raton : CRC Press.
- De Bault, L. E., & Mitro, A.** (1994). "Species differences in the distribution of gamma-glutamyl transpeptidase in choroid plexus of lateral ventricle and microvessels of adjacent brain." *Histochemical Journal*, 26, 447–452.
- De Bock, M., Van Haver, V., Vandenbroucke, R. E., Decrock, E., Wang, N., & Leybaert, L.** (2016). "Into rather unexplored terrain-transcellular transport across the blood-brain barrier." *Glia*, 64(7), 1097–1123. <https://doi.org/10.1002/glia.22960>
- De Bock, M., Vandenbroucke, R. E., Decrock, E., Culot, M., Cecchelli, R., & Leybaert, L.** (2014). "A new angle on blood-CNS interfaces: A role for connexins?" *FEBS Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.060>
- De Haan, J. B., Bladier, C., Griffiths, P., Kelner, M., O'Shea, R. D., Cheung, N. S., Bronson, R. T., Silvestro, M. J., Wild, S., Zheng, S. S., Beart, P. M., Hertzog, P. J., & Kola, I.** (1998). "Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide." *Journal of Biological Chemistry*, 273(35), 22528–22536. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22528>
- Declèves, X., Strazielle, N., Scherrmann, J.-M., & Gherzi-Egea, J.-F.** (2013). "Drug metabolism at the blood-brain and blood-CSF barriers." In M. Hammarlund-Udenaes, E. de Lange, & R. G. Thorne (Eds.), *Drug delivery to the brain : physiological concepts, methodologies and approaches* (AAPS Advan, Vol. 10). <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9105-7>
- Deng, C., Dang, F., Go, J., Zhao, H., Qi, S., & Gao, M.** (2018). "Acute benzo(a)pyrene treatment causes different antioxidant response and DNA damage in liver, lung, brain, stomach and kidney." *Heliyon*, 4, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018>
- Desagher, S., Glowinski, J., & Premont, J.** (1996). "Astrocytes protect neurons from

- hydrogen peroxide toxicity.” *The Journal of Neuroscience*, 16(8), 2553–2562.
- Desmond, M. E., & Jacobson, A. G.** (1977). “Embryonic brain enlargement requires cerebrospinal fluid pressure.” *Developmental Biology*, 57(1), 188–198. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(77\)90364-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(77)90364-5)
- Dhers, L., Ducassou, L., Boucher, J. L., & Mansuy, D.** (2017). “Cytochrome P450 2U1, a very peculiar member of the human P450s family.” *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(10), 1859–1869. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2443-3>
- Diamond, A. M.** (2015). “The subcellular location of selenoproteins and the impact on their function.” *Nutrients*, 7(5), 3938–3948. <https://doi.org/10.3390/nu7053938>
- Dibbert, S., Clement, B., Skak-Nielsen, T., Mrowietz, U., & Rostami-Yazdi, M.** (2013). “Detection of fumarate-glutathione adducts in the portal vein blood of rats: Evidence for rapid dimethylfumarate metabolism.” *Archives of Dermatological Research*, 305(5), 447–451. <https://doi.org/10.1007/s00403-013-1332-y>
- Dinkova-Kostova, A. T., Fahey, J. W., Kostov, R. V., & Kensler, T. W.** (2017). “KEAP1 and done? Targeting the NRF2 pathway with sulforaphane.” *Trends in Food Sciences & Technology*, 69, 257–269. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.002>
- Dohrmann, G. J.** (1970). “Dark and light epithelial cells in the choroid plexus of mammals.” *Journal of Ultrastructure Research*, 32(3–4), 268–273. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(70\)80007-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(70)80007-7)
- Drake, J. M., Sainte-Rose, C., DaSilva, M., & Hirsch, J. F.** (1991). “Cerebrospinal fluid flow dynamics in children with external ventricular drains.” *Neurosurgery*, 28(2), 242–250. <https://doi.org/10.1227/00006123-199102000-00011>
- Dringen, R.** (2000). “Metabolism and functions of glutathione in brain.” *Progress in Neurobiology*, 62, 649–671.
- Dringen, R., & Hamprecht, B.** (1999). “N-acetylcysteine, but not methionine or 2-oxothiazolidine-4- carboxylate, serves as cysteine donor for the synthesis of glutathione in cultured neurons derived from embryonal rat brain.” *Neuroscience Letters*, 259(2), 79–82. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00894-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00894-5)
- Dringen, R., Kussmaul, L., & Hamprecht, B.** (1998). “Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay.” *Brain Research Protocols*, 2(3), 223–228. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(97\)00047-0](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(97)00047-0)
- Dringen, R., Pawlowski, P. G., & Hirrlinger, J.** (2005). “Peroxide detoxification by brain cells.” *Journal of Neuroscience Research*, 79(1–2), 157–165. <https://doi.org/10.1002/jnr.20280>
- Du, X., Fleiss, B., Li, H., D’angelo, B., Sun, Y., Zhu, C., Hagberg, H., Levy, O., Mallard, C., & Wang, X.** (2011). “Systemic stimulation of TLR2 impairs neonatal mouse brain development.” *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019583>
- Dutour, R., & Poirier, D.** (2017). “Inhibitors of cytochrome P450 (CYP) 1B1.” *European Journal of Medicinal Chemistry*, 135, 296–306. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.042>
- Dziegielewska, K. M., Ek, C. J., Habgood, M. D., & Saunders, N. R.** (2001). “Development of the choroid plexus.” *Microscopy Research and Technique*, 52(1), 5–20. [https://doi.org/10.1002/1097-0029\(20010101\)52:1<5::AID-JEMT3>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1097-0029(20010101)52:1<5::AID-JEMT3>3.0.CO;2-J)



- Dziegielewska, K. M., Evans, C. A. N., Malinowska, D. H., Møllgård, K., Reynolds, J. M., Reynolds, M. L., & Saunders, N. R.** (1979). "Studies of the development of brain barrier systems to lipid insoluble molecules in fetal sheep." *The Journal of Physiology*, 292, 207–231.
- Ehrlich, P.** (1885). "Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus. Eine farbenanalytische Studie." August Hirschwald.
- Ek, C. J., Habgood, M. D., Dziegielewska, K. M., & Saunders, N. R.** (2003). "Structural characteristics and barrier properties of the choroid plexuses in developing brain of the opossum (*Monodelphis domestica*)." *Journal of Comparative Neurology*, 460(4), 451–464. <https://doi.org/10.1002/cne.10661>
- Eklund, B. I., Edalat, M., Stenberg, G., & Mannervik, B.** (2002). "Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane." *Analytical Biochemistry*, 309(1), 102–108. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00258-0](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00258-0)
- Elzagallaai, A. A., Greff, M. J. E., & Rieder, M. J.** (2017). "Adverse drug reactions in children: the double-edged sword of therapeutics." *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 101(6), 725–735. <https://doi.org/10.1002/cpt.677>
- EMA.** (2010). "Report on the survey of all paediatric uses of medicinal products in Europe." *European Medicines Agency* (Vol. EMA/794083). Retrieved from <http://www.ema.europa.eu/>
- EMA.** (2004). "Evidence of harm from off-label or unlicensed medicines in children." *European Medicines Evaluation Agency* (Vol. EMEA/12632). Retrieved from <http://www.emea.europa.eu>
- Emir, U. E., Raatz, S., Mcpherson, S., Hodges, J. S., Torkelson, C., Tawfik, P., White, T., & Terpstra, M.** (2011). "Noninvasive quantification of ascorbate and glutathione concentration in the elderly human brain." *NMR in Biomedicine*, 24(7), 888–894. <https://doi.org/10.1002/nbm.1646>
- Emmink, B. L., Laoukili, J., Kipp, A. P., Koster, J., Govaert, K. M., Fatrai, S., Verheem, A., Steller, E. J. A., Brigelius-Flohé, R., Jimenez, C. R., Rinkes, I. H. M. B., & Kranenburg, O.** (2014). "GPx2 suppression of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stress links the formation of differentiated tumor mass to metastatic capacity in colorectal cancer." *Cancer Research*, 74(22), 6717–6730. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1645>
- Engelhardt, B., Vajkoczy, P., & Weller, R. O.** (2017). "The movers and shapers in immune privilege of the CNS." *Nature Immunology*, 18(2), 123–131. <https://doi.org/10.1038/ni.3666>
- Fisher, C. D., Augustine, L. M., Maher, J. M., Nelson, D. M., Slitt, A. L., Klaassen, C. D., Lehman-McKeeman, L. D., & Cherrington, N. J.** (2007). "Induction of drug-metabolizing enzymes by garlic and allyl sulfide compounds via activation of constitutive androstane receptor and nuclear factor E2-related factor 2." *Drug Metabolism and Disposition*, 35(6), 995–1000. <https://doi.org/10.1124/dmd.106.014340>
- Forman, H. J., Bernardo, A., & Davies, K. J. A.** (2016). "What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma?" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 603, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.05.005>
- Fossan, G., Cavanagh, M. E., Evans, C. A. N., Malinowska, D. H., Møllgård, K., Reynolds, M. L., & Saunders, N. R.** (1985). "CSF-brain permeability in the immature sheep fetus: CSF-brain barrier." *Developmental Brain Research*, 18(1–2), 113–124. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(85\)90255-X](https://doi.org/10.1016/0165-3806(85)90255-X)

- Fukuhara, A., Irie, K., Nakanishi, H., Takekuni, K., Kawakatsu, T., Ikeda, W., Yamada, A., Katata, T., Honda, T., Sato, T., Shimizu, K., Ozaki, H., Horiuchi, H., Kita, T., & Takai, Y.** (2002). "Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions." *Oncogene*, 21(50), 7642–7655. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205875>
- Gallagher, E. P., Gardner, J. L., & Barber, D. S.** (2006). "Several glutathione S-transferase isozymes that protect against oxidative injury are expressed in human liver mitochondria." *Biochemical Pharmacology*, 71(11), 1619–1628. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.02.018>
- Gao, B., Stieger, B., Noé, B., Fritschy, J. M., & Meier, P. J.** (1999). "Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain." *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 47(10), 1255–1264. <https://doi.org/10.1177/002215549904701005>
- Gao, L., & Lipowsky, H. H.** (2010). "Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes." *Microvascular Research*, 80(3), 394–401. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2010.06.005>
- Gardner, J. L., & Gallagher, E. P.** (2001). "Development of a peptide antibody specific to human glutathione S-transferase alpha 4-4 (hGSTA4-4) reveals preferential localization in human liver mitochondria." *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 390(1), 19–27. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2352>
- Gauron, C., Meda, F., Dupont, E., Albadri, S., Quenech'Du, N., Ipendey, E., Volovitch, M., Del Bene, F., Joliot, A., Rampon, C., & Vrizz, S.** (2016). "Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) controls axon pathfinding during zebrafish development." *Developmental Biology*, 414(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.05.004>
- Gazzin, S., Strazielle, N., Schmitt, C., Fevre-Montange, M., Ostrow, J. D., Tiribelli, C., & Gherzi-Egea, J.-F.** (2008). "Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCb1 and ABCc1 between blood-brain interfaces." *Journal of Comparative Neurology*, 510(5), 497–507. <https://doi.org/10.1002/cne.21808>
- Gazzin, S., Strazielle, N., Tiribelli, C., & Gherzi-Egea, J. F.** (2012). "Transport and metabolism at blood-brain interfaces and in neural cells: Relevance to bilirubin-induced encephalopathy." *Frontiers in Pharmacology*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00089>
- Gherzi-Egea, J.-F., Babikian, A., Blondel, S., & Strazielle, N.** (2015). "Changes in the cerebrospinal fluid circulatory system of the developing rat: quantitative volumetric analysis and effect on blood-CSF permeability interpretation." *Fluids and Barriers of the CNS*, 12(8), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12987-015-0001-2>
- Gherzi-Egea, J.-F., & Damkier, H.** (2017). "Blood–brain interfaces organization in relation to inorganic ion transport, CSF secretion, and circulation." In J. Badaut & N. Plesnila (Eds.), *Brain edema : From molecular mechanisms to clinical practice* (Academic P, pp. 29–48). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803196-4.00002-3>
- Gherzi-Egea, J.-F., 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(3), 1089–1096. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.62031089.x>
- Gherzi-Egea, J.-F., 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(24), 2515–2523. <https://doi.org/10.1016/0024->

3205(88)90351-7

- Gherzi-Egea, J.-F., Perrin, R., Leininger-Muller, B., Grassiot, M.-C., Jeandeal, 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(3), 647–658.
- Gherzi-Egea, J.-F., Saudrais, E., & Strazielle, N.** (2018). "Barriers to drug distribution into the perinatal and postnatal brain." *Pharmaceutical Research*, 35(84), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2375-8>
- Gherzi-Egea, J.-F., Strazielle, N., Catala, M., Silva-Vargas, V., Doetsch, F., & Engelhardt, B.** (2018). "Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease." *Acta Neuropathologica*, 135(135), 337–361. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1807-1>
- Gherzi-Egea, J.-F., Strazielle, N., Murat, A., Jouvét, A., Buénerd, A., & Belin, M.-F.** (2006). "Brain protection at the blood-cerebrospinal fluid interface involves a glutathione-dependent metabolic barrier mechanism." *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 26(9), 1165–1175. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600267>
- Giacomini, K. M., Huang, S.-M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L. R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., Ware, J. A., Wright, S. H., Yee, S. W., Zamek-Gliszczynski, M. J., & Zhang, L.** (2010). "Membrane transporters in drug development." *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(3), 215–236. <https://doi.org/10.1038/nrd3028>
- Gill, A. J., & Kolson, D. L.** (2013). "Dimethyl fumarate modulation of immune and antioxidant responses: application to HIV therapy." *Critical Reviews in Immunology*, 33(4), 307–359. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2013007247>
- Giordano, G., & Costa, L. G.** (2012). "Developmental neurotoxicity: some old and new issues." *International Scholarly Research Network Toxicology*, 2012, 1–12. <https://doi.org/10.5402/2012/814795>
- Gitto, E., Reiter, R. J., Karbownik, M., Tan, D., Gitto, P., Barberi, S., & Barberi, I.** (2002). "Causes of oxidative stress in the pre-and perinatal period." *Biology of the Neonate*, 81, 146–157. <https://doi.org/10.1159/000051527>
- Goldmann, E.** (1909). "Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der 'vitalen Färbung.'" (H. Laupp, Ed.).
- Goldmann, E.** (1913). "Vitalfärbung am Zentralnervensystem." *Königlich Preussische Akademie Der Wissenschaften Zu Berlin. Physikalisch-Mathematische Klasse*, 1, 1–60.
- Goldmann, J., Kwidzinski, E., Brandt, C., Mahlo, J., Richter, D., & Bechmann, I.** (2006). "T cells traffic from brain to cervical lymph nodes via the cribroid plate and the nasal mucosa." *Journal of Leukocyte Biology*, 80(4), 797–801. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306176>
- Greene, C., & Campbell, M.** (2016). "Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules." *Tissue Barriers*, 4(1). <https://doi.org/10.1080/21688370.2015.1138017>
- Gromadzinska, J., Sklodowska, M., & Wasowicz, W.** (1988). "Glutathione peroxidase activity, lipid peroxides and selenium concentration in various rat organs." *Biomedica Biochimica Acta*, 47(1), 19–24.

- Gülden, M., Jess, A., Kammann, J., Maser, E., & Seibert, H. (2010). "Cytotoxic potency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cell cultures: Impact of cell concentration and exposure time." *Free Radical Biology and Medicine*, 49(8), 1298–1305. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.015>
- Gundert-Remy, U., Bernauer, U., Blömeke, B., Döring, B., Fabian, E., Goebel, C., Hessel, S., Jäckh, C., Lampen, A., Oesch, F., Petzinger, E., Völkel, W., & Roos, P. H. (2014). "Extrahepatic metabolism at the body's internal-external interfaces." *Drug Metabolism Reviews*, 46(3), 291–324. <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.900565>
- Haenen, G. R. M. M., & Bast, A. (2014). "Glutathione revisited: a better scavenger than previously thought." *Frontiers in Pharmacology*, 5(Novembre), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00260>
- Hagberg, H., Mallard, C., Ferriero, D. M., Vannucci, S. J., Levison, S. W., Vexler, Z. S., & Gressens, P. (2015). "The role of inflammation in perinatal brain injury." *Nature Reviews Neurology*, 11(4), 192–208. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.13>
- Halliwell, B., Clement, M. V., & Long, L. H. (2000). "Hydrogen peroxide in the human body." *FEBS Letters*, 486, 10–13.
- Haseloff, R. F., Dithmer, S., Winkler, L., Wolburg, H., & Blasig, I. E. (2015). "Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: Structural and functional aspects." *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 38, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.11.004>
- Hayes, J. D., Chanas, S. A., Henderson, C. J., McMahon, M., Sun, C., Moffat, G. ., Wolf, C. R., & Yamamoto, M. (2000). "The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin." *Biochemical Society Transactions*, 28(2), 33–41. <https://doi.org/10.1042/bst0280033>
- Hayes, J. D., Flanagan, J. U., & Jowsey, I. R. (2005). "Glutathione transferases." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 51–88. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857>
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). "The glutathione S-transferase supergene family: Regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance part I." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6), 445–520. <https://doi.org/10.3109/10409239509083491>
- Higgins, L. G., & Hayes, J. D. (2011). "Mechanisms of induction of cytosolic and microsomal glutathione transferase (GST) genes by xenobiotics and pro-inflammatory agents." *Drug Metabolism Reviews*, 43(2), 92–137. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.567391>
- Hirst, R. A., Sikand, K. S., Rutman, A., Mitchell, T. J., Andrew, P. W., & O'Callaghan, C. (2000). "Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency." *Infection and Immunity*, 68(3), 1557–1562. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.3.1557-1562.2000>
- Hladky, S. B., & Barrand, M. A. (2014). "Mechanisms of fluid movement into, through and out of the brain: evaluation of the evidence." *Fluids and Barriers of the CNS*, 11(26), 1–32. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-11-26>
- Hladky, S. B., & Barrand, M. A. (2018). "Elimination of substances from the brain parenchyma: efflux via perivascular pathways and via the blood–brain barrier." *Fluids and Barriers of the CNS*, 15(30), 1–73. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0113-6>
- Ho, C.-Y., Cheng, Y. T., Chau, C. F., & Yen, G. C. (2012). "Effect of diallyl sulfide on in



- vitro and in vivo Nrf2-mediated pulmonic antioxidant enzyme expression via activation ERK/p38 signaling pathway.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(1), 100–107. <https://doi.org/10.1021/jf203800d>
- Ho, Y.-S., Magnenat, J.-L., Bronson, R. T., Cao, J., Gargano, M., Sugawara, M., & Funk, C. D.** (1997). “Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia.” *Journal of Biological Chemistry*, 272, 16644–16651. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.26.16644>
- Hoffmann, M. H., & Griffiths, H. R.** (2018). “The dual role of Reactive Oxygen Species in autoimmune and inflammatory diseases: evidence from preclinical models.” *Free Radical Biology and Medicine*, 125, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.016>
- Hofmann, B., Hecht, H.-J., & Flohé, L.** (2002). “Peroxiredoxins.” *The Journal of Biological Chemistry*, 383(March/April), 347–364.
- Huang, W., Zhang, J., Washington, M., Liu, J., Parant, J. M., Lozano, G., & Moore, D. D.** (2005). “Xenobiotic stress induces hepatomegaly and liver tumors via the nuclear receptor constitutive androstane receptor.” *Molecular Endocrinology*, 19(6), 1646–1653. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0520>
- Hüppi, P. S., Warfield, S., Kikinis, R., Barnes, P. D., Zientara, G. P., Jolesz, F. A., Tsuji, M. K., & Volpe, J. J.** (1998). “Quantitative magnetic resonance imaging of brain development in premature and mature newborns.” *Annals of Neurology*, 43(2), 224–235. <https://doi.org/10.1002/ana.410430213>
- Hussein, M. H., Daoud, G. A., Kakita, H., Kato, S., Goto, T., Kamei, M., Goto, K., Nobata, M., Ozaki, Y., Ito, T., Fukuda, S., Kato, I., Suzuki, S., Sobajima, H., Hara, F., Hashimoto, T., & Togari, H.** (2010). “High cerebrospinal fluid antioxidants and interleukin 8 are protective of hypoxic brain damage in newborns.” *Free Radical Research*, 44(4), 422–429. <https://doi.org/10.3109/10715760903548245>
- Hyslop, P. A., Zhang, Z., Pearson, D. V., & Phebus, L. A.** (1995). “Measurement of striatal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro.” *Brain Research*, 671(2), 181–186. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(94\)01291-O](https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)01291-O)
- Illiff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Goldman, S. A., Nagelhus, E. A., & Nedergaard, M.** (2012). “A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid B.” *Science Translational Medicine*, 4(147), 1–11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003748>
- Imai, H., Narashima, K., Arai, M., Sakamoto, H., Chiba, N., & Nakagawa, Y.** (1998). “Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase.” *Journal of Biological Chemistry*, 273(4), 1990–1997. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.4.1990>
- Inserm.** (2004a). “Déficiences ou handicaps d’origine périnatale, dépistage et prise en charge.” *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale - Expertise collective*. Retrieved from <https://www.senat.fr/rap/r03-363/r03-inserm.pdf>
- Inserm.** (2004b). “Handicaps d’origine périnatale, aspects épidémiologiques.” *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale - Expertise collective*. Retrieved from <http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/143/?sequence=24>
- Inserm.** (2013). “Pesticides : Effets sur la santé.” *Les éditions Inserm*. Retrieved from [http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/what-is-a-risk-factor/tobacco/second-hand-smoke/?region=on#Effets\\_sur\\_la\\_santé](http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/cancer-101/what-is-a-risk-factor/tobacco/second-hand-smoke/?region=on#Effets_sur_la_santé)

- Iwamoto, N., Higashi, T., & Furuse, M.** (2016). "Localization of angulin-1 / LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells in vivo." *Cell Structure and Function*, 17(9), 564–580. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.80>.
- Jain, M., Aneja, S., Mehta, G., Ray, G. N., Batra, S., & Randhava, V. S.** (2000). "CSF interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and free radicals production in relation to clinical outcome in acute bacterial meningitis." *Indian Pediatrics*, 37(6), 608–614.
- Jakobsson, P.-J., Morgenstern, R., Mancini, J., Ford-Hutchinson, A., & Persson, B.** (2008). "Common structural features of MAPEG-a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism." *Protein Science*, 8(3), 689–692. <https://doi.org/10.1110/ps.8.3.689>
- Jesse, C. R., Bortolatto, C. F., Wilhelm, E. A., Roman, S. S., Prigol, M., & Nogueira, C. W.** (2014). "The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonist pioglitazone protects against cisplatin-induced renal damage in mice." *Journal of Applied Toxicology*, 34(1), 25–32. <https://doi.org/10.1002/jat.2818>
- Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., & Nedergaard, M.** (2015). "The glymphatic system: a beginner's guide." *Neurochemical Research*, 40(12), 2583–2599. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1581-6>
- Jia, W., Martin, T. A., Zhang, G., & Jiang, W. E. N. G.** (2013). "Junctional Adhesion Molecules in Cerebral Endothelial Tight Junction and Brain Metastasis," 2360, 2353–2359.
- Johanson, C. E., Preston, J. E., Chodobski, a, Stopa, E. G., Szmydynger-Chodobska, J., & McMillan, P. N.** (1999). "AVP V1 receptor-mediated decrease in Cl<sup>-</sup> efflux and increase in dark cell number in choroid plexus epithelium." *The American Journal of Physiology*, 276(1 Pt 1), C82-90. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.1.C82>
- Johansson, P. A., Dziegielewska, K. M., Ek, C. J., Habgood, M. D., Liddelow, S. A., Potter, A. M., Stolp, H. B., & Saunders, N. R.** (2006). "Blood-CSF barrier function in the rat embryo." *European Journal of Neuroscience*, 24(1), 65–76. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04904.x>
- Johnson, J. A., El Barbary, A., Kornguth, S. E., Brugge, J. F., & Siegel, F. L.** (1993). "Glutathione S-transferase isoenzymes in rat brain neurons and glia." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 13(5), 2013–2023.
- Jones, P., & Suggett, A.** (1968). "The catalase-hydrogen peroxide system." *Biochemical Journal*, 110, 617–620.
- Kalaria, R. N., Mitchell, M. J., & Harik, S. I.** (1988). "Monoamine oxidases of the human brain and liver." *Brain*, 111(6), 1441–1451. <https://doi.org/10.1093/brain/111.6.1441>
- Kaminski, M., Bechmann, I., Pohland, M., Kiwit, J., Nitsch, R., & Glumm, J.** (2012). "Migration of monocytes after intracerebral injection at entorhinal cortex lesion site." *Journal of Leukocyte Biology*, 92(1), 31–39. <https://doi.org/10.1189/jlb.0511241>
- Kaur, C., Rathnasamy, G., & Ling, E.-A.** (2016). "The choroid plexus in healthy and diseased brain." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlv030>
- Keep, R. F., & Jones, H. C.** (1990). "A morphometric study on the development of the lateral ventricle choroid plexus, choroid plexus capillaries and ventricular ependyma in the rat." *Developmental Brain Research*, 56(1), 47–53. [https://doi.org/10.1016/0165-3806\(90\)90163-S](https://doi.org/10.1016/0165-3806(90)90163-S)

- Khuth, S. T., Strazielle, N., Giraudon, P., Belin, M. F., & Gherzi-Egea, J. F. (2005).** “Impairment of blood-cerebrospinal fluid barrier properties by retrovirus-activated T lymphocytes: Reduction in cerebrospinal fluid-to-blood efflux of prostaglandin E2.” *Journal of Neurochemistry*, 94(6), 1580–1593. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03309.x>
- Kiecker, C. (2018).** “The origins of the circumventricular organs.” *Journal of Anatomy*, 232(4), 540–553. <https://doi.org/10.1111/joa.12771>
- Kish, S. J., Morito, C., & Hornykiewicz, O. (1985).** “Glutathione peroxidase activity in parkinson’s disease brain.” *Neuroscience Letters*, 58, 343–346.
- Kolm, R. H., Danielson, U. H., Zhang, Y., Talalay, P., & Mannervik, B. (1995).** “Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies.” *The Biochemical Journal*, 311(2), 453–459. <https://doi.org/10.1042/bj3110453>
- Korn, J., Christ, B., & Kurz, H. (2002).** “Neuroectodermal origin of brain pericytes and vascular smooth muscle cells.” *Journal of Comparative Neurology*, 442(1), 78–88. <https://doi.org/10.1002/cne.1423>
- Korogod, N., Petersen, C. C. H., & Knott, G. W. (2015).** “Ultrastructural analysis of adult mouse neocortex comparing aldehyde perfusion with cryo fixation.” *ELife*, 4(AUGUST2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.05793>
- Kranich, O., Hamprecht, B., & Dringen, R. (1996).** “Different preferences in the utilization of amino acids for glutathione synthesis in cultured neurons and astroglial cells derived from rat brain.” *Neuroscience Letters*, 219(3), 211–214. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(96\)13217-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(96)13217-1)
- Kratzer, I., Liddelow, S. A., Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F. (2013).** “Developmental changes in the transcriptome of the rat choroid plexus in relation to neuroprotection.” *Fluids and Barriers of the CNS*, 10(1), 25. <https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-25>
- Kratzer, I., Strazielle, N., Saudrais, E., Mönkkönen, K., Malleval, C., Blondel, S., & Gherzi-Egea, J.-F. (2018).** “Glutathione conjugation at the blood–CSF barrier efficiently prevents exposure of the developing brain fluid environment to blood-borne reactive electrophilic substances.” *The Journal of Neuroscience*, 38(14), 3466–3479. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2967-17.2018>
- Kratzer, I., Vasiljevic, A., Rey, C., Fevre-Montange, M., Saunders, N., Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F. (2012).** “Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier.” *Histochemistry and Cell Biology*, 138(6), 861–879. <https://doi.org/10.1007/s00418-012-1001-9>
- Kutuzov, N., Flyvbjerg, H., & Lauritzen, M. (2018).** “Contributions of the glycocalyx, endothelium, and extravascular compartment to the blood–brain barrier.” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1–10. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802155115>
- Langlet, F., Mullier, A., Bouret, S. G., Prevot, V., & Dehouck, B. (2013).** “Tanycyte-like cells form a blood-cerebrospinal fluid barrier in the circumventricular organs of the mouse brain.” *Journal of Comparative Neurology*, 521(15), 3389–3405. <https://doi.org/10.1002/cne.23355>
- Last, R. J., & Tompsett, D. H. (1953).** “Casts of the cerebral ventricles.” *British Journal of Surgery*, 40(164), 525–543. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1926.02200230053004>
- Lee, A., Anderson, A. R., Rayfield, A. J., Stevens, M. G., Poronnik, P., Meabon, J. S., Cook, D. G., & Pow, D. V. (2012).** “Localisation of novel forms of glutamate transporters

- and the cystine-glutamate antiporter in the choroid plexus: Implications for CSF glutamate homeostasis." *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 43(1), 64–75.  
<https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2011.09.006>
- Leggas, M., Adachi, M., Scheffer, G., Sun, D., Wielinga, P., Du, G., Mercer, K., Zhuang, Y., Panetta, J., Johnston, B., Scheper, R., Stewart, C., & Schuetz, J.** (2004). "MRP4 confers resistance to topotecan and protects the brain from chemotherapy." *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7612–7621. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7612-7621.2004>
- Lehmann, J. C. U., Listopad, J. J., Rentzsch, C. U., Igney, F. H., Von Bonin, A., Hennekes, H. H., Asadullah, K., & Docke, W. D. F.** (2007). "Dimethylfumarate induces immunosuppression via glutathione depletion and subsequent induction of heme oxygenase 1." *Journal of Investigative Dermatology*, 127(4), 835–845.  
<https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700686>
- Lei, B., Adachi, N., & Arai, T.** (1998). "Measurement of the extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the brain by microdialysis." *Brain Research Protocols*, 3(1), 33–36. [https://doi.org/10.1016/S1385-299X\(98\)00018-X](https://doi.org/10.1016/S1385-299X(98)00018-X)
- Leininger-Muller, B., Gherzi-Egea, J.-F., Siest, G., & Minn, A.** (1994). "Induction and immunological characterization of the uridine diphosphate-glucuronosyltransferase conjugating 1-naphthol in the rat choroid plexus." *Neuroscience Letters*, 175(1–2), 37–40.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)91072-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)91072-3)
- Lewandosky, M.** (1900). "Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit." *Zeitschrift Für Klinische Medizin*, 40, 480–494.
- Liang, Q., Sheng, Y., Jiang, P., Ji, L., Xia, Y., Min, Y., & Wang, Z.** (2011). "The gender-dependent difference of liver GSH antioxidant system in mice and its influence on isoleucine-induced liver injury." *Toxicology*, 280(1–2), 61–69.  
<https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.11.010>
- Liddelow, S. A., Dziegielewska, K. M., Ek, C. J., Habgood, M. D., Bauer, H., Bauer, H.-C., Lindsay, H., Wakefield, M. J., Strazielle, N., Kratzer, I., Möllgård, K., Gherzi-Egea, J.-F., & Saunders, N. R.** (2013). "Mechanisms that determine the internal environment of the developing brain: a transcriptomic, functional and ultrastructural approach." *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065629>
- Liebner, S., Corada, M., Bangsow, T., Babbage, J., Taddei, A., Czupalla, C. J., Reis, M., Felici, A., Wolburg, H., Fruttiger, M., Taketo, M. M., von Melchner, H., Plate, K. H., Gerhardt, H., & Dejana, E.** (2008). "Wnt/β-catenin signaling controls development of the blood–brain barrier." *The Journal of Cell Biology*, 183(3), 409–417.  
<https://doi.org/10.1083/jcb.200806024>
- Liebner, S., Dijkhuizen, R. M., Reiss, Y., Plate, K. H., Agalliu, D., & Constantin, G.** (2018). "Functional morphology of the blood–brain barrier in health and disease." *Acta Neuropathologica*, 135(135), 1–26. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1815-1>
- Linker, R. A., Lee, D. H., Ryan, S., Van Dam, A. M., Conrad, R., Bista, P., Zeng, W., Hronowsky, X., Buko, A., Chollate, S., Ellrichmann, G., Brück, W., Dawson, K., Goelz, S., Wiese, S., Scannevin, R. H., Lukashev, M., & Gold, R.** (2011). "Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway." *Brain*, 134(3), 678–692. <https://doi.org/10.1093/brain/awq386>
- Litjens, N. H. R., Burggraaf, J., Van Strijen, E., Van Gulpen, C., Mattie, H., Schoemaker, R. C., Van Dissel, J. T., Thio, H. B., & Nibbering, P. H.** (2004). "Pharmacokinetics of oral fumarates in healthy subjects." *British Journal of Clinical Pharmacology*, 58(4), 429–



432. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2004.02145.x>
- Litwack, G., Ketterer, B., & Arias, I. M.** (1971). "Ligandin: a hepatic protein which binds steroids, bilirubin, carcinogens and a number of exogenous organic anions." *Nature*, 234(5330), 466–467. <https://doi.org/10.1038/234466a0>
- Liu, C.-Y., Yang, Y., Ju, W.-N., Wang, X., & Zhang, H.-L.** (2018). "Emerging Roles of Astrocytes in Neuro-Vascular Unit and the Tripartite Synapse With Emphasis on Reactive Gliosis in the Context of Alzheimer's Disease." *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00193>
- Liu, W. Y., Wang, Z. Bin, Zhang, L. C., Wei, X., & Li, L.** (2012). "Tight junction in blood-brain barrier: An overview of structure, regulation, and regulator substances." *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 18(8), 609–615. <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2012.00340.x>
- Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T. J., Eccles, J. D., Rouhani, S. J., Peske, J. D., Derecki, N. C., Castle, D., Mandell, J. W., Lee, K. S., Harris, T. H., & Kipnis, J.** (2015). "Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels." *Nature*, 523(7560), 337–341. <https://doi.org/10.1038/nature14432>
- Lubos, E., Loscalzo, J., & Handy, D. E.** (2011). "Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities." *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1957–1997. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>
- Lun, M. P., Johnson, M. B., Broadbelt, K. G., Watanabe, M., Kang, Y., Chau, K. F., Springel, M. W., Malesz, A., Sousa, A. M. M., Pletikos, M., Adelita, T., Calicchio, M. L., Zhang, Y., Holtzman, M. J., Lidov, H. G. W., Sestan, N., Steen, H., Monuki, E. S., & Lehtinen, M. K.** (2015). "Spatially Heterogeneous Choroid Plexus Transcriptomes Encode Positional Identity and Contribute to Regional CSF Production." *The Journal of Neuroscience*, 35(12), 4903–4916. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3081-14.2015>
- Lun, M. P., Monuki, E. S., & Lehtinen, M. K.** (2015). "Development and functions of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system." *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3921>
- Ma, Q.** (2013). "Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 53(1), 401–426. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320>
- Ma, Q., Ineichen, B. V., Detmar, M., & Proulx, S. T.** (2017). "Outflow of cerebrospinal fluid is predominantly through lymphatic vessels and is reduced in aged mice." *Nature Communications*, 8(1), 1434. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01484-6>
- Madsen, J. K., & Møllgård, K.** (1979). "The tight epithelium of the Mongolian gerbil subcommissural organ as revealed by freeze-fracturing." *Journal of Neurocytology*, 8(4), 481–491. <https://doi.org/10.1007/BF01214804>
- Maglich, J. M., Stoltz, C. M., Goodwin, B., Diane, H.-B., Moore, J. T., & Kliewer, S.** (2002). "Nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor regulate overlapping but distinct sets of genes involved in xenobiotic detoxification." *Molecular Pharmacology*, 62(3), 638–646. <https://doi.org/10.1124/mol.62.3.638>
- Mandal, P. K., Tripathi, M., & Sugunan, S.** (2012). "Brain oxidative stress: Detection and mapping of anti-oxidant marker 'Glutathione' in different brain regions of healthy male/female, MCI and Alzheimer patients using non-invasive magnetic resonance spectroscopy." *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 417(1), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.11.047>

- Mannervik, B., Board, P. G., Hayes, J. D., Listowsky, I., & Pearson, W. R.** (2005). "Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases." *Methods in Enzymology*, 401, 1–8. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)01001-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)01001-3)
- Margoliash, E., & Novogrodsky, A.** (1958). "A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1 : 2 : 4-triazole." *Biochemical Journal*, 58(3), 468–475.
- Mariano, C., Sasaki, H., Brites, D., & Alexandra, M.** (2011). "A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance." *European Journal of Cell Biology*, 90(10), 787–796. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.06.005>
- Marowsky, A., Burgener, J., Falck, J. R., Fritschy, J. M., & Arand, M.** (2009). "Distribution of soluble and microsomal epoxide hydrolase in the mouse brain and its contribution to cerebral epoxyeicosatrienoic acid metabolism." *Neuroscience*, 163(2), 646–661. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.06.033>
- Martín-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., Simmons, D., & Dejana, E.** (1998). "Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration." *Journal of Cell Biology*, 142(1), 117–127. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.1.117>
- Marttila, R. J., Lorentz, H., & Rinne, U. K.** (1988). "Oxygen toxicity protecting enzymes in Parkinson's disease. Increase of superoxide dismutase-like activity in the substantia nigra and basal nucleus." *Journal of the Neurological Sciences*, 86, 321–331. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(88\)90108-6](https://doi.org/10.1016/0022-510X(88)90108-6)
- Masuda, S., Oda, Y., Sasaki, H., Ikenouchi, J., Higashi, T., Akashi, M., Nishi, E., & Furuse, M.** (2011). "LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells." *Journal of Cell Science*, 124(4), 548–555. <https://doi.org/10.1242/jcs.072058>
- Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C., & Ottersen, O. P.** (2010). "The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: An electron microscopic 3D reconstruction." *Glia*, 58(9), 1094–1103. <https://doi.org/10.1002/glia.20990>
- McLellan, L. I., Kerr, L. A., Cronshaw, A. D., & Hayes, J. D.** (1991). "Regulation of mouse glutathione S-transferases by chemoprotectors." *Biochemical Journal*, 276, 461–469.
- Mello, T., Zanieri, F., Ceni, E., & Galli, A.** (2015). "Oxidative stress in the healthy and wounded hepatocyte: a cellular organelles perspective." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/8327410>
- Millar, L. J., Shi, L., Hoerder-Suabedissen, A., & Molnár, Z.** (2017). "Neonatal hypoxia ischaemia: mechanisms, models, and therapeutic challenges." *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11(78), 1–36. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00078>
- Mirochnitchenko, O., Prokopenko, O., Palnitkar, U., Kister, I., Powell, W. S., & Inouye, M.** (2000). "Endotoxemia in transgenic mice overexpressing human glutathione peroxidases." *Circulation Research*, 87(4), 289–295. <https://doi.org/10.1161/01.RES.87.4.289>
- Miyawaki, T., Matsui, K., & Takashima, S.** (1998). "Developmental characteristics of vessel density in the human fetal and infant brains." *Early Human Development*, 53(1), 65–72. [https://doi.org/S0378-3782\(98\)00043-7](https://doi.org/S0378-3782(98)00043-7)
- Mokgokong, R., Wang, S., Taylor, C. J., Barrand, M. A., & Hladky, S. B.** (2014). "Ion

- transporters in brain endothelial cells that contribute to formation of brain interstitial fluid.” *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 466(5), 887–901.  
<https://doi.org/10.1007/s00424-013-1342-9>
- Møllgård, K., Balslev, Y., Lauritzen, B., & Saunders, N. R.** (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.
- Møllgård, K., & Saunders, N. R.** (1986). “The development of the human blood-brain and blood-CSF barriers.” *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 12(4), 337–358.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.1986.tb00146.x>
- Morel, F., Rauch, C., Petit, E., Piton, A., Theret, N., Coles, B., & Guillouzo, A.** (2004). “Gene and protein characterization of the human glutathione S-transferase Kappa and evidence for a peroxisomal localization.” *Journal of Biological Chemistry*, 279(16), 16246–16253. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313357200>
- Mottahedin, A., Smith, P. L. P., Hagberg, H., Ek, C. J., & Mallard, C.** (2017). “TLR2-mediated leukocyte trafficking to the developing brain.” *Journal of Leukocyte Biology*, 101(1), 297–305. <https://doi.org/10.1189/jlb.3A1215-568R>
- Mrowietz, U., Morrison, P. J., Suhrkamp, I., Kumanova, M., & Clement, B.** (2018). “The pharmacokinetics of fumaric acid esters reveal their in vivo effects.” *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(1), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2017.11.002>
- Muchová, J., Žitňanová, I., & Ďuračková, Z.** (2014). “Oxidative stress and Down syndrome. Do antioxidants play a role in therapy?” *Physiological Research*, 63(5), 535–542.  
<https://doi.org/932722>
- Müller, F., & O’Rahilly, R.** (1990). “The human brain at stages 18–20, including the choroid plexuses and the amygdaloid and septal nuclei.” *Anatomy and Embryology*, 182(3), 285–306. <https://doi.org/10.1007/BF00185521>
- Nagar, R., Khan, A. R., Poonia, A., Mishra, P. K., & Singh, S.** (2015). “Metabolism of cisplatin in the organs of Rattus norvegicus: Role of glutathione S-transferase P1.” *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 40(1), 45–51.  
<https://doi.org/10.1007/s13318-014-0176-y>
- Nagelhus, E. A., & Ottersen, O. P.** (2013). “Physiological Roles of Aquaporin-4 in Brain.” *Physiological Reviews*, 93(4), 1543–1562. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2013>
- Narita, K., Kozuka-Hata, H., Nonami, Y., Ao-Kondo, H., Suzuki, T., Nakamura, H., Yamakawa, K., Oyama, M., Inoue, T., & Takeda, S.** (2012). “Proteomic analysis of multiple primary cilia reveals a novel mode of ciliary development in mammals.” *Biology Open*, 1(8), 815–825. <https://doi.org/10.1242/bio.20121081>
- Narita, K., & Takeda, S.** (2015). “Cilia in the choroid plexus: their roles in hydrocephalus and beyond.” *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(February), 1–5.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00039>
- Natarajan, K., Xie, Y., Baer, M. R., & Ross, D. D.** (2012). “Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance.” *Biochemical Pharmacology*, 83(8), 1084–1103. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.002>
- Navarro, S. L., Chang, J. L., Peterson, S., Chen, C., King, I. B., Schwarz, Y., Li, S. S., Li, L., Potter, J. D., & Lampe, J. W.** (2009). “Modulation of human serum glutathione S-transferase A1/2 concentration by cruciferous vegetables in a controlled feeding study is influenced by GSTM1 and GSTT1 genotypes.” *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 18(11), 2974–2978. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0701>

- Nicchia, G. P., Srinivas, M., Li, W., Brosna, C. F., Frigeri, A., & Spray, D. C. (2005).** “New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43.” *The FASEB Journal*, 22, 1–23. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3281fje>
- NIH. (2018).** “ClinicalTrials.gov.”
- Nilsson, C., Ståhlberg, F., Thomsen, C., Henriksen, O., Herning, M., & Owman, C. (1992).** “Circadian variation in human cerebrospinal fluid production measured by magnetic resonance imaging.” *The American Journal of Physiology*, 262, 1–5. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1992.262.1.R20>
- 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(3), 653–660. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302070>
- Noureldein, M., Mardare, R., Pickard, J., Shing, H. L., & Eisenhut, M. (2018).** “Cerebrospinal fluid protein and glucose levels in neonates with a systemic inflammatory response without meningitis.” *Fluids and Barriers of the CNS*, 15(1), 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12987-018-0095-4>
- Okonkwo, P. O., Orlowski, M., & Green, J. P. (1974).** “Enzymes of the  $\gamma$ -Glutamyl Cycle in the Choroid Plexus and Brain.” *Journal of Neurochemistry*, 22(6), 1053–1058. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1974.tb04336.x>
- Oldendorf, W. H., Cornford, M. E., & Brown, W. J. (1977).** “Large apparent work capability of blood-brain-barrier - study of mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of rat.” *Annals of Neurology*, 1, 409–417. <https://doi.org/10.1002/ana.410010502>
- OMS. (2001).** “Classification internationale du fonctionnement, du handicap et de la santé.” *Organisation Mondiale de la Santé*. Genève. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- OMS. (2011).** “Rapport mondial sur le handicap.” *Organisation Mondiale de la Santé*. Retrieved from [http://www.who.int/disabilities/world\\_report/2011/accessible\\_fr.pdf?ua=1](http://www.who.int/disabilities/world_report/2011/accessible_fr.pdf?ua=1)
- Osada, T., Gu, Y.-H., Kanazawa, M., Tsubota, Y., Hawkins, B. T., Spatz, M., Milner, R., & Del Zoppo, G. J. (2011).** “Interendothelial claudin-5 expression depends on cerebral endothelial cell-matrix adhesion by  $\beta$ 1-integrins.” *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.99>
- Ozsurekci, Y., & Aykac, K. (2016).** “Oxidative stress related diseases in newborns.” *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/2768365>
- Papaiconomou, C., Bozanovic-Sosic, R., Zakharov, A., & Johnston, M. (2002).** “Does neonatal cerebrospinal fluid absorption occur via arachnoid projections or extracranial lymphatics?” *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283(4), R869–76. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00173.2002>
- Park, E. Y., Cho, I. J., & Kim, S. G. (2004).** “Transactivation of the PPAR-responsive enhancer module in chemopreventive glutathione S-transferase gene by the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  and retinoid X receptor heterodimer.” *Cancer Research*, 64(10), 3701–3713. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3924>
- Perrone, S., Tataranno, L. M., Stazzoni, G., Ramenghi, L., & Buonocore, G. (2015).** “Brain susceptibility to oxidative stress in the perinatal period.” *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 28, 2291–2295. <https://doi.org/10.3109/14767058.2013.796170>



- Peterson, G. L.** (1977). "A simplification of the protein assay method of Lowery et al. which is more generally applicable." *Analytical Biochemistry*, 83, 346–356.
- Pherwani, A. V., Puri, V. C., & Malhotra, V.** (1999). "Estimation of hydrogen peroxide levels in the blood and urine of normal infants and infants with sepsis." *Bombay Hospital Journal*, 41(8).
- Philbert, M. A., Beiswanger, C. M., Waters, D. K., Reuhl, K. R., & Lowndes, H. E.** (1991). "Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat: Histochemical localization by mercury orange and o-phthaldialdehyde-induced histofluorescence." *Toxicology and Applied Pharmacology*, 107(2), 215–227. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(91\)90204-R](https://doi.org/10.1016/0041-008X(91)90204-R)
- Ping, Z., Liu, W., Kang, Z., Cai, J., Wang, Q., Cheng, N., Wang, S., Wang, S., Zhang, J. H., & Sun, X.** (2010). "Sulforaphane protects brains against hypoxic-ischemic injury through induction of Nrf2-dependent phase 2 enzyme." *Brain Research*, 1343, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.04.036>
- Pizzo, M. E., & Thorne, R. G.** (2017). "The Extracellular and Perivascular Spaces of the Brain." In *Brain Edema* (pp. 105–127). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803196-4.00006-0>
- Ploemen, J. H. T. M., van Ommen, B., & van Bladeren, P. J.** (1990). "Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate." *Biochemical Pharmacology*, 40(7), 1631–1635. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(90\)90465-W](https://doi.org/10.1016/0006-2952(90)90465-W)
- Praetorius, J., & Damkier, H. H.** (2017). "Transport across the choroid plexus epithelium." *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 312(6), 673–686. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00041.2017>
- Prajapati, B. S., Prajapati, R. B., & Vora, H. D.** (2015). "Analysis of cerebrospinal fluid (CSF) in children." *Pediatric Infectious Disease*, 7(1), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.pid.2015.04.001>
- Priestley, J. R. C., Kautenburg, K. E., Casati, M. C., Endres, B. T., Geurts, A. M., & Lombard, J. H.** (2016). "The NRF2 knockout rat: a new animal model to study endothelial dysfunction, oxidant stress, and microvascular rarefaction." *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 310(4), H478–H487. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00586.2015>
- Rae, C. D., & Williams, S. R.** (2017). "Glutathione in the human brain: Review of its roles and measurement by magnetic resonance spectroscopy." *Analytical Biochemistry*, 529, 127–143. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.12.022>
- Ransohoff, R. M., & Engelhardt, B.** (2012). "The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system." *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nri3265>
- Rao, V. V., Dahlheime, J. L., Bardgett, M. E., Snyder, A. Z., Finch, R. A., Sartorelli, A. C., & Piwnica-Worms, D.** (1999). "Choroid plexus epithelial expression of MDR1 P glycoprotein and multidrug resistance-associated protein contribute to the blood-cerebrospinal-fluid drug-permeability barrier." *Medical Sciences*, 96(7), 3900–3905. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3900>
- Raza, H.** (2011). "Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: Implications in oxidative stress, toxicity and disease." *FEBS Journal*, 278(22), 4243–4251. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08358.x>

- Reichel, A.** (2015). "Pharmacokinetics of CNS penetration." In L. Di & E. H. Kerns (Eds.), *Blood-brain barrier in drug discovery: optimizing brain exposure of CNS drugs and minimizing brain side effects for peripheral drugs* (Wiley). John Wiley & Sons.
- RHEOP.** (2017). "Handicaps sévères et mortalité." *Bulletin du Registre des Handicaps de l'Enfant et Observatoire Périnatal*. Retrieved from [https://rheop.univ-grenoble-alpes.fr/sites/rheop/files/Mediatheque/Documents/bulletin\\_du\\_rheop-2017-final.pdf](https://rheop.univ-grenoble-alpes.fr/sites/rheop/files/Mediatheque/Documents/bulletin_du_rheop-2017-final.pdf)
- Richard, K., Hume, R., Kaptein, E., Stanley, E. L., Visser, T. J., & Coughtrie, M. W. H.** (2001). "Sulfation of thyroid hormone and dopamine during human development: Ontogeny of phenol sulfotransferases and arylsulfatase in liver, lung, and brain." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(6), 2734–2742. <https://doi.org/10.1210/jc.86.6.2734>
- Roberts, J. R., Dawley, E. H., & Reigart, J. R.** (2018). "Children's low-level pesticide exposure and associations with autism and ADHD: a review." *Pediatric Research*, 1. <https://doi.org/10.1038/s41390-018-0200-z>
- Rochette, A., Rancourt, M. M., Sola, C., Prodhomme, O., Saguintaah, M., Schaub, R., Molinari, N., Capdevila, X., & Dadure, C.** (2016). "Cerebrospinal fluid volume in neonates undergoing spinal anaesthesia: A descriptive magnetic resonance imaging study." *British Journal of Anaesthesia*, 117(2), 214–219. <https://doi.org/10.1093/bja/aew185>
- Roux, E., & Borrel, A.** (1898). "Tétanos cérébral et immunité contre le tétanos." *Annales de l'Institut Pasteur: Journal de Microbiologie*, (12), 225–239.
- Rubin, R. C., Henderson, E. S., Ommaya, A. K., Walker, M. D., & Rall, D. P.** (1966). "The production of cerebrospinal fluid in man and its modification by acetazolamide." *Journal of Neurosurgery*, 25(4), 430–436. <https://doi.org/10.3171/jns.1966.25.4.0430>
- Russel, W. M. S., & Burch, L. R.** (1959). "The principles of human experimental technique." Methuen.
- Saccoccia, F., Angelucci, F., Boumis, G., Desiato, G., Miele, A. E., & Bellelli, A.** (2014). "Selenocysteine robustness versus cysteine versatility: a hypothesis on the evolution of the moonlighting behaviour of peroxiredoxins." *Biochemical Society Transactions*, 42(6), 1768–1772. <https://doi.org/10.1042/BST20140212>
- Safiulina, V. F., Afzalov, R., Khiroug, L., Cherubini, E., & Giniatullin, R.** (2006). "Reactive oxygen species mediate the potentiating effects of ATP on GABAergic synaptic transmission in the immature hippocampus." *Journal of Biological Chemistry*, 281(33), 23464–23470. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601627200>
- Saito, Y., & Wright, E. M.** (1983). "Bicarbonate transport across the frog choroid plexus and its control by cyclic nucleotides." *J. Physiol*, 336, 635–648.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.-D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., & Tsukita, S.** (2000). "Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands." *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4131–4142. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4131>
- Sakka, L., Coll, G., & Chazal, J.** (2011). "Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid." *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128(6), 309–316. <https://doi.org/10.1016/j.anorl.2011.03.002>
- Sampath, J., Long, P. R., Shepard, R. L., Xia, X., Devanarayan, V., Sandusky, G. E., Perry, W. L., Dantzig, A. H., Williamson, M., Rolfe, M., & Moore, R. E.** (2003). "Human SPF45, a splicing factor, has limited expression in normal tissues, is overexpressed in many tumors, and can confer a multidrug-resistant phenotype to cells."

- American Journal of Pathology*, 163(5), 1781–1790. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63538-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63538-9)
- Sanaei Nezhad, F., Anton, A., Parkes, L. M., Deakin, B., & Williams, S. R.** (2017). “Quantification of glutathione in the human brain by MR spectroscopy at 3 Tesla: Comparison of PRESS and MEGA-PRESS.” *Magnetic Resonance in Medicine*, 78(4), 1257–1266. <https://doi.org/10.1002/mrm.26532>
- Sandberg, M., Patil, J., D’Angelo, B., Weber, S. G., & Mallard, C.** (2014). “NRF2-regulation in brain health and disease: Implication of cerebral inflammation.” *Neuropharmacology*, 79, 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.11.004>
- Sano, K., Totsuka, Y., Ikegami, Y., & Uesugi, T.** (2002). “Metabolism of sulphobromophthalein II. Species differences between rats, guinea-pigs and rabbits.” *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 54(2), 231–239. <https://doi.org/10.1211/0022357021778420>
- Sapin, V.** (2008). “Alcohol and pregnancy: diagnostic aspects and abnormalities in the placental vitamin a pathway.” *Annales de Biologie Clinique*, 66(5), 509–513. <https://doi.org/10.1684/abc.2008.0271>
- Saudrais, E., Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F.** (2018). “Choroid plexus glutathione peroxidases are instrumental in protecting the brain fluid environment from hydroperoxides during postnatal development.” *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 315, 445–456. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00094.2018.-Hydrogen>
- Saunders, N. R., Dreifuss, J.-J., Dziegielewska, K. M., Johansson, P. A., Habgood, M. D., Møllgård, K., Bauer, H.-C., Drewes, L. R., & Engelhardt, B.** (2014). “The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history.” *Frontiers in Neuroscience*, 8(404), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00404>
- Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Møllgård, K., & Habgood, M. D.** (2018). “Physiology and molecular biology of barrier mechanisms in the fetal and neonatal brain.” *The Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/JP275376>
- Saunders, N. R., Liddelow, S. A., & Dziegielewska, K. M.** (2012). “Barrier mechanisms in the developing brain.” *Frontiers in Pharmacology*, 3 MAR, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00046>
- Sävman, K., Blennow, M., Gustafson, K., Tarkowski, E., & Hagberg, H.** (1998). “Cytokine response in cerebrospinal fluid after birth asphyxia.” *Pediatric Research*, 43(6), 746–751. <https://doi.org/10.1203/00006450-199806000-00006>
- Scannevin, R. H., Chollate, S., Jung, M. -y., Shackett, M., Patel, H., Bista, P., Zeng, W., Ryan, S., Yamamoto, M., Lukashev, M., & Rhodes, K. J.** (2012). “Fumarates Promote Cytoprotection of Central Nervous System Cells against Oxidative Stress via the Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Like 2 Pathway.” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(1), 274–284. <https://doi.org/10.1124/jpet.111.190132>
- Schlageter, K. E., Molnar, P., Lapin, G. D., & Groothuis, D. R.** (1999). “Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: Microvessel populations with distinctive structural and functional properties.” *Microvascular Research*, 58(3), 312–328. <https://doi.org/10.1006/mvre.1999.2188>
- Schmitt, C., Strazielle, N., Richaud, P., Bouron, A., & Gherzi-Egea, J.-F.** (2011). “Active transport at the blood-CSF barrier contributes to manganese influx into the brain.” *Journal of Neurochemistry*, 117(4), 747–756. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07246.x>
- Schroeter, M. L., Mertsch, K., Giese, H., Muller, S., Sporbert, A., Hickel, B., & Blasig, I.**

- E. (1999). "Astrocytes enhance radical defense in capillary endothelial cells constituting the blood-brain barrier." *FEBS Letters*, 449(2,3), 241–244. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00451-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00451-2)
- Schultz, W. J., Brownfield, M. S., & Kozlowski, G. P. (1977). "The Hypothalamo-Choroidal Tract." *Cell and Tissue Research*, 178, 129–141.
- Seiler, A., Schneider, M., Förster, H., Roth, S., Wirth, E. K., Culmsee, C., Plesnila, N., Kremmer, E., Rådmark, O., Wurst, W., Bornkamm, G. W., Schweizer, U., & Conrad, M. (2008). "Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death." *Cell Metabolism*, 8(3), 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.07.005>
- Senjo, M., Ishibashi, T., Terashima, T., & Inoue, Y. (1986). "Successive appearance of glutathione S-transferase-positive cells in developing rat brain: choroid plexus, pia mater, ventricular zone and astrocytes." *Neuroscience Letters*, 66, 131–134.
- Shah, S. S., Ebberson, J., Kestenbaum, L. A., Hodinka, R. L., & Zorc, J. J. (2011). "Age-specific reference values for cerebrospinal fluid protein concentration in neonates and young infants." *Journal of Hospital Medicine*, 6(1), 22–27. <https://doi.org/10.1002/jhm.711>
- Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P. O., Terasaki, T., & Scherrmann, J. M. (2011). "Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels." *Molecular Pharmaceutics*, 8(4), 1332–1341. <https://doi.org/10.1021/mp200129p>
- Sherratt, P. J., Manson, M. M., Thomson, A. M., Hissink, E. A., Neal, G. E., van Bladeren, P. J., Green, T., & Hayes, J. D. (1998). "Increased bioactivation of dihaloalkanes in rat liver due to induction of class theta glutathione S-transferase T1-1." *The Biochemical Journal*, 335(3), 619–630. <https://doi.org/10.1042/bj3350619>
- Simonson, S. G., Zhang, J., Canada, A. T., Su, Y.-F., Benveniste, H., & Piantadosi, C. A. (1993). "Hydrogen peroxide production by monoamine oxidase during ischemia-reperfusion in the rat brain." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 13(1), 125–134. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.1993.15>
- Skopelitou, K., Platis, D., Axarli, I., & Labrou, N. E. (2008). "Glutathione transferases in drug discovery and development: towards safer and efficacious drugs." In Atta-ur-Rahman, G. W. Caldwell, M. I. Choudhary, & Z. Yan (Eds.), *Frontiers in Drug Design & Discovery* (pp. 1–22). Bentham Science. <https://doi.org/10.2174/978160805202810904010023>
- Slivka, A., Mytilineou, C., & Cohen, G. (1987). "Histochemical evaluation of glutathione in brain." *Brain Research*, 409(2), 275–284. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90712-8](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90712-8)
- Smith, M. W., & Gumbleton, M. (2006). "Endocytosis at the blood-brain barrier: From basic understanding to drug delivery strategies." *Journal of Drug Targeting*, 14(4), 191–214. <https://doi.org/10.1080/10611860600650086>
- Smyth, R. M. D., Gargon, E., Kirkham, J., Cresswell, L., Golder, S., Smyth, R., & Williamson, P. (2012). "Adverse drug reactions in children-A systematic review." *PLoS ONE*, 7(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024061>
- Spasojević, I., Mojović, M., Stević, Z., Spasić, S. D., Jones, D. R., Morina, A., & Spasić, M. B. (2010). "Bioavailability and catalytic properties of copper and iron for Fenton chemistry in human cerebrospinal fluid." *Redox Report : Communications in Free Radical Research*, 15(1), 29–35. <https://doi.org/10.1179/174329210X12650506623087>



- Spector, R.** (2009). "Nutrient transport systems in brain: 40 years of progress." *Journal of Neurochemistry*, 111(2), 315–320. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06326.x>
- Spector, R., Keep, R. F., Robert Snodgrass, S., Smith, Q. R., & Johanson, C. E.** (2015). "A balanced view of choroid plexus structure and function: Focus on adult humans." *Experimental Neurology*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.02.032>
- Spector, R., Snodgrass, S. R., & Johanson, C. E.** (2015). "A balanced view of the cerebrospinal fluid composition and functions: Focus on adult humans." *Experimental Neurology*, 273, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.027>
- Spencer, S. R., Wilczak, C. A., & Talalay, P.** (1990). "Induction of glutathione transferases and NAD(P)H:quinone reductase by fumaric acid derivatives in rodent cells and tissues." *Cancer Research*, 50(24), 7871–7875.
- Stern, L., & Gautier, R.** (1918a). "Le passage dans le liquide céphalo-rachidien de substances introduites dans la circulation et leur action sur le système nerveux central chez les différentes espèces animales." *Comptes Rendus Des Séances de La Société de Physique et d'histoire Naturelle de Genève*, 35, 58–60.
- Stern, L., & Gautier, R.** (1918b). "Passage simultané des substances dans le liquide céphalo-rachidien et dans les centres nerveux." *Comptes Rendus Des Séances de La Société de Physique et d'histoire Naturelle de Genève*, 35, 91–94.
- Stern, L., & Rapoport, J. L.** (1928a). "Les échanges entre le liquide céphalorachidien et les éléments nerveux cérébro-spinaux." *Comptes Rendus Des Séances de La Société de Biologie*, 98, 1518–1519.
- Stern, L., & Rapoport, J. L.** (1928b). "Les rapports entre l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique et les altérations de son substratum morphologique." *Comptes Rendus Des Séances de La Société de Biologie*, 98, 1515–1517.
- Stolp, H. B., & Dziegielewska, K. M.** (2009). "Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases." *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 35, 132–146. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.01005.x>
- Stolp, H. B., Liddel, S. A., Sá-Pereira, I., Dziegielewska, K. M., & Saunders, N. R.** (2013). "Immune responses at brain barriers and implications for brain development and neurological function in later life." *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 7(61), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnint.2013.00061>
- Strazielle, N., Belin, M.-F., & Gherzi-Egea, J.-F.** (2003). "Choroid plexus controls brain availability of anti-HIV nucleoside analogs via pharmacologically inhibitable organic anion transporters." *AIDS*, 17(10), 1473–1485. <https://doi.org/10.1097/00002030-200307040-00008>
- Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F.** (1999). "Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics." *The Journal of Neuroscience*, 19(15), 6275–6289.
- Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F.** (2013). "Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules." *Molecular Pharmaceutics*, 10(5), 1473–1491. <https://doi.org/10.1021/mp300518e>
- Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F.** (2015). "Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain." *Frontiers in Neuroscience*, 9(21), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00021>

- Strazielle, N., Khuth, S. T., & Gherzi-Egea, J.-F.** (2004). "Detoxification systems, passive and specific transport for drugs at the blood-CSF barrier in normal and pathological situations." *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56(12), 1717–1740. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.07.006>
- Strazielle, N., & Preston, J. E.** (2003). "Transport across the choroid plexuses in vivo and in vitro." *Methods in Molecular Medicine*, 89, 291–304. <https://doi.org/10.1385/1-59259-419-0:291>
- Stridh, L., Ek, C. J., Wang, X., Nilsson, H., & Mallard, C.** (2013). "Regulation of Toll-Like Receptors in the Choroid Plexus in the Immature Brain After Systemic Inflammatory Stimuli." *Translational Stroke Research*, 4(2), 220–227. <https://doi.org/10.1007/s12975-012-0248-8>
- Sun, X., Shih, A. Y., Johannssen, H. C., Erb, H., Li, P., & Murphy, T. H.** (2006). "Two-photon imaging of glutathione levels in intact brain indicates enhanced redox buffering in developing neurons and cells at the cerebrospinal fluid and blood-brain interface." *Journal of Biological Chemistry*, 281(25), 17420–17431. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601567200>
- Sverko, V., Sandra, S., Balog, T., & Tatjana, M.** (2004). "Age and gender differences in antioxidant enzyme activity : potential relationship to liver carcinogenesis in male mice." *Biogerontology*, 5, 235–242.
- Szmydynger-Chodobska, J., Chodobski, A., & Johanson, C. E.** (1994). "Postnatal developmental changes in blood flow to choroid plexuses and cerebral cortex of the rat." *The American Journal of Physiology*, 266(5 Pt 2), R1488-92.
- Tamega, O. J., Tirapelli, L. F., & Petroni, S.** (2000). "Scanning electron microscopy study of the choroid plexus in the monkey (*Cebus apella apella*)." *Arq Neuropsiquiatr*, 58(3B), 820–825. <https://doi.org/10.1590/S0004-282X2000000500005>
- Tanigami, H., Okamoto, T., Yasue, Y., & Shimaoka, M.** (2012). "Astroglial integrins in the development and regulation of neurovascular units." *Pain Research and Treatment*. Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2012/964652>
- Tate, S. S., Ross, L. L., & Meister, A.** (1973). "The  $\gamma$ -glutamyl cycle in the choroid plexus: its possible function in amino acid transport." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(5), 1447–1449. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.5.1447>
- Tayarani, I., Cloëz, I., Clément, M., & Bourre, J.-M.** (1989). "Antioxidant enzymes and related trace elements in aging brain capillaries and choroid plexus." *Journal of Neurochemistry*, 53(3), 817–824. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1989.tb11778.x>
- Thomsen, M. S., Routhe, L. J., & Moos, T.** (2017). "The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. <https://doi.org/10.1177/0271678X17722436>
- Thrane, A. S., Rangroo Thrane, V., & Nedergaard, M.** (2014). "Drowning stars: Reassessing the role of astrocytes in brain edema." *Trends in Neurosciences*, 37(11), 620–628. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.08.010>
- Thurgur, H., & Pinteaux, E.** (2018). "Microglia in the Neurovascular Unit: Blood–Brain Barrier–microglia Interactions After Central Nervous System Disorders." *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2018.06.046>
- Toppo, S., Vanin, S., Bosello, V., & Tosatto, S. C. E.** (2008). "Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily." *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1501–1514. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2057>

- Tosatto, S. C. E., Bosello, V., Fogolari, F., Mauri, P., Roveri, A., Toppo, S., Flohé, L., Ursini, F., & Maiorino, M.** (2008). "The catalytic site of glutathione peroxidases." *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1515–1526. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2055>
- Trembley, M.-E., & Sierra, A.** (2015). "Microglia in Health and Disease." *Cold Spring Harbor perspectives in biology* (Vol. 8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020560>
- Trépanier, G., Furling, D., Puymirat, J., & Mirault, M.-E.** (1996). "Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain." *Neuroscience*, 75(1), 231–243. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(96\)00222-9](https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00222-9)
- Truttmann, A., Zur, L., & Cornelia, H.** (2012). "Prise en charge de l'encéphalopathie hypoxique-ischémique du nouveau-né à terme." *Paediatrica*, 23(1), 25–28.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I. M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P. H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., Von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., Von Heijne, G., Nielsen, J., & Pontén, F.** (2015). "Tissue-based map of the human proteome." *Science*, 347(6220), 1260419. <https://doi.org/10.4324/9781315766188>
- Václavíková, R., Hughes, D. J., & Souček, P.** (2015). "Microsomal epoxide hydrolase 1 (EPHX1): Gene, structure, function, and role in human disease." *Gene*, 571, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.071>
- Vanlandewijck, M., He, L., Mäe, M. A., Andrae, J., Ando, K., Del Gaudio, F., Nahar, K., Lebouvier, T., Laviña, B., Gouveia, L., Sun, Y., Raschperger, E., Räsänen, M., Zarb, Y., Mochizuki, N., Keller, A., Lendahl, U., & Betsholtz, C.** (2018). "A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature." *Nature*, 554(7693), 475–480. <https://doi.org/10.1038/nature25739>
- Vasiljevic, A.** (2017). "Caractérisation des fonctions neuroprotectives des interfaces sang-cerveau au cours du développement normal, dans les tumeurs périventriculaires et dans un modèle d'excitotoxicité néonatale." Université Claude Bernard Lyon 1.
- Vink, H., & Duling, B. R.** (2000). "Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume." *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 278(1), H285-9. <https://doi.org/10.1007/s003390201284>
- Virág, J., Haberler, C., Baksa, G., Piurkó, V., Hegedüs, Z., Reiniger, L., Bálint, K., Chocholous, M., Kiss, A., Lotz, G., Glasz, T., Schaff, Z., Garami, M., & Hegedüs, B.** (2017). "Region specific differences of claudin-5 expression in pediatric intracranial ependymomas: potential prognostic role in supratentorial cases." *Pathology and Oncology Research*, 23(2), 245–252. <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0084-3>
- Virgintino, D., Errede, M., Girolamo, F., Capobianco, C., Robertson, D., Vimercati, A., Serio, G., Di Benedetto, A., Yonekawa, Y., Frei, K., & Roncali, L.** (2008). "Fetal blood-brain barrier P-glycoprotein contributes to brain protection during human development." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 67(1), 50–61. <https://doi.org/10.1097/nen.0b013e31815f65d9>
- 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(1), 51–59. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0665-1>
- Wang, Z., Ma, C., Meng, C. J., Zhu, G. Q., Sun, X. B., Huo, L., Zhang, J., Liu, H. X., He,**

- W. C., Shen, X. M., Shu, Z., & Chen, G.** (2012). "Melatonin activates the Nrf2-ARE pathway when it protects against early brain injury in a subarachnoid hemorrhage model." *Journal of Pineal Research*, 53(2), 129–137. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00978.x>
- Weed, L. H.** (1914). "Studies on cerebro-spinal fluid. No. IV : the dual source of cerebro-spinal fluid." *The Journal of Medical Research*, 31(1), 93–118.
- Weed, L. H.** (1917a). "An anatomical consideration of the cerebro-spinal fluid." *Anatomical Research*, 12, 461–496.
- Weed, L. H.** (1917b). "The development of the cerebrospinal fluid spaces in pig and in man." *Contributions to Embryology : Carnegie Institution of Washington*, 5, 3–117.
- Weller, R. O., Djuanda, E., Yow, H.-Y., & Carare, R. O.** (2009). "Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease." *Acta Neuropathologica*, 117(1), 1–14. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0457-0>
- Werdenberg, D., Joshi, R., Wolfram, S., Merkle, H. P., & Langguth, P.** (2003). "Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters." *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 24(6), 259–273. <https://doi.org/10.1002/bdd.364>
- West, X. Z., Malinin, N. L., Merkulova, A. A., Tischenko, M., Kerr, B. A., Borden, E. C., Podrez, E. A., Salomon, R. G., & Byzova, T. V.** (2010). "Oxidative stress induces angiogenesis by activating TLR2 with novel endogenous ligands." *Nature*, 467(7318), 972–976. <https://doi.org/10.1038/nature09421>
- Whish, S., Dziegielewska, K. M., Møllgård, K., Noor, N. M., Liddel, S. A., Habgood, M. D., Richardson, S. J., & Saunders, N. R.** (2015). "The inner csf-brain barrier: Developmentally controlled access to the brain via intercellular junctions." *Frontiers in Neuroscience*, 9(FEB), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00016>
- Wijnholds, J., De Lange, E. C. M., Scheffer, G. L., Van Den Berg, D. J., Mol, C. A. A. M., Van Der Valk, M., Schinkel, A. H., Scheper, R. J., Breimer, D. D., & Borst, P.** (2000). "Multidrug resistance protein 1 protects the choroid plexus epithelium and contributes to the blood-cerebrospinal fluid barrier." *Journal of Clinical Investigation*, 105(3), 279–285. <https://doi.org/10.1172/JCI8267>
- Wilhelm, I., Nyúl-Tóth, Á., Suciu, M., Hermenean, A., & Krizbai, I. A.** (2016). "Heterogeneity of the blood-brain barrier." *Tissue Barriers*. <https://doi.org/10.1080/21688370.2016.1143544>
- Wilson, C., Muñoz-Palma, E., & González-Billault, C.** (2018). "From birth to death: a role for reactive oxygen species in neuronal development." *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 80, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.09.012>
- Wirth, E. K., Schweizer, U., & Köhrle, J.** (2014). "Transport of thyroid hormone in brain." *Frontiers in Endocrinology*, 5(98), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00098>
- Wise, E., & Saladin, K. S.** (2017). "Human Anatomy" (Fifth edition). Mc-Graw-Hill Education.
- Wislocki, G. B.** (1920). "Contributions to embryology : Carnegie Institution No 51."
- Wolburg, H., & Lippoldt, A.** (2002). "Tight junctions of the blood-brain barrier: Development, composition and regulation." *Vascular Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S1537-1891\(02\)00200-8](https://doi.org/10.1016/S1537-1891(02)00200-8)
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Kraus, J., Rascher-Eggstein, G., Liebner, S., Hamm,**



- S., Duffner, F., Grote, E.-H., 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(2003), 586–592. <https://doi.org/10.1007/s00401-003-0688-z>
- Workman, A. D., Charvet, C. J., Clancy, B., Darlington, R. B., & Finlay, B. L.** (2013). "Modeling Transformations of Neurodevelopmental Sequences across Mammalian Species." *Journal of Neuroscience*, 33(17), 7368–7383. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5746-12.2013>
- Wu, G., Fang, Y.-Z., Yang, S., Lupton, J. R., & Turner, N. D.** (2004). "Glutathione metabolism and its implications for health." *The Journal of Nutrition*, 134(3), 489–492. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.489>
- Wyper, D. J., Pickard, J. D., & Matheson, M.** (1979). "Accuracy of ventricular volume estimation." *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 42(4), 345–350. <https://doi.org/10.1136/jnnp.42.4.345>
- Xiang, J., Alesi, G. N., Zhou, N., & Keep, R. F.** (2012). "Protective effects of isothiocyanates on blood-CSF barrier disruption induced by oxidative stress." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 303(1), R1–7. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00518.2011>
- Yasuda, T., Tomita, T., McLone, D. G., & Donovan, M.** (2002). "Measurement of cerebrospinal fluid output through external ventricular drainage in one hundred infants and children: Correlation with cerebrospinal fluid production." *Pediatric Neurosurgery*, 36(1), 22–28. <https://doi.org/10.1159/000048344>
- Yoo, M.-H., Gu, X., Xu, X.-M., Kim, J.-Y., Carlson, B. A., Patterson, A. D., Cai, H., Gladyshev, V. N., & Hatfield, D. L.** (2010). "Delineating the role of glutathione peroxidase 4 in protecting cells against lipid hydroperoxide damage and in alzheimer's disease." *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(7), 819–827. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2891>
- Zappaterra, M. W., & Lehtinen, M. K.** (2012). "The cerebrospinal fluid: Regulator of neurogenesis, behavior, and beyond." *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(17), 2863–2878. <https://doi.org/10.1007/s00018-012-0957-x>
- Zhang, L., Maiorino, M., Roveri, A., & Ursini, F.** (1989). "Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1006(1), 140–143. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(89\)90336-6](https://doi.org/10.1016/0005-2760(89)90336-6)
- Zhang, M., An, C., Gao, Y., Leak, R. K., Chen, J., & Zhang, F.** (2013). "Emerging roles of Nrf2 and phase II antioxidant enzymes in neuroprotection." *Progress in Neurobiology*, 100(1), 30–47. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.09.003>
- Zhao, X., Sun, G., Zhang, J., Ting, S. M., Gonzales, N., & Aronowski, J.** (2015). "Dimethyl Fumarate Protects Brain from Damage Produced by Intracerebral Hemorrhage by Mechanism Involving Nrf2." *Stroke*, 46(7), 1923–1928. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.115.009398>

## ANNEXES

---



## 1. Articles relatifs à ce travail de thèse

**Saudrais, E., Strazielle, N., & Gherzi-Egea, J.-F.** (2018). “Choroid plexus glutathione peroxidases are instrumental in protecting the brain fluid environment from hydroperoxides during postnatal development.” *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 315, 445–456.

**Kratzer, I., Strazielle, N., Saudrais, E., Mönkkönen, K., Malleval, C., Blondel, S., & Gherzi-Egea, J.-F.** (2018). “Glutathione conjugation at the blood–CSF barrier efficiently prevents exposure of the developing brain fluid environment to blood-borne reactive electrophilic substances.” *The Journal of Neuroscience*, 38(14), 3466–3479.



## RESEARCH ARTICLE | *Cell and Molecular Physiology of the Blood-Brain Barrier and Choroid Plexus*

# Choroid plexus glutathione peroxidases are instrumental in protecting the brain fluid environment from hydroperoxides during postnatal development

Elodie Saudrais,<sup>1,2</sup> Nathalie Strazielle,<sup>1,2,3</sup> and Jean-François Gherzi-Egea<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>FLUID Team, Lyon Neurosciences Research Center, INSERM U1028 CRNS UMR 5292, Université Claude Bernard Lyon-1, Lyon, France; <sup>2</sup>Blood-Brain Interfaces Exploratory Platform BIP, Lyon Neurosciences Research Center, Lyon, France; and <sup>3</sup>Brain-i, Lyon, France

Submitted 19 March 2018; accepted in final form 24 June 2018

**Saudrais E, Strazielle N, Gherzi-Egea JF.** Choroid plexus glutathione peroxidases are instrumental in protecting the brain fluid environment from hydroperoxides during postnatal development. *Am J Physiol Cell Physiol* 315: C445–C456, 2018. First published June 27, 2018; doi:10.1152/ajpcell.00094.2018.—Hydrogen peroxide, released at low physiological concentration, is involved in different cell signaling pathways during brain development. When released at supraphysiological concentrations in brain fluids following an inflammatory, hypoxic, or toxic stress, it can initiate lipid peroxidation, protein, and nucleic acid damage and contribute to long-term neurological impairment associated with perinatal diseases. We found high glutathione peroxidase and glutathione reductase enzymatic activities in both lateral and fourth ventricle choroid plexus tissue isolated from developing rats, in comparison to the cerebral cortex and liver. Consistent with these, a high protein expression of glutathione peroxidases 1 and 4 was observed in choroid plexus epithelial cells, which form the blood-cerebrospinal fluid barrier. Live choroid plexuses isolated from newborn rats were highly efficient in detoxifying H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from mock cerebrospinal fluid, illustrating the capacity of the choroid plexuses to control H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in the ventricular system of the brain. We used a differentiated cellular model of the blood-cerebrospinal fluid barrier coupled to kinetic and inhibition analyses to show that glutathione peroxidases are more potent than catalase to detoxify extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at concentrations up to 250  $\mu$ M. The choroidal cells also formed an enzymatic barrier preventing blood-borne hydroperoxides to reach the cerebrospinal fluid. These data point out the choroid plexuses as key structures in the control of hydroperoxide levels in the cerebral fluid environment during development, at a time when the protective glial cell network is still immature. Glutathione peroxidases are the main effectors of this choroidal hydroperoxide inactivation.

blood-CSF barrier; cerebrospinal fluid; hydrogen peroxide; neuroprotection; perinatal

## INTRODUCTION

In physiological conditions, the brain produces reactive oxygen species (ROS) due to its particularly large cerebral oxygen consumption. Mitochondrial oxidative metabolism and NADPH-oxidase enzymatic activities generate superoxide an-

ion radicals O<sub>2</sub><sup>•−</sup> which are quickly disproportionated to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), either spontaneously or enzymatically by superoxide dismutases (54, 63). During brain development, certain ROS act as signaling molecules in neurogenesis, neuronal polarization, and maturation. In particular, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, released at low physiological concentration, is involved in different cell signaling pathways in an autocrine and paracrine manner (7, 20, 63). Hence, its extracellular level needs to be tightly controlled.

When produced in excess, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may initiate lipid peroxidation, protein, and nucleic acid damage. The iron-mediated formation of the highly reactive hydroxyl radical  $\cdot$ OH, resulting from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> decomposition through the Fenton reaction, is especially damaging (9). The hydroxyl radical  $\cdot$ OH reacts with polyunsaturated fatty acids which are enriched in brain during development (10, 44), thereby initiating lipid peroxidation. The propagation of lipid peroxidation through membranes alters their fluidity and permeability and generates toxic lipid hydroperoxide and aldehyde by-products. The latter can easily diffuse through membranes and modify nuclear proteins (3). The perinatal period is a high-risk period for neurological impairment through exposure to inflammation, preeclampsia, perinatal hypoxia, or deleterious exogenous environmental toxicants and drugs (1, 4, 26, 35, 61). All of these factors are prone to increase oxidative stress including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release and subsequent lipid peroxidation in the brain during this critical period of maturation.

Many antioxidant systems control ROS levels. These include enzymes such as superoxide dismutases, catalase, peroxidoreductins, glutathione peroxidases (GPxs) and its companion enzyme glutathione reductase (GR), as well as reducing molecules such as glutathione (GSH), bilirubin, and vitamins C and E (49). In adult brain, glial cells, in particular astrocytes and oligodendrocytes, are the main cells contributing to the brain antioxidant defense capacity (5, 15, 21, 43). As an example, catalase activity in astrocytes could protect neurons from extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (14). The control of ROS levels may not be as efficient during peri/postnatal brain development. The astrocytic network is not fully formed, as astrocyte differentiation and maturation is largely postnatal (13, 64). Oligodendrocytes are also immature and have low GPx activities as compared with the mature cells (5).

A pioneer work in the field of blood-brain interfaces described high levels of antioxidant enzymatic activities, espe-

Address for reprint requests and other correspondence: J.-F. Gherzi-Egea, FLUID Team, CRNL, INSERM U1028 CRNS UMR 5292, Faculty of medicine RTH Laennec, Rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France (e-mail: jean-francois.ghersi-egea@inserm.fr).

cially GPx activity, in the lateral ventricle choroid plexuses (CPs) of adult rats (60). Glutathione-dependent peroxidase activity is mediated by multiple GPx isoenzymes that all accept  $\text{H}_2\text{O}_2$  as a substrate, while some of them also inactivate lipid hydroperoxides including signaling molecules (8). The CPs located in the lateral, 3rd, and 4th ventricles of the brain in all mammals form the barrier between the blood and the ventricular cerebrospinal fluid (CSF) that they secrete. They are the most vascularized brain structures and display the highest blood flow, especially during peri/postnatal development. They grow and differentiate early in the course of fetal development (18). They constitute an important site of blood-brain exchanges during this period (24) and already display various mature neuroprotective functions toward blood-borne toxicants at birth in rat (40).

Hydrogen peroxide is a reactive, yet relatively long-lasting, molecule. It circulates through extracellular fluid and CSF where its level increases in severe postnatal pathological conditions (32, 33, 36, 41). When released at supraphysiological concentration,  $\text{H}_2\text{O}_2$  can induce oxidative damage such as lipid peroxidation at a distance from the source. Such noxious action can be exacerbated through the Fenton reaction, a mechanism that occurs in CSF (55). This prompted us to test the hypothesis that the CPs actively inactivate hydroperoxides in their environment during development and that choroidal GPxs are the main effectors of this inactivation.

## MATERIALS AND METHODS

**Primary antibodies.** Anti-GPx1 rabbit polyclonal antibody (Ab) (ab22604, Abcam, Cambridge, UK), anti-GPx4 rabbit polyclonal Ab (14432-1-AP, Proteintech, Manchester, UK), anti-GR rabbit polyclonal Ab (GTX114199, GeneTex, Irvine, CA), anti-RECA-1 mouse monoclonal Ab (clone HIS52, MCA970, Bio-Rad, Hercules, CA), anti- $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  mouse monoclonal Ab (NB300-146, Novus Biologicals, Littleton, CO), and anti-actin mouse monoclonal Ab (A1978, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were used.

**Tissue collection.** Animal care and procedures were approved and conducted according to the guidelines approved by the French ethical committee (decree 87-848) and by the European community directive (86-609-EEC). Specific pathogen-free Sprague-Dawley rats (RjHan:SD), either 5-wk-old (W5) or 12-wk-old (W12) males (200 and 500 g, respectively) and females (180 and 300 g, respectively), as well as females with litters, were obtained from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). All animals were kept in a conventional facility, in standard cages enriched with paper, with free access to pellet food and tap water, under a controlled environment (12-h daylight cycle, 22°C). Animals were euthanized by decapitation under isoflurane anesthesia, and brain and liver were rapidly excised and placed at 4°C in Krebs-Ringer buffer (135 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 10 mM HEPES, 5 mM glucose, pH 7.4). The two lateral ventricle CPs and the 4th ventricle CP were microdissected under a stereomicroscope and kept separately. Brain cortices were sampled and cleaned of apparent meninges. Choroid plexuses were either used extemporaneously for metabolism studies or were pooled (between 2 and 12 CPs, depending on developmental stage), rapidly frozen, and kept at  $-80^\circ\text{C}$  for further enzymatic measurement or Western blot analysis. For immunohistochemistry, brains sampled from 2-day-old (P2) and 9-day-old (P9) animals were snap-frozen in isopentane at  $-40^\circ\text{C}$  and kept at  $-80^\circ\text{C}$ .

**Cell isolation and primary cultures.** Primary cultures of CP epithelial cells were prepared as previously described (56, 57). The CP epithelial cells were cultured on laminin-coated microporous Transwell polycarbonate filter inserts (0.33  $\text{cm}^2$  surface, 0.4  $\mu\text{m}$  pore size; Corning Life Sciences, Amsterdam, Netherlands) in culture medium

consisting of Ham's F-12 and Dulbecco's modified Eagle's medium (1:1) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  gentamicin, and several growth factors as previously reported (57). The culture medium was renewed every other day, and the cell monolayer was used for metabolic and permeability studies 7 to 8 days after culture was initiated.

**Enzymatic activity measurements.** Choroidal tissue, cerebral cortices, and liver were sampled from P2, 7-day-old (P7, for GPx), P9 (for GR), 17-day-old (P17), and W5 (male and female) rats. Tissues were homogenized at 4°C in a 50 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA buffer, pH 7.4, using a Tenbroeck homogenizer. Glutathione peroxidase and GR enzymatic activities were measured by kinetic spectrophotometry as previously described (60). Briefly, GPx activity was measured at 37°C in a Cary 100 spectrophotometer (Varian, Palo Alto, CA) in 500  $\mu\text{l}$  homogenization buffer, containing 1 IU GR (10105678001, Sigma-Aldrich), 0.5 mM GSH (G6529, Sigma-Aldrich), 0.12 mM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH, N6505, Sigma-Aldrich), and 0.2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  (95321, Sigma-Aldrich) as substrate. The complete assay mixture without the protein homogenate was used to assess the low nonenzymatic degradation of NADPH due to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The kinetic parameters, Michaelis constant  $K_m$ , and maximum velocity  $V_{\text{max}}$  were determined in homogenates prepared from either a mix of lateral ventricle and 4th ventricle CPs from P9 animals or from cultured CP epithelial cells, by varying  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration between 1 and 200  $\mu\text{M}$ .

Activity measurements for GR were conducted in 500  $\mu\text{l}$  homogenization buffer, containing 0.2 mM oxidized glutathione (GSSG, G4376, Sigma-Aldrich) and 0.12 mM NADPH as substrate. For both assays, the rate of NADPH oxidation was recorded over a 10-min period at 340 nm. The total protein content of the samples was determined by the method of Peterson with bovine serum albumin as the standard (47).

**Western blot analysis.** Samples were homogenized using a Tenbroeck homogenizer in homogenization buffer (250 mM sucrose, 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol, pH 7.4) supplemented with protease inhibitors (Complete, Roche, Penzberg, Germany). Samples were denatured in Laemmli buffer (final concentration: 62.5 mM Tris base, 1% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue (all wt/vol), 0.1 mM dithiothreitol, pH 6.8) and heated for 10 min at 95°C. Proteins were separated on a 10% Criterion XT Bis-Tris gel (Bio-Rad) run in MOPS buffer (no. 1610788, Bio-Rad) at 70 V for 10 min, followed by 120 V for 2 h. The gel was blotted to 0.2  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membrane (no. 10600001, GE Healthcare Life Sciences, Coventry, UK) in transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% methanol) for 40 min. After assessment of the transfer quality by Ponceau red staining, the membrane was incubated in 5% skimmed milk in Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris base, 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 0.1% Tween 20 (TBST) at room temperature (RT) for 1 h. Primary Abs were diluted in 2% skimmed milk in TBST, at 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for anti-GPx1 and 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for anti-GR. The mouse anti-actin monoclonal Ab was used at a final dilution of 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Membranes were incubated at 4°C overnight, then washed three times for 10 min in TBST at RT. Horseradish peroxidase-conjugated secondary Abs from Jackson ImmunoResearch (Baltimore, MD) were donkey anti-rabbit IgG (711-036-152) used at a final concentration of 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for GPx1 detection and 0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for GR detection, and donkey anti-mouse IgG (715-036-151) used at a final concentration of 0.05  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for actin detection. After two washings in TBST and two others in TBS, membranes were exposed to a chemiluminescent horseradish peroxidase substrate (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Waltham, MA) for 5 min, and exposed to X-ray films (Amersham Hyperfilm ECL, 28906837, GE Healthcare, or CL-Xposure Film, 34089, Thermo Scientific).

As an index of Ab quality, only one band specific for GPx1 (26.3 kDa) was observed in CP and liver homogenates from postnatal rat, besides an additional signal ( $\approx 200$  kDa) present in all samples. One



band specific for GR (52.2 kDa) was observed in CPs and cerebral cortex (weak signal), and two bands were observed in liver homogenate (52.2 and 55 kDa), besides an additional signal (30 kDa) present in all samples.

**Immunohistochemical analysis.** Section (12  $\mu\text{m}$  thick) were prepared from rat brains using a Cryostar NX50 cryostat (Thermo Scientific), mounted on glass slides, air-dried at RT, and kept at  $-20^\circ\text{C}$ . Sections were fixed in 4% paraformaldehyde at RT for 10 min. For GPx1 immunohistochemical analysis, epitope retrieval was performed using a microwave treatment ( $3 \times 5$  min at 850 W) in 0.01 M citrate buffer, pH 6. After 1 h of saturation at RT in a blocking solution containing 1% bovine serum albumin, and 10% normal goat serum (S-1000, Vector, Burlingame, CA) in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) containing 0.3% Triton X-100 (PBS-T), sections were incubated at  $4^\circ\text{C}$  overnight with anti-GPx1, anti-GPx4, anti-RECA-1, or anti- $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  primary Abs diluted in blocking solution. Final concentrations were 2, 4.1, and 2.5  $\mu\text{g/ml}$  for anti-GPx1, anti-GPx4, anti-RECA-1 Abs, respectively. Anti- $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  primary Ab was diluted 2,000 times. Negative controls were performed by omitting the primary Ab. After five washes for 7 min at RT in PBST, sections were incubated for 1 h at RT with secondary goat-anti-rabbit Ab (Alexa Fluor 488, A11006, Invitrogen, Carlsbad, CA) or secondary goat-anti-mouse Ab (Alexa Fluor 555, A21422, Invitrogen) at a final concentration of 0.2  $\mu\text{g/ml}$ . After three washes for 5 min in PBS-T, and two washes for 5 min in PBS at RT, diamidine-2-phenylindole-dihydrochloride (DAPI, 236276, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) was used as fluorescent nuclear stain at 0.1  $\mu\text{g/ml}$  in PBS. Sections were washed again five times in PBS. After the slides were mounted with Fluoprep (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France), immunofluorescence was viewed and analyzed using an Imager Z1 fluorescence microscope equipped with a Digital Camera (Zeiss, Jena, Germany). Images were acquired using AxioVs40 software (version 4.8, Zeiss).

**Hydrogen peroxide concentration measurement.** Hydrogen peroxide was quantified in a microtiter plate as previously described (17). Five to 100  $\mu\text{l}$  samples of incubation buffer were collected and immediately added to 150  $\mu\text{l}$  of reaction mixture containing 0.5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ , 0.2 mM xylene orange, and 200 mM sorbitol in 50 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . All volumes were adjusted to 250  $\mu\text{l}$  using Ringer HEPES buffer (RH, 150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 2.8 mM glucose, 5 mM HEPES, pH 7.4). After 45 min of incubation at RT under gentle agitation, the absorption at 540 nm was measured using a plate reader Infinite 200 (Tecan, Männedorf, Switzerland). Standard  $\text{H}_2\text{O}_2$  solutions prepared extemporaneously in RH were used for calibration.

**Hydrogen peroxide inactivation by isolated live choroid plexuses.** Choroid plexuses freshly dissected from either the 4th or lateral cerebral ventricles of P2 rats were warmed up in RH at  $37^\circ\text{C}$  for 10 min. They were transferred to 150  $\mu\text{l}$  of 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in RH. The incubation medium was sampled every 10 min for  $\text{H}_2\text{O}_2$  assay. In the absence of CPs,  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration did not change in the medium during the time of the experiment. At the end of the experiment, CPs were collected, digested in 1 M sodium hydroxide, and their protein content was measured.

The remaining  $\text{H}_2\text{O}_2$  quantity data were plotted against time and fitted to an exponential equation using CurveExpert 1.4 software. The half-life of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in this ex vivo experimental setting ( $t_{1/2 \text{ ex vivo}}$ ) was determined for each type of CP, and the initial clearance of elimination  $\text{Cl}_{\text{el}}$  was calculated as follows:

$$\text{Cl}_{\text{el}} = V_{\text{d ex vivo}} \times \frac{\text{Ln}2}{t_{1/2 \text{ ex vivo}}} \quad (1)$$

where the volume of distribution  $V_{\text{d ex vivo}}$  is the incubation volume.

For each type of CP, the in vivo half-life of  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $t_{1/2 \text{ in vivo}}$ ) was extrapolated from the initial clearance of elimination  $\text{Cl}_{\text{el}}$  as follows:

$$t_{1/2 \text{ in vivo}} = V_{\text{d in vivo}} \times \frac{\text{Ln}2}{\text{Cl}_{\text{el}}} \quad (2)$$

where the volume of distribution  $V_{\text{d in vivo}}$  is the volume of either the 4th ventricle or both lateral ventricles of P2 rats as previously reported (22).

**In vitro blood-cerebrospinal fluid barrier permeability and metabolic studies.** Cells were rinsed twice with RH at  $37^\circ\text{C}$  and were either basolaterally exposed to  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations varying between 20 and 500  $\mu\text{M}$  in 400  $\mu\text{l}$  of RH or apically exposed to 60 and 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in 150  $\mu\text{l}$  of RH. During 15 min (for 20  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ) or 40 min (for all other concentrations), the medium was sampled regularly (5 to 100  $\mu\text{l}$ ) from both chambers and assayed for  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Hydrogen peroxide was stable in these experimental conditions in the absence of cells. The total protein content of each cell monolayer was determined.

For each concentration used, the remaining  $\text{H}_2\text{O}_2$  quantity data were plotted against time and the initial part of those plots was fitted according to the following equation:

$$Q_{\text{t H}_2\text{O}_2} = Q_{0 \text{ H}_2\text{O}_2} \times e^{-k_{\text{el}} \times t} \quad (3)$$

where  $Q_{\text{t H}_2\text{O}_2}$  is the total amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  remaining in both the apical and basolateral compartments at time  $t$ ,  $Q_{0 \text{ H}_2\text{O}_2}$  is the initial quantity of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the basolateral compartment, and  $k_{\text{el}}$  is the initial elimination rate constant.

These  $k_{\text{el}}$  values were used to calculate the  $\text{H}_2\text{O}_2$  elimination half-life  $t_{1/2}$  and the initial  $\text{H}_2\text{O}_2$  elimination rate  $\nu$  for each concentration, according to:

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln}2}{k_{\text{el}}} \quad (4)$$

and

$$\nu = \frac{Q_{0 \text{ H}_2\text{O}_2} \times k_{\text{el}}}{Q_{\text{prot}}} \quad (5)$$

where  $Q_{\text{prot}}$  is the protein content.

In the range of  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations used, the catalase activity can be assimilated to a first-order reaction as the Michaelis constant of this enzyme  $K_{\text{m catalase}}$  is unusually high, above 1 M (37). The respective involvement of catalase and GPxs in  $\text{H}_2\text{O}_2$  metabolism was thus modeled by a nonlinear regression analysis of  $\nu$  over  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration (CurveExpert 1.4) using the following equations:

$$\nu = \nu_{\text{catalase}} + \nu_{\text{GPx}} \quad (6)$$

where

$$\nu_{\text{catalase}} = \frac{V_{\text{max catalase}} \times Q_{0 \text{ H}_2\text{O}_2}}{K_{\text{m catalase}}} \quad (7)$$

and

$$\nu_{\text{GPx}} = \frac{V_{\text{max GPx}} \times Q_{0 \text{ H}_2\text{O}_2}}{K_{\text{m GPx}} + Q_{0 \text{ H}_2\text{O}_2}} \quad (8)$$

from where the Michaelis constant  $K_{\text{m}}$  and the maximum velocity  $V_{\text{max}}$  for the GPx-dependent activity can be obtained.

In some experiments, cells were preincubated with enzyme inhibitors, 50  $\mu\text{M}$  1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) added in the basolateral compartment for 20 min, 10 mM 3-aminotriazole (3-AT) added in both compartments for 150 min (16), or a combination of 3-AT and CDNB added sequentially. CDNB acts by fully depleting cells from GSH (25), thus abolishing GPx activity. After preincubation, cells were basolaterally exposed to 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in the presence of the inhibitors. Incubation media were sampled after 20 min and assayed for  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Data are expressed as permeability coefficient  $P_t$  as described in detail elsewhere (38). Sucrose permeability was measured during the course of the inhibitor study in a separate experiment.

Briefly, inserts preincubated with inhibitors were placed in wells of a 12-well plate containing 400  $\mu$ l of RH with [ $^{14}$ C]sucrose (MC 266, Hartmann Analytic, Glatbrugg, Switzerland), 50  $\mu$ M  $H_2O_2$  and inhibitors, and the apical medium was replaced by 150  $\mu$ l of fresh buffer containing the inhibitor in the case of 3-AT-treated cells. At regular intervals after addition of the insert, an aliquot of 100  $\mu$ l was removed from the apical chamber and replaced with an equal volume of fresh identical buffer. Radioactivity was determined by liquid scintillation counting using a  $\beta$ -counter (Canberra Tricarb 1600TR, Packard, Groningen, Netherlands). Clearance curves were generated as previously described in detail (38, 58).

**Statistical analysis.** Results are expressed as means  $\pm$  SD for enzymatic activity data and in vitro inhibition studies, and as means  $\pm$  SE for all other data. Data were subjected to one-way (in vitro inhibition studies) or two-way ANOVA analysis with Dunnett's post hoc test for comparisons to a single control or with a Tukey-Kramer's post hoc test for multiple comparisons between groups. A  $P$  value  $<0.05$  was considered statistically significant. All analyses were performed with Prism software (version 7.04, Graph Pad, San Diego, CA).

## RESULTS

*Choroid plexuses display high enzymatic activities and protein levels for glutathione peroxidases and glutathione reductase during postnatal development.* The GPx and GR-specific activities were measured at different developmental stages in

brain tissue as well as in the liver, the reference organ for metabolism (Fig. 1). It has in particular a high potential for ROS production (45), and displays high levels of selenium-dependent GPx activity (27, 66). Glutathione peroxidase-specific activity in CPs was already high at P2 and P7, being twice the activity measured in the liver at similar ages (Fig. 1A). Choroidal GPx activity was also higher by one order of magnitude in comparison to the activities measured in the cerebral tissue at all developmental stages investigated (Fig. 1A). These GPx activities increased 1.8-fold and 2.2-fold from P2 to W5 (males and females combined) in lateral ventricle CPs and 4th ventricle CP, respectively, and remained steady or decreased from W5 to W12. The CP-to-cerebral cortex activity ratio was, however, maximal at P17 and decreased thereafter (Table 1). Male and female animals were analyzed separately after weaning. In liver, GPx-specific activity was 2.1 and 2.5 times higher in females than in males at W5 and W12, respectively, while no sex difference was observed in brain tissues (Fig. 1A). Glutathione reductase, which allows to regenerate reduced GSH following hydroperoxide reduction by GPxs, was also consistently more active in both CPs than in the cerebral cortex at all developmental stages investigated (Fig. 1B). Yet, CP-to-cerebral cortex activity ratios were lower than

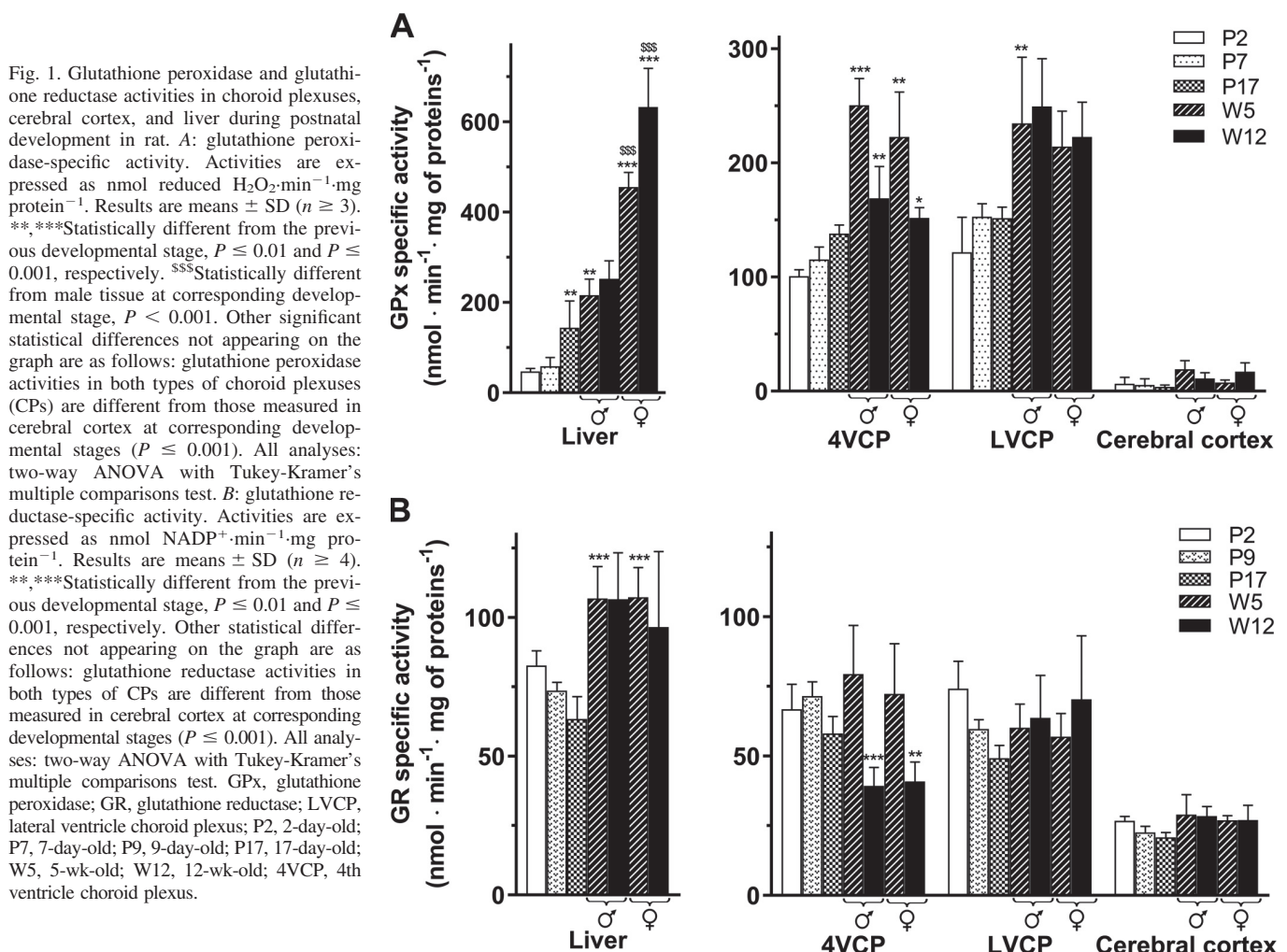


Table 1. Glutathione peroxidase-specific activity in choroid plexuses vs. cerebral cortex at early stages of postnatal development and in adult

GPx Activity Ratio	P2	P7	P17	Male		Female	
				W5	W12	W5	W12
4VCP/Cx	15.5 ± 0.9*	21.8 ± 2.1*	37.4 ± 2.1	13.1 ± 1.2*	15.3 ± 2.5*	29.4 ± 5.2*	8.9 ± 0.5*
LVCP/Cx	18.8 ± 4.7*	28.8 ± 2.2*	41.1 ± 2.7	12.3 ± 3.0*	22.5 ± 3.8*	28.3 ± 4.1*	13.1 ± 1.8*

Values are means ± SD ( $n \geq 3$ ). Statistical differences are shown relative to P17. GPx, glutathione peroxidase; P2, 2-day-old; P7, 7-day-old; P17, 17-day-old; W5, 5-wk-old; W12, 12-wk-old; 4VCP, 4th ventricle choroid plexus; LVCP, lateral ventricle choroid plexus; Cx, cerebral cortex. \* $P \leq 0.001$ , one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test.

those calculated for GPx activities. The hepatic GR-specific activity was significantly higher in W5 and W12 than in younger animals. Conversely, choroidal GR activities were already high at birth.

The high GPx and GR-specific activities measured in CPs in comparison to cortical tissue were correlated to higher GPx1 and GR protein levels measured by Western blotting at P2 (data not shown) and P9 (Fig. 2A). Also in agreement with

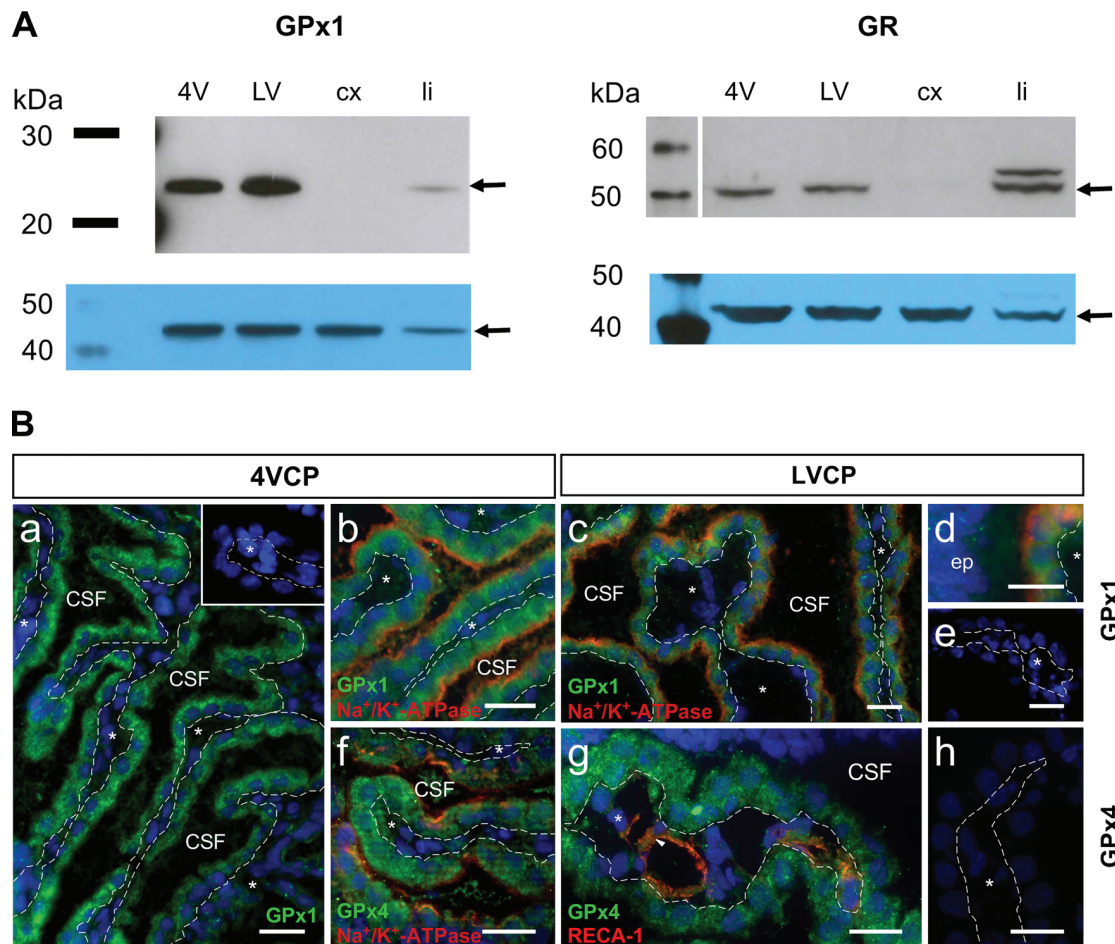


Fig. 2. Expression and localization of glutathione peroxidase 1 (GPx1), glutathione peroxidase 4 (GPx4), and glutathione reductase (GR) in postnatal rat choroid plexuses. A: Western blot analysis of GPx1 and GR expression in 9-day-old rat choroid plexuses (CPs) from the 4th (4V) and the lateral ventricles (LV), cerebral cortex (cx) and liver (li) (top). Representative signals obtained from whole tissue homogenates are shown (15 μg of protein per lane for GPx1, 35 μg for GR). For each Western blot, actin used as a loading indicator is shown in bottom panels. Protein expression of both enzymes is higher in CPs than in cerebral cortex. GPx1 expression is also higher in CPs than in liver. Actin level in liver is lower than in other organs (53), explaining the difference in signal intensity between liver and CPs for equal amounts of protein loaded. B: immunohistochemical detection of GPx1 and GPx4 in CPs of 2-day-old rats. a–e: labeling of GPx1 (green) and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (red, b, c, d) in both 4th ventricle (a, b) and lateral ventricle (c, d, e) CPs. Staining of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase allows to delineate the apical membrane of CP epithelial cells and to associate GPx1 activity with the intracellular compartment of these cells. The GPx1 signal is not detected in CP conjunctive stroma (stars). It was also undetected or was low in the brain parenchyma and in the ependyma, in comparison to CP epithelial cells (d). f–h: colabeling of GPx4 (green) and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase (f, red) or RECA-1 (red, a marker of choroidal vessels, arrowhead in g) shows that the GPx4 signal is restricted to the intracellular compartment of CP epithelial cells in both 4th (f) and lateral (g) ventricle CPs. The GPx4 signal is low or undetectable in brain parenchyma (data not shown) and in CP conjunctive stroma (f, g, stars). DAPI was used for nucleus staining (blue). Inset in a, e, h: negative controls obtained by omitting the primary Abs. Scale bars, 20 μm. CSF, cerebrospinal fluid; ep, ependyma; LVCP, lateral ventricle choroid plexus; 4VCP, 4th ventricle choroid plexus.



enzymatic activity data, GPx1 protein expression was higher at P9 in CPs than in liver, and GR protein expression was similar between the two types of tissue (Fig. 2A). The early postnatal expression of both GPx1 and GPx4 in the CPs was also observed by immunohistochemistry (Fig. 2B). All choroidal loops were labeled. Colabeling with Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase used as a marker of the apical membrane of the choroidal epithelium, and RECA-1 used as a marker of choroidal blood vessels, showed that the localization of both GPx1 and GPx4 in CPs is restricted to the epithelial cells forming the blood-CSF barrier, where they distribute throughout the cytoplasm (Fig. 2B).

*Choroid plexuses efficiently and rapidly inactivate hydrogen peroxide from the cerebrospinal fluid environment.* To evaluate whether the high GPx activities measured in CP homogenates confer to this tissue the capacity to efficiently inactivate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> present in CSF, live and intact CPs were isolated from P2 animals, kept in RH used as mock CSF, and exposed to 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In the absence of CPs, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration did not change in the medium during the time of the experiment (Fig. 3). The 4th ventricle CP and the lateral ventricle CPs were analyzed separately. In this experimental setup, CPs are exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at their apical CSF-facing membrane. The amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remaining in the mock CSF was plotted against time (Fig. 3). Although the CPs were incubated in a large volume of mock CSF as compared with the actual ventricular volumes of P2 rat pups (Table 2,  $V_{d \text{ in vivo}}$ ), both types of CPs had the ability to rapidly catabolize H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Differences between the amount-over-time curves generated for the two types of CPs can be explained by the difference in tissue size: two CPs of the lateral ventricle and one CP of the 4th ventricle contain 100 and 69  $\mu$ g protein, respectively (22). The ex vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> half-life  $t_{1/2 \text{ ex vivo}}$  calculated from the amount-over-time curves presented in Fig. 3 are reported in Table 2, together with the initial clearance of elimination ( $Cl_{el}$ ).

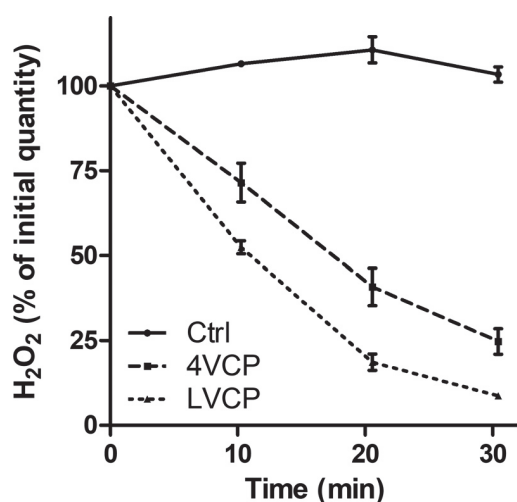


Fig. 3. Isolated choroid plexuses (CPs) detoxify extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Two CPs of the lateral ventricles or one CP of the 4th ventricle was exposed to Ringer HEPES buffer containing 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. For each batch of CPs, protein content was measured to normalize the initial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantity for the average protein content of CPs isolated from 2-day-old Sprague-Dawley animals. These protein contents are  $100 \pm 9 \mu$ g for lateral ventricle CP and  $69 \pm 9 \mu$ g for 4th ventricle CP (22). Data show amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> remaining in the incubation medium over time, expressed as a percentage of the initial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> amount in the incubation medium (means  $\pm$  SE;  $n = 5$ ). Ctrl, control incubation without CPs; LVCP, lateral ventricle choroid plexus; 4VCP, 4th ventricle choroid plexus.

Table 2. Ex vivo experimental and in vivo modeled choroid plexus-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimination parameters

	Ex Vivo (Assay)			In Vivo (Modeling)	
	$V_d \text{ ex vivo}, \mu\text{l}$	$t_{1/2 \text{ ex vivo}}, \text{min}$	$Cl_{el}, \mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$	$V_d \text{ in vivo}, \mu\text{l}^*$	$t_{1/2 \text{ in vivo}}, \text{min}$
4VCP	150	$17.2 \pm 2.4$	$113.0 \pm 13.3$	6.56	$37.6 \pm 5.5$
LVCP	150	$9.6 \pm 0.3$	$123.7 \pm 6.1$	2.95	$10.0 \pm 0.5$

Values are means  $\pm$  SE ( $n \geq 4$ ). Data were generated with a 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> initial concentration. LVCP, lateral ventricle choroid plexus; 4VCP, 4th ventricle choroid plexus. See MATERIALS AND METHODS for definition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimination parameters and details on calculations. \* $V_d \text{ in vivo}$  is ventricular volume measured in 2-day-old rat pups (22).

Assuming the latter value to be identical for isolated live CPs (ex vivo condition) and for in situ CPs (in vivo condition), we calculated the in vivo half-life  $t_{1/2 \text{ in vivo}}$  of 50  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in CSF, based on actual ventricular volumes  $V_d \text{ in vivo}$  measured in P2 animals (Table 2). The  $t_{1/2 \text{ in vivo}}$  values are in the order of a few seconds for lateral ventricle CPs and half a minute for the 4th ventricle CP, demonstrating the high efficiency of these tissues to inactivate CSF-borne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Glutathione peroxidases are the main H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in choroid plexuses.* Hydrogen peroxide is detoxified by two enzymatic systems, GPxs and catalase. To investigate the mechanism of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inactivation in the CP epithelium and establish the relative participation of GPxs in that process, we used an in vitro cellular model of the blood-CSF barrier (Fig. 4A). The monolayers of CP epithelial cells grown on a permeable membrane recapitulate the tightness and polarity of the choroidal epithelium in vivo. They have been validated for barrier and transport functions and used to study metabolic functions involving GSH (25, 40, 56, 57). This model offers several advantages over isolated CP experiments, allowing 1) to expose either the CSF or the blood side of the barrier to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2) to apply long-term exposures to inhibitors, 3) to measure the blood-CSF barrier permeability to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and 4) to limit the number of animals to be used for mechanistic studies.

We first established whether the CP epithelial cells of this model maintain the high GPx-specific activity observed in CPs of postnatal rats. Cultured CP epithelial cells presented a GPx-specific activity of  $200.8 \pm 57.0 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD,  $n = 5$  measurements from 2 batches of cells); this activity is similar to that of CP postnatal rats (Fig. 1). When cells were exposed to 60  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at either their basolateral or their apical membrane, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> disappeared equally rapidly from the medium. The amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reduced over a 14-min period were  $213.0 \pm 63.69$  and  $164.4 \pm 20.8 \text{ nmol/mg protein}$  for the basolateral and apical application, respectively (means  $\pm$  SD,  $n = 4$ , not statistically different, two-tailed  $t$ -test for unequal variance). Similar observations were made when using higher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration (100  $\mu$ M, data not shown). To assess whether the detoxification could result in part from enzymatic or nonenzymatic antioxidant components secreted by the cells, other cell monolayers were rinsed and incubated in fresh RH. The conditioned media were then sampled after 7.5 and 25 min of cell contact and immediately incubated with 44  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for identical periods. Inactivation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was not observed (Table 3), indicating that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> needs to diffuse into the cells to be detoxified.

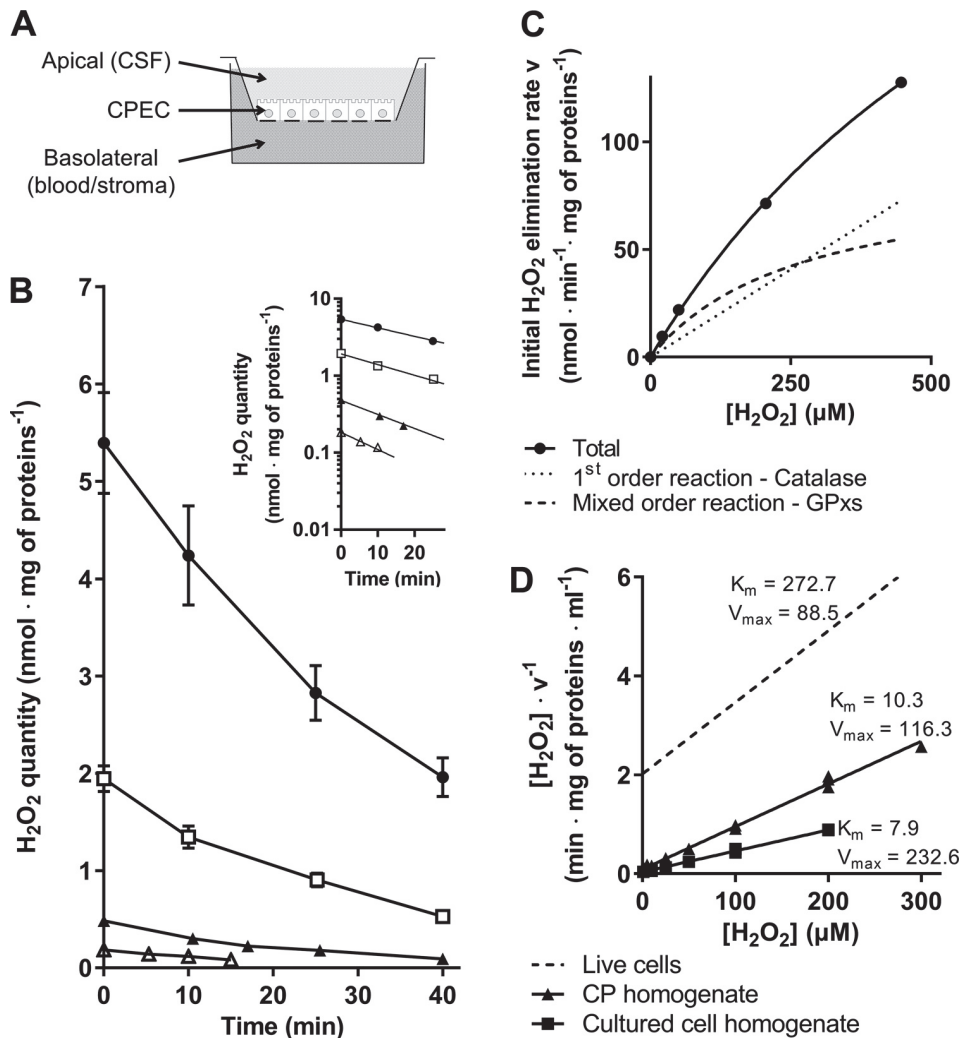


Fig. 4. Kinetics of  $\text{H}_2\text{O}_2$  detoxification by rat choroid plexus epithelial cells. **A**: schematic representation of the in vitro blood-cerebrospinal fluid (CSF) barrier. Choroid plexus (CP) epithelial cells are cultured on a porous filter and reproduce a choroidal cell layer separating a CSF-mimicking apical compartment from a blood- and stroma-mimicking basolateral compartment. **B**: amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  remaining in the incubation medium over time as a function of the initial  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration. Choroid plexus epithelial cells were exposed to 20 ( $\Delta$ ), 50 ( $\blacktriangle$ ), 200 ( $\square$ ), or 450 ( $\bullet$ )  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  during 15 min (for  $\text{H}_2\text{O}_2$  20  $\mu\text{M}$ ) or 40 min (for all other concentrations).  $\text{H}_2\text{O}_2$  quantity expressed in nmol/mg protein represents means  $\pm$  SE ( $n = 4$  cell-covered filter inserts). The average amount of total protein contained in epithelial cell monolayers was 0.129 mg protein/ $\text{cm}^2$ ). *Inset*: semilogarithmic representation of data obtained during the initial period of exposure to  $\text{H}_2\text{O}_2$ . **C**:  $\text{H}_2\text{O}_2$  initial elimination rate  $v$  (solid line), and modeled  $\text{H}_2\text{O}_2$  elimination rates dependent on catalase (dotted line) and glutathione peroxidases (dashed line) (cf. MATERIALS AND METHODS). **D**: Hanes-Woolf plot of glutathione peroxidase kinetic parameters in cultured live CP epithelial cells calculated from **C** (dashed line), and measured in CP homogenates (solid line,  $\blacktriangle$ ), and in CP epithelial cell homogenates (solid line,  $\blacksquare$ ) using the glutathione peroxidase-specific enzymatic method.  $K_m$  and  $V_{\max}$  values are expressed in  $\mu\text{M}$  and  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ , respectively. CP, choroid plexus; CPEC, choroid plexus epithelial cells; CSF, cerebrospinal fluid; GPxs, glutathione peroxidases.

To allow the use of low concentrations of  $\text{H}_2\text{O}_2$  yet compatible with the detection limit of the assay, and to explore the existence of a metabolic blood-to-CSF barrier to  $\text{H}_2\text{O}_2$ , all subsequent experiments were performed by adding  $\text{H}_2\text{O}_2$  into the larger basolateral compartment. The kinetic parameters of  $\text{H}_2\text{O}_2$  elimination in the choroidal epithelium were determined by exposing the cells to  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations ranging from 20 to 450  $\mu\text{M}$ . The amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  remaining in the whole

Table 3. Absence of  $\text{H}_2\text{O}_2$  inactivation by choroid plexus epithelial cell conditioned media

	Time, min		
	0	7.5	25
$\text{H}_2\text{O}_2$ concentration, %			
Apical medium	100 $\pm$ 3.5	nd	98.0 $\pm$ 2.3
Basolateral medium	100 $\pm$ 3.5	106.5 $\pm$ 2.9	104.8 $\pm$ 3.2

Data are expressed as percentage of the  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration measured following incubation in non cell-exposed Ringer HEPES buffer (means  $\pm$  SD,  $n = 4$ ). Ringer HEPES buffer was collected from either the apical or the basolateral compartments 7.5 and 25 min after addition onto choroidal epithelial cells grown in a two-chamber device. Hydrogen peroxide (44  $\mu\text{M}$ ) was added to either conditioned medium for a period equivalent to the conditioning period. nd, Not determined.

system (apical + basolateral media) was plotted against time (Fig. 4B). The data show that CP epithelial cells efficiently inactivated  $\text{H}_2\text{O}_2$ , whichever initial concentration in the basolateral compartment is applied. The linear part of the log representation of these elimination curves (Fig. 4B, *inset*) provides for each concentration the period that can be used to determine the initial elimination rate constants  $k_{el}$  (Table 4). Those values were used to calculate  $\text{H}_2\text{O}_2$  elimination half-life  $t_{1/2}$  for each concentration (Table 4). The decrease in  $t_{1/2}$  values as a function of decreasing  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations indicates that the elimination process involves a saturable component. To further investigate the mechanism, we calculated the initial  $\text{H}_2\text{O}_2$  elimination rates  $v$  from  $k_{el}$  values and plotted them against the initial  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration (Fig. 4C, solid line). Curve fitting analysis was performed on the assumption that  $\text{H}_2\text{O}_2$  elimination results from two coexisting enzymatic reactions (see MATERIALS AND METHODS, Eq. 6). The curves corresponding to the mixed-order reaction attributed to GPxs (Eq. 8) and the first-order reaction attributed to catalase (Eq. 7) are shown in Fig. 4C (dashed and dotted line, respectively). The respective  $v$  values for GPx and catalase activities, calculated for each concentration (Table 4), indicate that GPx activity is dominant in  $\text{H}_2\text{O}_2$  inactivation when the initial concentration is

Table 4.  $H_2O_2$  elimination half-life and elimination rate in choroid plexus epithelial cells

Initial $[H_2O_2]$ , $\mu M$	Initial $H_2O_2$ Quantity, $\mu mol/mg$ protein	Initial Elimination Rate Constant $k_{el}$ , $min^{-1}$	Elimination Half- Life $t_{1/2}$ , min	$H_2O_2$ Elimination Rate $v$ , $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg$ protein $^{-1}$		
				Total	First-Order Reaction (Catalase)	Mixed-Order Reaction (GPxs)
446.7 $\pm$ 21.8	5.4 $\pm$ 0.5	0.0241	28.8	127.6	72.79	54.80
205.4 $\pm$ 16.3	1.9 $\pm$ 0.1	0.0371	18.7	71.4	33.46	37.95
50.2 $\pm$ 7.4	0.5 $\pm$ 0.0	0.0459	15.1	21.9	8.18	13.75
20.8 $\pm$ 0.7	0.2 $\pm$ 0.0	0.0521	13.3	9.6	3.38	6.26

Initial  $H_2O_2$  concentration and quantity are means  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). GPxs, glutathione peroxidases. See MATERIALS AND METHODS for definition of  $H_2O_2$  elimination parameters and details on calculations.

below 250  $\mu M$ . The constant  $V_{max}$ -to- $K_m$  ratio, an index of the catalytic efficiency, generated by these data for catalase, is 0.163  $ml \cdot min^{-1} \cdot mg$  protein $^{-1}$ . The kinetic parameters  $K_m$  and  $V_{max}$  determined for GPx-dependent  $H_2O_2$  inactivation in live cultured choroidal cells were 272.7  $\mu M$  and 88.5  $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg$  protein $^{-1}$ , respectively. The Hanes-Woolf representation of GPx kinetic is reported in Fig. 4D (dashed line). The kinetic parameters measured in CP homogenates using the GPx-specific enzymatic method were 10.3  $\mu M$  for  $K_m$  and 116.3  $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg$  protein $^{-1}$  for  $V_{max}$  (Fig. 4D, solid line, triangle). The large difference in  $K_m$  values between the two experimental settings may be accounted for by a change in GPx affinity for  $H_2O_2$  induced by cell culture, or a reduced  $H_2O_2$  accessibility in live cells compared with the homogenate. To address this point, GPx kinetic parameters were measured in homogenized cultured cells, in conditions where cell membranes are disrupted. The  $K_m$  of 7.9  $\mu M$  in homogenized cultured cells (Fig. 4D, solid line, square) was similar to that of CP homogenates, indicating that substrate accessibility rather than enzymatic activity is the limiting parameter in  $H_2O_2$  elimination by choroidal GPxs. The somewhat higher  $V_{max}$  (232.6  $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg$  protein $^{-1}$ ) measured in cultured CP epithelial cell homogenates by comparison with CP homogenates (Fig. 4D) could be attributed to the low GPx-active stromal and vascular material present in whole CP homogenates.

The major contribution of GPx activity in  $H_2O_2$  detoxification was confirmed in CP epithelial cells treated with 3-AT and CDNB, which are respective inhibitors of catalase and GPxs (Fig. 5A). Catalase inhibition had no effect on the clearance of  $H_2O_2$  elimination while GPx inhibition resulted in a substantial decrease in this parameter. Treatment with both inhibitors almost fully abolished  $H_2O_2$  detoxification. The latter result confirms that 3-AT efficiently inhibits catalase in our experimental conditions and suggests that, when used alone, the inhibitory effect of 3-AT on catalase is masked by the potent compensating GPx detoxifying activity.

*The choroid plexus epithelial cells form a metabolic barrier preventing blood-borne  $H_2O_2$  from reaching the cerebrospinal fluid.* Choroid plexus epithelial cells impeded the basolateral to apical flux of  $H_2O_2$  added at a 50  $\mu M$  concentration into the blood compartment (Fig. 5B, Ctrl). The permeability coefficient  $P_t$  was inferior to 0.1  $\mu l \cdot min^{-1} \cdot cm^{-2}$ , a value set by the detection limit of the  $H_2O_2$  quantification technique in our experimental conditions. Catalase inhibition had only a very limited effect on  $H_2O_2$  permeability, which became barely measurable in the apical chamber (Fig. 5B; 3-AT). By contrast, the choroidal permeability to  $H_2O_2$  significantly increased when GPx activity was inhibited (Fig. 5B, CDNB). Permeability

to  $H_2O_2$  was further increased when cells were simultaneously treated with GPx and catalase inhibitors (Fig. 5B, CDNB + 3-AT). It became close to the permeability coefficient measured on filters coated with laminin without cells, which was  $12.5 \pm 0.5 \mu l \cdot min^{-1} \cdot cm^{-2}$  (mean  $\pm$  SE,  $n = 3$ ). This demonstrates that choroidal GPxs play a crucial role in providing a barrier function toward blood-borne  $H_2O_2$ .

The effect of these inhibiting conditions on the barrier integrity was evaluated in a separate experiment, by measuring the permeability of CP epithelial cells to sucrose, a small polar nonpermeable marker (Fig. 5C). Both CDNB alone and a combination of CDNB and 3-AT significantly increased sucrose permeability in the presence of  $H_2O_2$ , while 3-AT alone had no effect. The increase in permeability was already observed at 20 min and was thereafter cumulative. The compound CDNB per se does not impair the choroidal barrier function when applied in the absence of  $H_2O_2$  over a 60-min period (25). The present data indicate that a few tens of micromolar  $H_2O_2$  has the intrinsic capacity to alter the integrity of the blood-CSF barrier, and that choroidal GPxs are important to protect the blood-CSF barrier from blood-borne hydroperoxides.

## DISCUSSION

In this article, we showed that throughout postnatal development, the CPs displayed a high GPx activity in comparison to the neuropil. Western blotting and immunohistochemical studies highlighted the choroidal specific expression of GPx1 and GPx4 in newborn rats. Similar choroidal GPx activity levels and GPx1 immunopositivity were previously described in adult animals, respectively in rat and mouse (60, 62). The high GPx expression and functionality observed during early postnatal development is an indicator of the early developmental maturation of the choroidal tissue. The GPx activity in CPs was even higher than in liver at the early postnatal stages. This has been reported previously for other detoxifying systems of the CPs (40). It further sustains the concept that the choroidal tissue is a distinctive neuroprotective brain structure during postnatal development, when the liver is still immature in its detoxifying function. These functions remain, however, highly active throughout adulthood and in aging (60). Of note, the sex difference in hepatic GPx activity observed in W5 and W12 rats (our data), and in mice (42, 59) does not exist in CPs.

A transcriptomic analysis of GPx isoenzymes in CPs of developing as well as adult rats indicated that both GPx1 and GPx4 genes are highly expressed by comparison to the other isoenzymes GPx2 and GPx3 (39). Altogether, the transcriptomic and immunohistological data point out GPx1 and GPx4



isoenzymes as the main probable effectors of the high choroidal GPx activity measured throughout development. Hydrogen peroxide is a prototypic hydroperoxide substrate common to all GPx isoenzymes (8). Glutathione peroxidase 1 can also accept soluble low molecular mass hydroperoxides such as *t*-butyl hydroperoxide as substrates (8). This isoenzyme seems to be mainly involved in antioxidant defense, since GPx1-knockout mice are highly sensitive to acute oxidative stress (11). Gluta-

thione peroxidase 4 is able to reduce both small hydroperoxides and more complex lipid hydroperoxides, including those inserted in membranes. It is involved in various physiologic processes, such as the control of apoptosis or leukotriene synthesis by regulating the 12,15- and 5-lipoxygenase activities, respectively (8, 34). Hence, these two choroidal isoenzymes appear to have complementary functions, hinting at the hypothesis that CPs are involved in both physiological signaling and detoxification processes (see below). Besides GPxs and catalase, peroxiredoxins also display a reductive activity towards  $H_2O_2$ , but they are involved in cell redox sensing rather than in hydroperoxide inactivation. They are unlikely to contribute to the peroxidase activity we measured in CPs. This activity was mainly GSH-dependent whereas peroxiredoxins do not use GSH as a cosubstrate. In addition, the peroxiredoxin catalytic constant is lower by three orders of magnitude than that of GPxs (31, 51).

We demonstrated the functional relevance of the high choroidal GPx expression by showing that live CPs have a rare ability to detoxify  $H_2O_2$ , and GPxs are the main enzymes involved in the process for hydroperoxide concentration up to 250  $\mu M$ . This specific feature of the CPs may serve several purposes.

First, choroidal peroxidase activity can be related to self-protection of the tissue. The metabolic activity and energy demand of choroidal epithelial cells are high. This results from the energy-consuming maintenance of a tight barrier between the blood and the CSF. It also bears on other energy-consuming mechanisms that include CSF secretion, the synthesis and secretion of polypeptides involved in brain development and neuroimmune regulation, and multiple ATP-dependent transport processes (24). The corresponding high number of mitochondria in choroidal cells (12) calls for potent antioxidant mechanisms to counteract superoxide and  $H_2O_2$  molecules generated by oxidative phosphorylation. This may account at least partially for the high GPx activities associated with the choroidal tissue. Exposure of choroidal epithelial cells to high levels of  $H_2O_2$  (65), or to a moderate level of the hydroperoxide in the presence of a GPx inhibitor (our data) induces an alteration of the tightness of the blood-CSF barrier. Controlling  $H_2O_2$  concentration in choroidal epithelial cells is thus essential to maintain the integrity of the blood-CSF barrier. Choro-

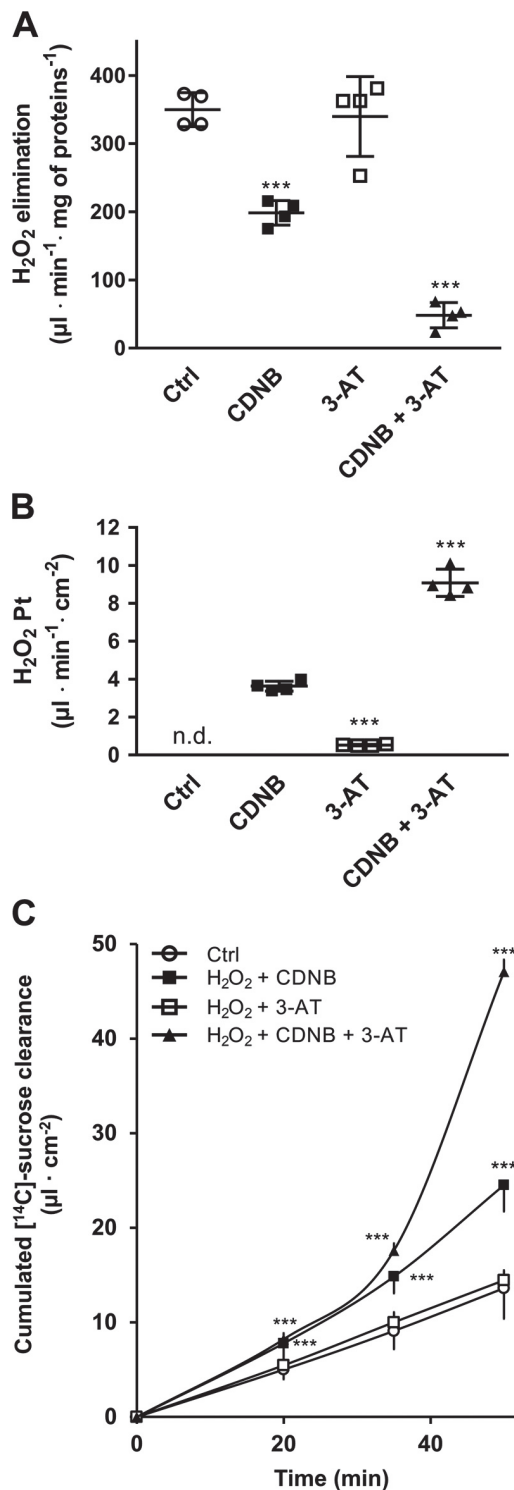


Fig. 5. Effect of catalase and glutathione peroxidase inhibition on  $H_2O_2$  elimination, permeation, and toxicity on the blood-cerebrospinal fluid barrier. After preincubation with 50  $\mu M$  CDNB, 10 mM 3-AT, or both, choroid plexus epithelial cells were basolaterally exposed to 50  $\mu M$   $H_2O_2$  in the presence of the inhibitors. The apical and basolateral compartments were sampled separately after 20 min and assayed for  $H_2O_2$ . A: amount of  $H_2O_2$  eliminated after 20 min. Data are expressed as  $H_2O_2$  clearance volume (means  $\pm$  SD;  $n = 4$ ). Statistical differences from control value: \*\*\* $P \leq 0.001$ , one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. B: basolateral to apical flux of  $H_2O_2$  during the 20-min incubation period. Data are expressed as permeability constant,  $P_t$  (means  $\pm$  SD,  $n = 4$ ). Statistical differences from CDNB condition: \*\*\* $P \leq 0.001$  one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. C: evaluation of the barrier integrity. Cells were pretreated as in A and exposed to [ $^{14}C$ ]sucrose at the time of  $H_2O_2$  addition. The basolateral to apical flux of sucrose was measured during three consecutive periods. Data are expressed as cumulated sucrose clearance (means  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Statistical differences from control value for each period of time: \*\*\* $P \leq 0.001$ , two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; CP, choroid plexus; Ctrl, control; 3-AT, 3-aminotriazole.



dal GPxs should also prevent the propagation of lipid peroxidation in CP epithelial cells and the subsequent formation of toxic by-products induced by supraphysiological levels of lipid hydroperoxides (3).

Second, the strong hydroperoxide inactivation capacity of the choroidal tissue can also participate to the signal termination of  $H_2O_2$  and lipid hydroperoxides released in nonpathological conditions. During brain development,  $H_2O_2$  acts as an intra- and intercellular signaling mediator involved in cell development and proliferation, axonal guidance, GABAergic synaptic transmission, and cell death regulation through the control of cell redox processes (2, 7, 20, 52). Diffusion or drainage of hydroperoxides into the CSF from the connected interstitial fluid, coupled to their inactivation by the lateral and 4th ventricle CPs, may participate in controlling their extracellular levels. This choroidal function may be essential as glial cell reductive capacities are not fully functional during brain development, and the relative volume occupied by CSF in the cranial cavity is high (22).

Third, the GPx-dependent capacity of CPs to inactivate hydroperoxides represents a powerful mechanism of neuroprotection against central oxidative stress, a common determinant in oxidative, inflammatory, infectious, or toxic insults. The noxious effects that supraphysiological  $H_2O_2$  concentrations in cerebral fluid can exert on brain development are sustained in various pathologies. Down syndrome patients suffer early on from excessive oxidative stress related to an increased production of  $H_2O_2$  as a result of an elevated superoxide dismutase activity (46). In asphyxiated newborns, encephalopathy occurrence is correlated with an elevated level of total hydroperoxides in CSF (32). The levels of ROS, including  $H_2O_2$ , are elevated in the CSF in neonates and children diagnosed with acute bacterial meningitis, and these  $H_2O_2$  levels in CSF are significantly higher in patients with neurological sequelae compared with patients that recover (36). Hydrogen peroxide generated in the course of bacterial infection can also trigger alterations in the ependyma bordering the cerebral ventricles, including an inhibition of ciliary activity (30). This may affect the maturation of the ventricular system and be deleterious to the neural progenitors that are present in the subependymal areas and contribute to gliogenesis and neurogenesis during development. By reducing  $H_2O_2$  concentration in brain fluids below toxic levels, CPs will contribute to limit  $H_2O_2$ -induced brain damage induced by inflammation, infection, hypoxia, or drug exposure during the peri/postnatal period.

Few studies have been aimed at estimating the concentration of  $H_2O_2$  released in brain fluids during such oxidative, inflammatory, or infectious stresses. In vivo microdialysis in the striatum has been performed to measure  $H_2O_2$  levels during and after an ischemia-reperfusion event in adult rat (33). The concentration increased from 20 to 70–120  $\mu M$  after 30 min of reperfusion that followed a 30-min ischemia. A similar study conducted on adult gerbils showed an increase from 1–2 to 3–4  $\mu M$  after a 5-min ischemia followed by 10 min of reperfusion (41). In human,  $H_2O_2$  levels in CSF measured in the course of pediatric diseases are in the order of several tens of micromoles (36). This limited set of data suggests that the  $H_2O_2$  concentration range for which choroidal GPxs are the most efficient (below 250  $\mu M$ ) is relevant to the pathophysiological  $H_2O_2$  levels released in brain fluids during postnatal insults. The concentration threshold above which  $H_2O_2$  becomes toxic in

vivo has not been established either. While  $H_2O_2$  concentrations in the 50  $\mu M$  range are toxic to neural cells in vitro (28),  $H_2O_2$ -mediated neurotoxic effects are likely to arise at lower concentrations in vivo owing to the generation of the hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ). This highly reactive free radical is formed by the nonenzymatic Fenton reaction which can occur in the CSF (55). Finally, small amounts of  $H_2O_2$  circulate in the blood (19, 29), and various peripheral stresses increase hydroperoxide levels in plasma. Infants with sepsis present blood levels of  $H_2O_2$  around 35  $\mu M$ , which is more than six times higher than the concentration in healthy infants (48). We showed that the choroidal epithelium acts as an enzymatic barrier preventing blood-borne  $H_2O_2$  from reaching the CSF and brain. This barrier effect will be especially crucial during development, as the CPs are then a quantitatively important gate of entry in the brain for molecules circulating in blood (23).

The analysis of GPx kinetic parameters in live cells and in homogenates indicates that CP epithelial membrane permeability to  $H_2O_2$  is the limiting step in GPx-dependent  $H_2O_2$  detoxification. The mechanism by which  $H_2O_2$  crosses the epithelial cell membrane remains to be ascertained. Besides simple diffusion, extracellular  $H_2O_2$  can get access to the intracellular compartment through diffusion-facilitating channel proteins from the aquaporin superfamily, including aquaporin 1 (6, 7). This channel participates in water transport during CSF secretion (50). Aquaporin 1 is predominantly localized in the apical membrane domain of choroidal epithelial cells, and to some degree in their basolateral membrane domain (50). We observed no difference in the rate of  $H_2O_2$  degradation between the apical and basolateral exposure conditions. This suggests that diffusion rather than aquaporin 1-dependent transfer drives  $H_2O_2$  access to intracellular GPxs.

In conclusion, this work identified the CPs as a major site of hydroperoxide inactivation in the brain during the postnatal period and showed that GPxs are the main enzymes responsible for this inactivation. The high choroidal peroxidase capacity represents an additional component of the detoxifying machinery functioning in CPs during brain development, and it should be especially relevant to the inactivation of supraphysiological toxic levels of hydroperoxides generated during peri/postnatal insults. In addition, choroidal GPxs should be essential to maintain the integrity of the blood-CSF barrier itself, by detoxifying reactive species arising from the basal metabolism of this highly energetic interface or from oxidative injuries.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Choroidal epithelial cell cultures were performed at the BIP facility of Neurosciences Research Center, Lyon (CRNL). We thank Sylvie Cavagna, Sandrine Blondel, Florence Tafono, and Emeline Auffret for valuable technical help in protein analysis, immunohistochemical localization, and enzymatic measurements.

#### GRANTS

This work was funded in part by Cesame Grant ANR-10-IBHU-0003.

#### DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.S., N.S., and J.-F.G.-E. conceived and designed research; E.S. and N.S. performed experiments; E.S. analyzed data; E.S., N.S., and J.-F.G.-E. interpreted results of experiments; E.S. prepared figures; E.S. and J.-F.G.-E. drafted

manuscript; E.S., N.S., and J.-F.G.-E. approved final version of manuscript; N.S. and J.-F.G.-E. edited and revised manuscript.

## REFERENCES

1. Áden U, Favrais G, Plaisant F, Winerdal M, Felderhoff-Mueser U, Lampa J, Lelièvre V, Gressens P. Systemic inflammation sensitizes the neonatal brain to excitotoxicity through a pro-/anti-inflammatory imbalance: key role of TNF $\alpha$  pathway and protection by etanercept. *Brain Behav Immun* 24: 747–758, 2010. doi:10.1016/j.bbi.2009.10.010.
2. Avshalumov MV, Chen BT, Marshall SP, Peña DM, Rice ME. Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Neurosci* 23: 2744–2750, 2003. doi:10.1523/JNEUROSCI.23-07-02744.2003.
3. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 360438, 2014. doi:10.1155/2014/360438.
4. Back SA. White matter injury in the preterm infant: pathology and mechanisms. *Acta Neuropathol* 134: 331–349, 2017. doi:10.1007/s00401-017-1718-6.
5. Baud O, Greene AE, Li J, Wang H, Volpe JJ, Rosenberg PA. Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *J Neurosci* 24: 1531–1540, 2004. doi:10.1523/JNEUROSCI.3989-03.2004.
6. Bienert GP, Chaumont F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1840: 1596–1604, 2014. doi:10.1016/j.bbagen.2013.09.017.
7. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 1758: 994–1003, 2006. doi:10.1016/j.bbamem.2006.02.015.
8. Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1830: 3289–3303, 2013. doi:10.1016/j.bbagen.2012.11.020.
9. Buonocore G, Perrone S, Bracci R. Free radicals and brain damage in the newborn. *Biol Neonate* 79: 180–186, 2001. doi:10.1159/000047088.
10. Carver JD, Benford VJ, Han B, Cantor AB. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. *Brain Res Bull* 56: 79–85, 2001. doi:10.1016/S0361-9230(01)00551-2.
11. Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF Jr, Lei XG. Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr* 128: 1070–1076, 1998. doi:10.1093/jn/128.7.1070.
12. Cornford EM, Varesi JB, Hyman S, Damian RT, Raleigh MJ. Mitochondrial content of choroid plexus epithelium. *Exp Brain Res* 116: 399–405, 1997. doi:10.1007/PL00005768.
13. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 468: 562–566, 2010. doi:10.1038/nature09513.
14. Desagher S, Glowinski J, Premont J. Astrocytes protect neurons from hydrogen peroxide toxicity. *J Neurosci* 16: 2553–2562, 1996. doi:10.1523/JNEUROSCI.16-08-02553.1996.
15. Dringen R, Brandmann M, Hohnholt MC, Blumrich EM. Glutathione-dependent detoxification processes in astrocytes. *Neurochem Res* 40: 2570–2582, 2015. doi:10.1007/s11064-014-1481-1.
16. Dringen R, Hamprecht B. Involvement of glutathione peroxidase and catalase in the disposal of exogenous hydrogen peroxide by cultured astroglial cells. *Brain Res* 759: 67–75, 1997. doi:10.1016/S0006-8993(97)00233-3.
17. Dringen R, Kussmaul L, Hamprecht B. Detoxification of exogenous hydrogen peroxide and organic hydroperoxides by cultured astroglial cells assessed by microtiter plate assay. *Brain Res Brain Res Protoc* 2: 223–228, 1998. doi:10.1016/S1385-299X(97)00047-0.
18. Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD, Saunders NR. Development of the choroid plexus. *Microsc Res Tech* 52: 5–20, 2001. doi:10.1002/1097-0029(20010101)52:1<5::AID-JEMT3>3.0.CO;2-J.
19. Forman HJ, Bernardo A, Davies KJA. What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? *Arch Biochem Biophys* 603: 48–53, 2016. [Erratum in *Arch Biochem Biophys* 607: 7, 2016.] doi:10.1016/j.abb.2016.05.005.
20. Gauron C, Meda F, Dupont E, Albadri S, Quenech'Du N, Ipendey E, Volovitch M, Del Bene F, Joliot A, Rampon C, Vriz S. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) controls axon pathfinding during zebrafish development. *Dev Biol* 414: 133–141, 2016. doi:10.1016/j.ydbio.2016.05.004.
21. Geremia E, Baratta D, Zafarana S, Giordano R, Pinizzotto MR, Grazia La Rosa M, Garozzo A. Antioxidant enzymatic systems in neuronal and glial cell-enriched fractions of rat brain during aging. *Neurochem Res* 15: 719–723, 1990. doi:10.1007/BF00973653.
22. Gherzi-Egea JF, Babikian A, Blondel S, Strazielle N. Changes in the cerebrospinal fluid circulatory system of the developing rat: quantitative volumetric analysis and effect on blood-CSF permeability interpretation. *Fluids Barriers CNS* 12: 8, 2015. doi:10.1186/s12987-015-0001-2.
23. Gherzi-Egea JF, Saudrais E, Strazielle N. Barriers to drug distribution into the perinatal and postnatal brain. *Pharm Res* 35: 84, 2018. doi:10.1007/s11095-018-2375-8.
24. Gherzi-Egea J-F, Strazielle N, Catala M, Silva-Vargas V, Doetsch F, Engelhardt B. Molecular anatomy and functions of the choroidal blood-cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathol* 135: 337–361, 2018. doi:10.1007/s00401-018-1807-1.
25. Gherzi-Egea J-F, Strazielle N, Murat A, Jouveta A, Buénerd A, Belin M-F. Brain protection at the blood-cerebrospinal fluid interface involves a glutathione-dependent metabolic barrier mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 1165–1175, 2006. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600267.
26. Gitto E, Reiter RJ, Karbownik M, Tan DX, Gitto P, Barberi S, Barberi I. Causes of oxidative stress in the pre- and perinatal period. *Biol Neonate* 81: 146–157, 2002. doi:10.1159/000051527.
27. Gromadzińska J, Skłodowska M, Wasowicz W. Glutathione peroxidase activity, lipid peroxides and selenium concentration in various rat organs. *Biomed Biochim Acta* 47: 19–24, 1988.
28. Gülden M, Jess A, Kammann J, Maser E, Seibert H. Cytotoxic potency of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic Biol Med* 49: 1298–1305, 2010. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.015.
29. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 486: 10–13, 2000. doi:10.1016/S0014-5793(00)02197-9.
30. Hirst RA, Sikand KS, Rutman A, Mitchell TJ, Andrew PW, O'Callaghan C. Relative roles of pneumolysin and hydrogen peroxide from *Streptococcus pneumoniae* in inhibition of ependymal ciliary beat frequency. *Infect Immun* 68: 1557–1562, 2000. doi:10.1128/IAI.68.3.1557-1562.2000.
31. Hofmann B, Hecht H-J, Flohé L. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 383: 347–364, 2002. doi:10.1515/BC.2002.040.
32. Hussein MH, Daoud GA, Kakita H, Kato S, Goto T, Kamei M, Goto K, Nobata M, Ozaki Y, Ito T, Fukuda S, Kato I, Suzuki S, Sobajima H, Hara F, Hashimoto T, Togari H. High cerebrospinal fluid antioxidants and interleukin 8 are protective of hypoxic brain damage in newborns. *Free Radic Res* 44: 422–429, 2010. doi:10.3109/10715760903548245.
33. Hyslop PA, Zhang Z, Pearson DV, Phebus LA. Measurement of striatal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by microdialysis following global forebrain ischemia and reperfusion in the rat: correlation with the cytotoxic potential of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in vitro. *Brain Res* 671: 181–186, 1995. doi:10.1016/0006-8993(94)01291-O.
34. Imai H, Narashima K, Arai M, Sakamoto H, Chiba N, Nakagawa Y. Suppression of leukotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 273: 1990–1997, 1998. doi:10.1074/jbc.273.4.1990.
35. Impey L, Greenwood C, Sheil O, MacQuillan K, Reynolds M, Redman C. The relation between pre-eclampsia at term and neonatal encephalopathy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 85: F170–F172, 2001. doi:10.1136/fn.85.3.F170.
36. Jain M, Aneja S, Mehta G, Ray GN, Batra S, Randhava VS. CSF interleukin-1 beta, tumor necrosis factor-alpha and free radicals production in relation to clinical outcome in acute bacterial meningitis. *Indian Pediatr* 37: 608–614, 2000.
37. Jones P, Suggett A. The catalase-hydrogen peroxide system. A theoretical appraisal of the mechanism of catalase action. *Biochem J* 110: 621–629, 1968. doi:10.1042/bj1100621.
38. Khuth ST, Strazielle N, Giraudon P, Belin MF, Gherzi-Egea JF. Impairment of blood-cerebrospinal fluid barrier properties by retrovirus-activated T lymphocytes: reduction in cerebrospinal fluid-to-blood efflux of prostaglandin E<sub>2</sub>. *J Neurochem* 94: 1580–1593, 2005. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03309.x.
39. Kratzer I, Liddel SA, Saunders NR, Dziegielewska KM, Strazielle N, Gherzi-Egea JF. Developmental changes in the transcriptome of the rat choroid plexus in relation to neuroprotection. *Fluids Barriers CNS* 10: 25, 2013. doi:10.1186/2045-8118-10-25.
40. Kratzer I, Strazielle N, Saudrais E, Mönkkönen K, Malleval C, Blondel S, Gherzi-Egea JF. Glutathione conjugation at the blood-CSF

- barrier efficiently prevents exposure of the developing brain fluid environment to blood-borne reactive electrophilic substances. *J Neurosci* 38: 3466–3479, 2018. doi:10.1523/JNEUROSCI.2967-17.2018.
41. Lei B, Adachi N, Arai T. Measurement of the extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the brain by microdialysis. *Brain Res Brain Res Protoc* 3: 33–36, 1998. doi:10.1016/S1385-299X(98)00018-X.
  42. Liang Q, Sheng Y, Jiang P, Ji L, Xia Y, Min Y, Wang Z. The gender-dependent difference of liver GSH antioxidant system in mice and its influence on isoleucine-induced liver injury. *Toxicology* 280: 61–69, 2011. doi:10.1016/j.tox.2010.11.010.
  43. Makar TK, Nedergaard M, Preuss A, Gelbard AS, Perumal AS, Cooper AJL. Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J Neurochem* 62: 45–53, 1994. doi:10.1046/j.1471-4159.1994.62010045.x.
  44. Martinez M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr* 120: S129–S138, 1992. doi:10.1016/S0022-3476(05)81247-8.
  45. Mello T, Zanieri F, Ceni E, Galli A. Oxidative stress in the healthy and wounded hepatocyte: a cellular organelles perspective. *Oxid Med Cell Longev* 2016: 8327410, 2016. doi:10.1155/2016/8327410.
  46. Muchová J, Žitňanová I, Duračková Z. Oxidative stress and Down syndrome. Do antioxidants play a role in therapy? *Physiol Res* 63: 535–542, 2014.
  47. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83: 346–356, 1977. doi:10.1016/0003-2697(77)90043-4.
  48. Pherwani AV, Puri VC, Malhotra V. Estimation of hydrogen peroxide levels in the blood and urine of normal infants and infants with sepsis. *Bombay Hosp J* 41: 8, 1999.
  49. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem* 97: 55–74, 2015. doi:10.1016/j.ejmech.2015.04.040.
  50. Praetorius J, Damkier HH. Transport across the choroid plexus epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 312: C673–C686, 2017. doi:10.1152/ajpcell.00041.2017.
  51. Saccoccia F, Angelucci F, Boumis G, Desiato G, Miele AE, Bellelli A. Selenocysteine robustness versus cysteine versatility: a hypothesis on the evolution of the moonlighting behaviour of peroxiredoxins. *Biochem Soc Trans* 42: 1768–1772, 2014. doi:10.1042/BST20140212.
  52. Safiulina VF, Afzalov R, Khiroug L, Cherubini E, Giniatullin R. Reactive oxygen species mediate the potentiating effects of ATP on GABAergic synaptic transmission in the immature hippocampus. *J Biol Chem* 281: 23464–23470, 2006. doi:10.1074/jbc.M601627200.
  53. Sampath J, Long PR, Shepard RL, Xia X, Devanarayan V, Sandusky GE, Perry WL III, Dantzig AH, Williamson M, Rolfe M, Moore RE. Human SPF45, a splicing factor, has limited expression in normal tissues, is overexpressed in many tumors, and can confer a multidrug-resistant phenotype to cells. *Am J Pathol* 163: 1781–1790, 2003. doi:10.1016/S0002-9440(10)63538-9.
  54. Sorce S, Krause K-H. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal* 11: 2481–2504, 2009. doi:10.1089/ars.2009.2578.
  55. Spasojević I, Mojović M, Stević Z, Spasić SD, Jones DR, Morina A, Spasić MB. Bioavailability and catalytic properties of copper and iron for Fenton chemistry in human cerebrospinal fluid. *Redox Rep* 15: 29–35, 2010. doi:10.1179/174329210X12650506623087.
  56. Strazielle N, Belin M-F, Ghersi-Egea J-F. Choroid plexus controls brain availability of anti-HIV nucleoside analogs via pharmacologically inhibitable organic anion transporters. *AIDS* 17: 1473–1485, 2003. doi:10.1097/00002030-200307040-00008.
  57. Strazielle N, Ghersi-Egea J-F. Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *J Neurosci* 19: 6275–6289, 1999. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-15-06275.1999.
  58. Strazielle N, Preston JE. Transport across the choroid plexuses in vivo and in vitro. *Methods Mol Med* 89: 291–304, 2003.
  59. Sverko V, Sobocanec S, Balog T, Marotti T. Age and gender differences in antioxidant enzyme activity: potential relationship to liver carcinogenesis in male mice. *Biogerontology* 5: 235–242, 2004. doi:10.1023/B:BGEN.0000038024.58911.6e.
  60. Tayarani I, Cloëz I, Clément M, Bourre J-M. Antioxidant enzymes and related trace elements in aging brain capillaries and choroid plexus. *J Neurochem* 53: 817–824, 1989. doi:10.1111/j.1471-4159.1989.tb11778.x.
  61. Torres-Cuevas I, Parra-Llorca A, Sánchez-Illana A, Nuñez-Ramiro A, Kuligowski J, Cháfer-Pericás C, Cernada M, Escobar J, Vento M. Oxygen and oxidative stress in the perinatal period. *Redox Biol* 12: 674–681, 2017. doi:10.1016/j.redox.2017.03.011.
  62. Trépanier G, Furling D, Puymirat J, Mirault ME. Immunocytochemical localization of seleno-glutathione peroxidase in the adult mouse brain. *Neuroscience* 75: 231–243, 1996. doi:10.1016/0306-4522(96)00222-9.
  63. Wilson C, Muñoz-Palma E, González-Billault C. From birth to death: a role for reactive oxygen species in neuronal development. *Semin Cell Dev Biol* 80: 43–49, 2018. doi:10.1016/j.semcdb.2017.09.012.
  64. Workman AD, Charvet CJ, Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci* 33: 7368–7383, 2013. doi:10.1523/JNEUROSCI.5746-12.2013.
  65. Xiang J, Alesi GN, Zhou N, Keep RF. Protective effects of isothiocyanates on blood-CSF barrier disruption induced by oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303: R1–R7, 2012. doi:10.1152/ajpregu.00518.2011.
  66. Zhang LP, Maiorino M, Roveri A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta* 1006: 140–143, 1989. doi:10.1016/0005-2760(89)90336-6.



# Glutathione Conjugation at the Blood–CSF Barrier Efficiently Prevents Exposure of the Developing Brain Fluid Environment to Blood-Borne Reactive Electrophilic Substances

Ingrid Kratzer,<sup>1\*</sup> Nathalie Strazielle,<sup>1,2,3\*</sup> Elodie Saudrais,<sup>1,3</sup> Kati Mönkkönen,<sup>1</sup> Céline Malleval,<sup>1</sup> Sandrine Blondel,<sup>3</sup> and Jean-François Ghersi-Egea<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>FLUID Team, Lyon Neurosciences Research Center, INSERM U1028 CNRS UMR 5292, Université Claude Bernard Lyon-1, 69008 Lyon, France, <sup>2</sup>Brain-i, 69008 Lyon, France, and <sup>3</sup>Blood-Brain Interfaces Exploratory Platform BIP, Lyon Neurosciences Research Center, 69008 Lyon, France

Exposure of the developing brain to toxins, drugs, or deleterious endogenous compounds during the perinatal period can trigger alterations in cell division, migration, differentiation, and synaptogenesis, leading to lifelong neurological impairment. The brain is protected by cellular barriers acting through multiple mechanisms, some of which are still poorly explored. We used a combination of enzymatic assays, live tissue fluorescence microscopy, and an *in vitro* cellular model of the blood–CSF barrier to investigate an enzymatic detoxification pathway in the developing male and female rat brain. We show that during the early postnatal period the choroid plexus epithelium forming the blood–CSF barrier and the ependymal cell layer bordering the ventricles harbor a high detoxifying capacity that involves glutathione S-transferases. Using a functional knock-down rat model for choroidal glutathione conjugation, we demonstrate that already in neonates, this metabolic pathway efficiently prevents the penetration of blood-borne reactive compounds into CSF. The versatility of the protective mechanism results from the multiplicity of the glutathione S-transferase isoenzymes, which are differently expressed between the choroidal epithelium and the ependyma. The various isoenzymes display differential substrate specificities, which greatly widen the spectrum of molecules that can be inactivated by this pathway. In conclusion, the blood–CSF barrier and the ependyma are identified as key cellular structures in the CNS to protect the brain fluid environment from different chemical classes of potentially toxic compounds during the postnatal period. This metabolic neuroprotective function of brain interfaces ought to compensate for the liver postnatal immaturity.

**Key words:** blood–brain barriers; brain homeostasis; glutathione S-transferases; neuroprotection; oxidative stress; perinatal

## Significance Statement

Brain homeostasis requires a stable and controlled internal environment. Defective brain protection during the perinatal period can lead to lifelong neurological impairment. We demonstrate that the choroid plexus forming the blood–CSF barrier is a key player in the protection of the developing brain. Glutathione-dependent enzymatic metabolism in the choroidal epithelium inactivates a broad spectrum of noxious compounds, efficiently preventing their penetration into the CSF. A second line of detoxification is located in the ependyma separating the CSF from brain tissue. Our study reveals a novel facet of the mechanisms by which the brain is protected at a period of high vulnerability, at a time when the astrocytic network is still immature and liver xenobiotic metabolism is limited.

## Introduction

The developing brain is sensitive to chemical insults and oxidative stress, and the resulting damage can be devastating, resulting

in lifelong neurological impairment (Dammann and Leviton, 1999; Favrais et al., 2011). The blood–brain interfaces, namely the blood–brain barrier located at the endothelium of the cerebral microvessels and the blood–CSF barrier located at the epithelium of the choroid plexuses efficiently protect the adult brain

Received Oct. 4, 2017; revised Feb. 1, 2018; accepted Feb. 17, 2018.

Author contributions: I.K., N.S., and J.-F.G.-E. designed research; I.K., N.S., E.S., K.M., C.M., S.B., and J.-F.G.-E. performed research; I.K., N.S., E.S., K.M., S.B., and J.-F.G.-E. analyzed data; N.S. and J.-F.G.-E. wrote the paper.

This work was funded in part by the European Union Seventh Framework Programme [No. HEALTH-F2-2009-241778 Neurobid, to N.S. (Brain-i) and to J.-F.G.-E. (FLUID)]. *In vivo* blood–CSF permeability studies and choroidal epithelial cell culture were performed at the BIP facility of Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, supported by ANR-10-IBHU-0003 Cesame grant. We thank Catherine Rey for valuable help and advice on laser microdissection and RT-qPCR, and Ouliana Barnéoud-Rousset and Aida Roiges-Biel for technical help in enzymatic measurements.

\*I.K. and N.S. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to either of the following: Jean-François Ghersi-Egea, FLUID Team, CRNL, INSERM U1028 CRNS UMR 5292, Faculty of Medicine, RTH Laennec, Rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France, E-mail: jean-francois.ghersi-egea@inserm.fr; or Nathalie Strazielle, Brain-i and FLUID Team, CRNL, Faculty of Medicine RTH Laennec, Rue Guillaume Paradin, 69008 Lyon, France, E-mail: ns.brain.i@gmail.com.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2967-17.2018

Copyright © 2018 the authors 0270-6474/18/383466-14\$15.00/0

from circulating toxic substances by a set of mechanisms combining tight junctions, efflux transporters, and detoxifying enzymes (Neuwelt et al., 2008; Strazielle and Ghersi-Egea, 2013; Ghersi-Egea et al., 2018). These interfaces have often been considered functionally immature during prenatal and postnatal development, thereby contributing to the vulnerability of the maturing brain. This concept of barrier immaturity is being challenged. The efficacy of tight junctions, which link neighboring barrier cells together, in preventing paracellular diffusion during development has been demonstrated (Johansson et al., 2006). This efficacy results from the early expression and correct membrane localization of the multiple proteins forming these tight junctions in both rat and human brain barrier cells (Kratzer et al., 2012). The functionality of transport and metabolic processes during the perinatal period remains largely unaddressed (Strazielle and Ghersi-Egea, 2015). Glutathione *S*-transferases (GSTs) form a family of isoenzymes largely involved in detoxification processes (Hayes et al., 2005). Several immunohistochemical analyses have pointed out an apparently robust expression of GSTs in the choroid plexuses and ependyma (for review, see Strazielle et al., 2004). A high enzymatic activity of conjugation to reduced glutathione (GSH) has been measured in homogenates of choroid plexuses isolated from both fetal human and postnatal rat brains (Ghersi-Egea et al., 2006). More recently, a transcriptomic analysis of choroid plexus identified several GST isoenzymes that are expressed during development (Kratzer et al., 2013), revealing perinatal-specific detoxification properties of the blood–CSF barrier. The detoxification properties of this tissue may therefore be especially crucial in protecting the brain during the perinatal period when the CSF, in which the brain develops, represents a large proportion of the cerebral extracellular fluid (Ghersi-Egea et al., 2015).

In this work, we identify the choroid plexuses and the ependyma as major sites for GSH conjugation in the developing brain. We provide the *in vivo* demonstration that choroidal GSTs support a metabolic barrier function of the blood–CSF interface protecting the maturing brain, by preventing the penetration of blood-borne electrophilic substrates into the CSF. We finally provide the molecular identity and relative level of expression of the different GST isoenzymes responsible for neuroprotection at the blood–CSF barrier and ependyma.

## Materials and Methods

**Animals, tissue sampling, and processing.** Female OFA rats with their litter, and 35-day-old [postnatal day 35 (P35)] and 200 g adult male OFA rats were obtained from Janvier. Animal care and procedures were conducted according to the guidelines approved by the French Ethical Committee (decree 87-848) and by European Community directive 86-609-EEC. The ethical committee for animal experimentation CEEA-55 has approved the present research project. All animals were kept under identical conditions in standard cages, with free access to food and tap water under a controlled environment (12 h dark/light cycles). Animals were killed at different postnatal ages by decapitation following deep isoflurane gas anesthesia. Following brain extraction in Ca- and Mg-supplemented PBS, lateral ventricle and fourth ventricle choroid plexuses and cerebral cortices devoid of meninges were sampled under a stereomicroscope at 4°C. Tissues were frozen and kept at –80°C for enzymatic analysis or RNA isolation. Alternatively, some brains were either collected in ice-cold Krebs-Ringer (KR) buffer (135 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM HEPES, and 5 mM glucose, pH 7.4) and immediately sliced for imaging studies, or were frozen in –40°C cold isopentane and kept at –80°C until used for laser microdissection. In some animals, the liver was also sampled.

**Choroidal glutathione-depleted animals.** Two-day-old rat pups were treated with DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (BSO; catalog B2640,

Sigma-Aldrich) to generate developing animals that display a severe (92%) GSH depletion in blood–CSF barrier cells. The pups were treated by three intraperitoneal injections of 2  $\mu$ mol/g depleting agent in dimethylsulfoxide/NaCl 0.9% (15/85), performed on 2 consecutive days (9:00 A.M. and 4:00 P.M. on P2, and 9:00 A.M. on the following day). Half of the litter was treated with BSO, and the second half was treated with vehicle only. Animals were used for permeability measurement 4 h after the last injection (see Fig. 3).

**Glutathione *S*-transferase activity measurement.** Choroidal tissue, cerebral cortices, and liver were sampled from P2, P7, P35, and adult rats. Tissues were homogenized in a 0.25 M sucrose, 50 mM K-phosphate, 1 mM K-EDTA, and 0.1 mM dithiothreitol buffer, pH 7.4, using a Tenbroeck homogenizer. Glutathione *S*-transferase activity was determined by a 15 min kinetic analysis in a M200 Pro TECAN plate spectrofluorimeter. Assays were conducted in 250  $\mu$ l of 0.05 M K-phosphate and 0.02% bovine serum albumin, pH 6.5 at 22°C, using 1 mM GSH (Sigma-Aldrich), and 50  $\mu$ M monochlorobimane (MCB; Sigma-Aldrich) as a substrate. Excitation and emission wavelengths of 355 and 460 nm, respectively, were used to detect and quantify the rate of appearance of the GSH conjugate GS-MCB. The low rate of nonenzymatic conjugation of MCB to GSH was assessed by omitting the protein homogenate from the complete assay mixture. Production of the conjugate was calibrated in each sample by measuring the increase in fluorescence intensity produced by the addition of 1 nmol of pure GS-MCB at the end of the kinetic analysis. The specific activity was then expressed as nanomoles of conjugate produced per minute and per milligrams of proteins. The total protein content of the samples was determined by the method of Peterson (1977) with bovine serum albumin as the standard. The GS-MCB used as a calibrator was prepared and purified as follows. Known concentrations of MCB were incubated with rat liver homogenate and GSH in excess in a 37°C water bath for 20 min to produce GS-MCB. Final concentration of the standard was calculated after determining the presence of residual unconjugated MCB by HPLC, as previously described for another conjugate (Ghersi-Egea et al., 2006).

For *in vitro* competition studies, GST activity was measured toward 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) in the presence of 1 mM GSH and 50 or 200  $\mu$ M competitor. These competitor concentrations were about twofold and eightfold higher than the apparent affinity constant for CDNB in choroidal tissue. Production of the conjugate was followed at 340 nm by kinetic spectrophotometry, as previously described (Ghersi-Egea et al., 2006). All the potential competitive substrates were tested for their limited absorbance at 340 nm.

**Imaging of GSH conjugation in ependyma-containing brain slices and isolated choroid plexuses.** Brains of P6 animals were dissected under a stereomicroscope in ice-cold KR buffer to isolate the midbrain tissue. The latter was sliced in ice-cold KR buffer using a McIlwain tissue chopper to generate 200- $\mu$ m-thick ependyma-containing brain slices. Freshly cut brain slices were warmed to 22°C in a few microliters of buffer on a glass slide under a Zeiss AxioPlan 2 Microscope, equipped with the Digital Camera F-View II and AnalySISauto software (Olympus Soft Imaging Solutions). Fluorescence images were recorded at 460 nm with a 390 nm excitation beam switched on only intermittently. This protocol prevented photobleaching, the acute cellular toxicity induced by UV waves, and the depletion of the cellular pool of ATP that is necessary for transport processes. An initial image was recorded in the ependymal area (negative control). Buffer was removed and replaced with a 10  $\mu$ M MCB solution, and fluorescence images were again recorded 0.7 and 4 min after MCB addition. All images were recorded with the same time exposure. On each recorded image, a fluorescence intensity profile was established along a rectangle perpendicular to the ependymal cell layer using ImageJ software. This yielded average fluorescence intensity data in both the ependyma and in the adjacent tissue.

For fluorescence image recording on choroid plexus, the choroidal tissue was rapidly dissected from the brain of P5 animals in ice-cold KR buffer, transferred on a glass slide in a few microliters of buffer, maintained with a 300  $\mu$ m mesh sieve, and allowed to warm up at 22°C before MCB addition and image recording, as described above.

**Intracerebroventricular monochlorobimane injection and imaging of GSH conjugation.** P4 rats were set in a stereotaxic frame under inhaled anesthesia (4–5% isoflurane, 60%/40% O<sub>2</sub>/air), associated with a local topical application of lidocaine/prilocaine (Anesderm, Pierre Fabre). Two microliters of artificial CSF (124 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 26 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 10 mM glucose, pH 7.3) containing 0.7% EtOH and 200  $\mu$ M MCB were injected over 10 s in the lateral ventricle using a 30 gauge needle. Stereotaxic coordinates relative to  $\lambda$  were +4 mm anteroposterior, +1.2 mm lateral, and –2.4 mm dorsoventral. The needle was removed 50 s after the end of the injection, and the head of the anesthetized animal was immediately severed and frozen in –40°C isopentane. The head was then sliced in a cryostat as previously described (Gherzi-Egea et al., 2015), and 20- $\mu$ m-thick coronal sections were dried immediately on a plate heater set at 37°C. Fluorescence images were instantly recorded using the Zeiss Axioplan 2 Microscope.

**Primary culture of choroidal epithelial cells.** Primary cultures of choroid plexus epithelial cells were prepared from neonate rat choroid plexuses, as previously described (Strazielle and Gherzi-Egea, 1999; Strazielle et al., 2003). The cells were seeded on microporous Transwell polycarbonate filter inserts (either 0.33 or 1.12 cm<sup>2</sup> surface area, and 0.4  $\mu$ m pore size; Corning Life Sciences) and grown in culture medium consisting of Ham's F-12 medium and DMEM (1:1) supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, 50 mg/ml gentamicin, and several growth factors, as previously reported (Strazielle and Gherzi-Egea, 1999). The medium was renewed every other day until the permeability studies, which were performed 5 d after cells reached confluence.

**In vitro cellular permeability and metabolic studies.** Permeability and metabolic studies were performed on a rotating shaker (300 rpm) at 37°C, in Ringer-HEPES buffer (RH; 150 mM NaCl, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.8 mM glucose, and 5 mM HEPES, pH 7.4). The volumes used in the two compartments of the inserts (the bottom basolateral one mimicking blood, and the top apical one mimicking CSF) were selected as to be in equilibrium to prevent any hydrostatic pressure effect. Inserts were rinsed once with RH buffer before initiating the transport studies. MCB was added to the basolateral compartment at a concentration of 5 or 50  $\mu$ M. At regular time intervals, the inserts were transferred into another well containing fresh incubation solution, and four-fifths of the volume in the apical compartment was sampled and replaced with fresh prewarmed RH. Media from the apical and basolateral compartments were analyzed by spectrofluorimetry (excitation/emission at 355/460 nm) for GS-MCB and by HPLC for MCB. The organic anion transporter inhibitor probenecid was used at a concentration of 3 mM in both compartments. It was added 30 min before incubating the cells with MCB, and was kept and renewed in both compartments following each sampling. Monochlorobimane clearance volumes were calculated for each time interval, taking into account the residual volume remaining in the apical compartment from the previous time point, as previously described (Strazielle and Preston, 2003). For quantification of spectrofluorimetric data, the GS-MCB calibrator described above for enzymatic measurement was used. Experiments were run in parallel using cell-covered filters in the absence of MCB, with and without probenecid, to measure the background fluorescence levels associated with the inhibitor or any solute secreted by the epithelial cells during the transfer experiment. Background fluorescence was subtracted from the total fluorescence before calculating the amount of GS-MCB released by the cells in both compartments. The intracellular GS-MCB content was assessed as follows: inserts were rinsed twice for 5 min in RH buffer at 4°C on an orbital shaker; the cell-covered filters were quickly detached from their plastic support and stored at –20°C in 100  $\mu$ l of water/ethanol (98/2 v/v) containing 250  $\mu$ M ethacrynic acid. After thawing and homogenization by trituration using a conic plastic pestle, an aliquot of the liquid was analyzed by spectrofluorimetry as described above. Ethacrynic acid was added to the medium to prevent further conjugation of residual MCB to GSH during cell homogenization.

To assess the innocuousness of the different compounds and vehicles added on the epithelial cell layer, [<sup>14</sup>C]-sucrose permeability was measured as an index of barrier integrity. Data were expressed as permeability coefficients  $P_e$  (in centimeters per minute) calculated from the clearance

curves generated as previously described in detail (Strazielle and Gherzi-Egea, 1999; Strazielle et al., 2003). Radioactivity was determined by liquid scintillation counting using a  $\beta$ -counter (Tri-Carb 1600 TR, Canberra Packard).

**In vivo blood–CSF transport studies.** The permeability of the blood–CSF barrier to CDNB was measured in BSO-treated and untreated animals by perfusing the compound into the vascular system through the heart and sampling CSF. Animals were anesthetized with pentobarbital (5  $\mu$ l/g), and the heart was exposed. Intracardiac perfusion of a physiological buffer (128 mM NaCl, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.2 mM KCl, 2.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM MgSO<sub>4</sub>, and 9 mM D-glucose) was performed at a physiological rate (0.67 ml/min) for 2 min using a dual-perfusion pump (AL-1000, WPI). This was followed by a 5 min perfusion of the same buffer supplemented with CDNB at various concentrations. This cardiac perfusion protocol did not alter the choroid plexus morphology, as assessed by hematoxylin and phloxin histology staining and claudin-1 immunolabeling of sections of brains sampled after perfusion (data not shown). After the perfusion was stopped, the animal was turned over and the skin over the cistern magna was quickly excised. CSF (4–8  $\mu$ l) was sampled using a glass microcapillary sampler with an outer tip diameter of ~500  $\mu$ m. CSF volume was precisely measured. CSF was then mixed with acetonitrile/H<sub>2</sub>O (50/50) to reach a total volume of 40  $\mu$ l and analyzed by HPLC for its CDNB content. The blood–CSF barrier integrity in control and BSO-treated animals was assessed by measuring the  $K_{in\ csf}$  permeability constant for [<sup>14</sup>C]-sucrose as previously described (Gherzi-Egea et al., 2015). The apparent blood–cerebral cortex permeability constant  $AppK_{in\ cx}$  for [<sup>14</sup>C]-sucrose was measured in a similar way, without correcting for the amount of sucrose associated with the tissue for the residual vascular content.

**Quantification of monochlorobimane, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, and reduced glutathione.** A Shimadzu LC10 HPLC System was used. Monochlorobimane was quantified using UV detection at 236 nm. CSF, buffers, and media were directly injected on a 150 mm hypersil 5  $\mu$ m C18 BDS column (Thouzart and Matignon), and the compound was eluted using an isocratic 20/80 acetonitrile/water mobile phase at a 1 ml/min flow rate. The monochlorobimane retention time was 8 min. 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene was quantified on an Ultraphase ODS RP-18 Analytical Column (Beckman) using an isocratic 55/10/35 methanol/10 mM phosphate buffer pH 6/water mobile phase at a 1 ml/min flow rate. It was detected at 250 nm with a retention time of 11 min. Reduced glutathione was coupled with 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic) acid in 10 mM phosphate buffer, pH 7.4, and analyzed on the Ultraphase ODS RP-18 column, using a methanol/phosphate buffer elution gradient as previously described (Schmitt et al., 2011). UV detection was set at 324 nm, and the retention time was 6.6 min. For all compounds, the area under the curve of the peak of interest was measured, and quantification was performed using a calibration curve generated from standard solutions.

**Total RNA extraction, reverse transcription, and real-time PCR.** Liver, choroid plexuses from lateral and fourth ventricles, and cerebral cortex from P2, P10, and adult Sprague Dawley rats were sampled. When collected from P2 and P10 pups, choroid plexuses were pooled from three to four animals. For comparative purpose, RNA was also extracted from two batches of microvessels prepared from P9 and adult rat brain, as described previously in detail (Gazzin et al., 2008). Total RNA was extracted using RNeasy Mini (liver) or Micro (choroid plexuses, cortex, and capillaries) kits (Qiagen) according to the manufacturer instructions. Before RNA extraction, liver, cerebral cortex, and capillaries were homogenized in the RLT buffer using a FastPrep shaker (QBiogene). Capillary homogenates were treated with Proteinase K (Qiagen) at 55°C for 10 min. Choroid plexus tissues from lateral and fourth ventricles were dissociated by pipetting. All samples were treated on column with DNase I as recommended by the manufacturer. RNA was quantified using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), and RNA integrity was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer.

RNA was reverse transcribed using oligo(dT) primers and the Verso SYBR Green 2-step RT-qPCR Rox Kit (Thermo Fisher Scientific). Total RNA (1  $\mu$ g) was spiked with 50 pg of AraB RNA (L-ribulokinase, *E. coli* strain K-12, substrain MG1655, GE Healthcare Bio-Sciences). The bacterial RNA was added in each reaction mixture as an external standard for



**Table 1. Primers used for RT-qPCR**

Target gene	Forward primer sequence 5' > 3'	Reverse primer sequence 5' > 3'	Product size (bp)	[MgCl <sub>2</sub> ]
GSTM1	CCA CAT TTT TGA GCC CAA GT	TGA GTG CCA GTG TAG CAA GG	179	3 mM
GSTM2	TTC GCC TGT TCC TGG AGT AT	CCA TAG CCT GGT TCT CCA AA	267	3 mM
GSTM3	CAT CCC GGA GAA GAT GAA AA	CAG GTC TTG GGA GAA AGC TG	233	3 mM
GSTM4	TAC AAG GGT GGC TAC TTG GG	GCC TAG GCT GTA GAG GGC TT	191	3 mM
GSTM5	GGT TTG CAG GAG AAA AGC TG	TGA TTG GCA TCT TGA AGC AG	186	3 mM
GSTM6	ACG GAA GCC TGA GTT CTT GA	CCA CGT GGC CTG TTT TAA GT	280	3 mM
GSTA1	AGT TGG GAG CTG AGT GGA GA	TTT GGT GGC GAT GTA GTT GA	297	3 mM
GSTA3	CAG CCA GAG GAA GCC ATT AG	CCC AGC AAT TCC TCA TCA GT	228	3 mM
GSTA4	GTT CCT GCA GAC AAA ATC CC	GCA TCC ATC CTT TTG CAA CT	195	4 mM
GSTP1	TGT ACT TCC CAG TTC GAG GG	GGG TGA GGT CTC CAT CTT CA	168	3 mM
Arab ( <i>Escherichia coli</i> )	ATC CCC TGA TCG GTA AAG CA	ACG CCT GAA AGG GGT GAT TA	126	4 mM

normalization. Reverse transcription was run at 42°C for 60 min. Quantitative PCR (qPCR) was performed using the FastStart DNA Master SYBR Green I Kit in the LightCycler 1.5 instrument (Roche Applied Science), as previously described (Kratzer et al., 2012). Primer sequences, MgCl<sub>2</sub> concentrations, and sizes of the predicted amplicons are presented in Table 1. Results were analyzed using RelQuant 1.01 software (Roche Applied Science), which takes into account the respective amplification efficiencies of the target gene and the external standard (AraB) when calculating the target gene/standard ratio. An approximate ranking of abundance of the different GST gene products was generated first by establishing the expression levels of all genes in a reference sample, arbitrarily chosen as adult liver N°2, and second by calculating for each target gene the expression levels in all individual samples relative to the value in the reference sample, as previously described (Kratzer et al., 2012).

**Ependyma laser microdissection and sample processing.** Brains were dissected from P2, P9, and adult Sprague Dawley rats. Twelve-micrometer-thick sections were cut around bregma using a Shandon Cryotome E (Thermo Fisher Scientific) in an RNase-free environment, rapidly air dried, frozen on dry ice, and kept at –80°C until further processed for laser microdissection. Sections were thawed and stained using the Ambion LCM Staining Kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer instructions. Briefly, sections were fixed in 95% ethanol, rehydrated into 75% and 50% ethanol, and stained in cresyl violet. They were dehydrated in 75% to 100% ethanol solutions, then in xylene and kept in a vacuum chamber with dessicant until used to perform microdissection. The PixCell II laser capture microdissection instrument (Arcurus Engineering) was used to isolate the ependymal layer of the lateral ventricle wall and adjacent caudate–putamen tissue (see Fig. 8). The captured tissue was lysed in RLT buffer and RNA was extracted and treated with DNase I using the RNeasy Micro Kit, as described above. RNA integrity was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer and RNA was quantified using the Quant-iT RiboGreen Reagent (Thermo Fisher Scientific). RNA samples (5 ng) were spiked with 0.125 pg of bacterial AraB RNA. Two amplification rounds were performed using the ExpressAra NANO RNA Amplification Kit (amsbio). The quality of amplified RNA was assessed using the Agilent 2100 Bioanalyzer, and reverse transcription of 1 µg of RNA was performed using the iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Bio-Rad). Real-time PCR was performed as described above.

**Western blot analysis.** Western blot analysis of GSTs in tissue sampled from P2 or P9 rats was performed using anti-GSTα3 rabbit polyclonal antibody (pAb; MBS713631, MyBioSource), anti-GSTμ1/2 rabbit monoclonal Ab (ab108524, Abcam), anti-GSTμ5 rabbit pAb (MBS712299, MyBioSource), and anti-GSTπ1 rabbit pAb (PAB13020, Abnova). Actin used as a loading control was detected with anti-β-actin mouse monoclonal Ab (A1978, Sigma-Aldrich). Proteins were separated on 10% Bis-Tris Criterion XT Gels (Bio-Rad) run in MOPS [3-(N-morpholino) propanesulfonic acid] buffer (Bio-Rad) at 70 V for 10 min, followed by 120 V for 2 h. The gel was blotted onto 0.2 µm Protran nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences) in Tris-glycine transfer buffer (Euromedex) containing 20% methanol for 50 min at 100 V. The membrane was saturated in 5% skimmed milk, 0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline (TBS) at room temperature for 1 h. Primary anti-GST

antibodies were diluted in saturation buffer at 0.69 µg/ml for GSTμ1/2, 0.7 µg/ml for GSTμ5, 1 µg/ml for GSTπ1, and 0.31 µg/ml for GSTα3. The anti-β-actin mouse Ab was used at a final dilution of either 0.1 or 0.05 µg/ml, depending on the amount of protein loaded. Membranes were incubated at 4°C overnight, then washed three times for 10 min in TBS containing 0.1% Tween-20 (TBS-T) at room temperature. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch. Donkey anti-rabbit IgG pAb (711-036-152) was used at a final concentration of 0.04 µg/ml for GSTα3, GSTπ1, and GSTμ1/2, and 0.08 µg/ml for GSTμ5, and donkey anti-mouse IgG pAb (catalog #715-036-151, Jackson ImmunoResearch) was used at a final concentration of 0.04 µg/ml. After two washes in TBS-T and a final one in TBS, chemiluminescent HRP substrate (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fisher Scientific) was used and membranes were exposed to x-ray films (Hyperfilm ECL, GE Healthcare Life Sciences). Only one band was observed for GSTμ1/2 (28 kDa), GSTμ5 (26 kDa), GSTα3 (26 kDa), and GSTπ1 (24 kDa) in postnatal choroid plexus. Two bands were observed in liver homogenate for GSTα3 (25 and 26 kDa).

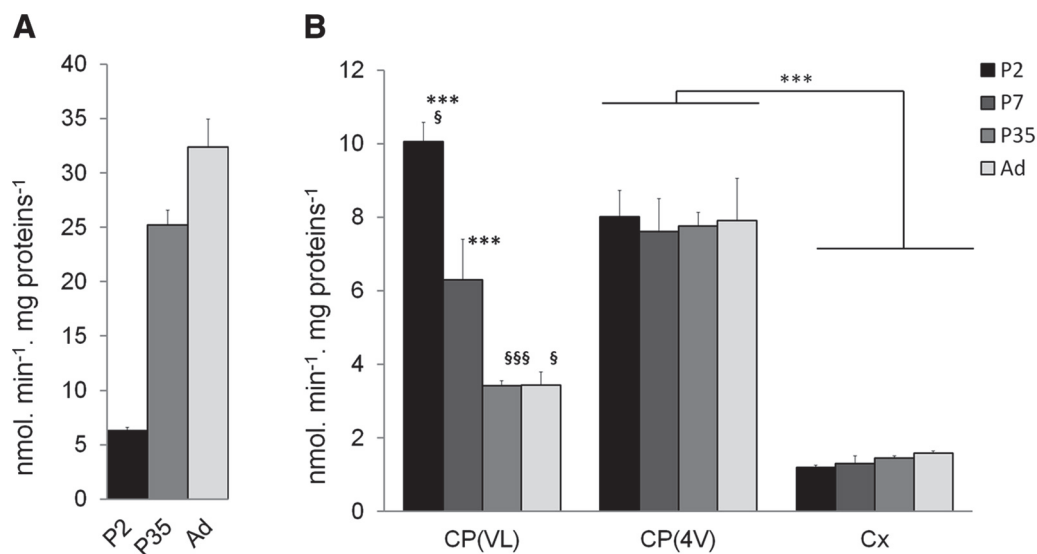
**Experimental design and statistical analysis.** Quantitative data related to animal physiology, barrier function, and enzymatic processes are reported as the mean ± SEM. Data from RT-qPCR analysis are expressed as the mean ± SD. Multigroup comparisons were analyzed using one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple-comparison test. Statistical analyses involving two groups of data were performed using either a one-tailed or two-tailed Student's *t* test, as appropriate. Lateral and fourth ventricle choroid plexuses were dissected and analyzed separately in each animal, or in batches of animals. Analyses of differences between these two tissues were therefore performed using a paired *t* test. For clarity, the statistical tests used are specified in each figure. The number of samples analyzed per group was chosen in reference to similar previously published experimental approaches conducted by our group on choroid plexuses. These numbers are indicated on graphs or in figure legends. All qualitative data presented have been reproduced at least twice on different batches of materials.

## Results

### Enzymatic glutathione conjugation at the blood–CSF interface efficiently protects the CSF and brain during postnatal development

Substrates like CDNB or MCB are conjugated with GSH by the whole subset of GST isoenzymes involved in xenobiotic detoxification (Eklund et al., 2002; Hayes et al., 2005). Conjugation of either compound therefore reflects the overall GST-dependent detoxifying capacity of a given tissue. While CDNB conjugation produces a metabolite that is readily detected and quantified by HPLC, MCB presents the advantage in generating a fluorescent conjugate that can be detected by both spectrofluorimetry and cellular imaging techniques. We first used MCB to establish the postnatal developmental profile of GST activity in tissue homogenates prepared from lateral and fourth ventricle choroid plex-





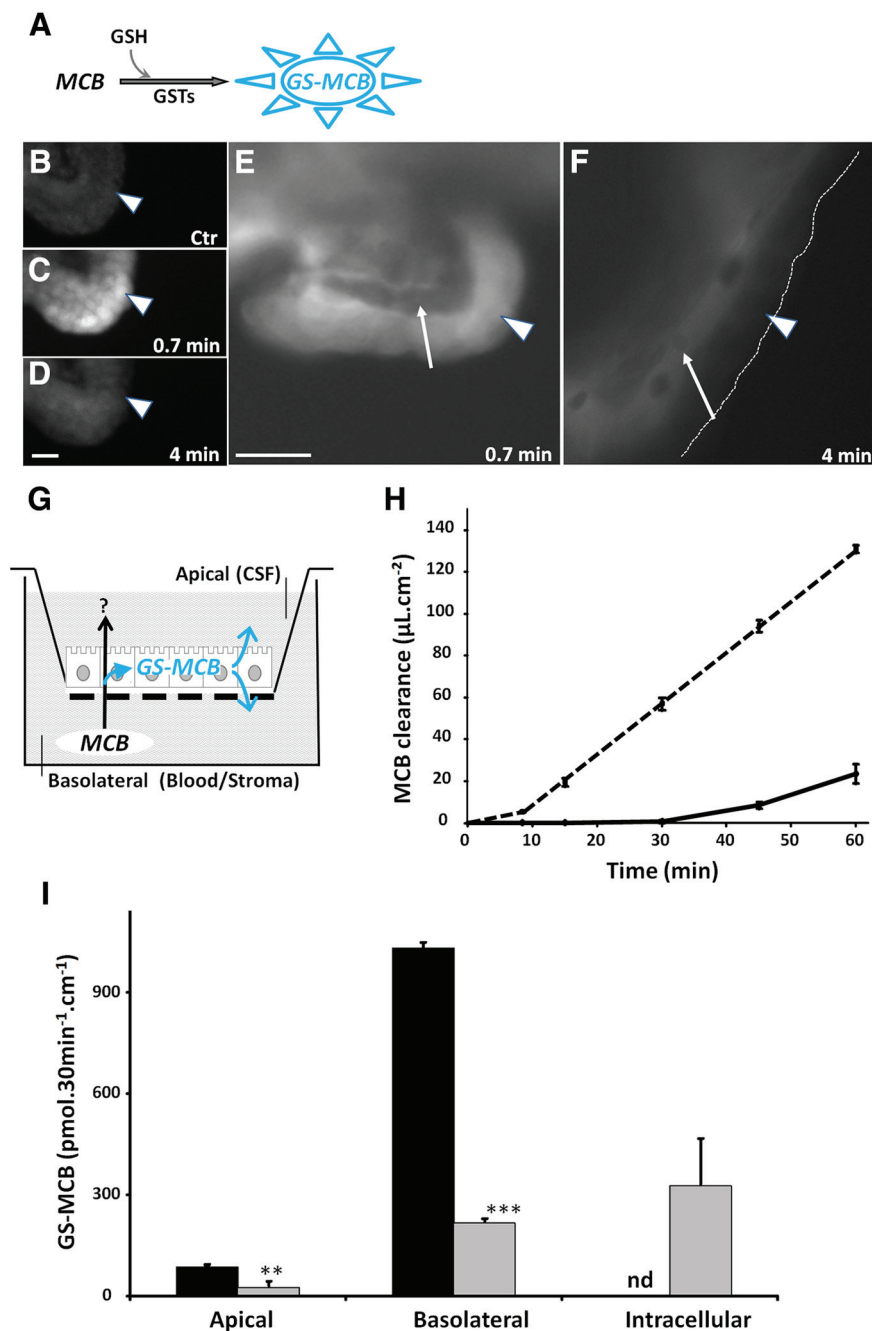
**Figure 1.** Glutathione *S*-transferase-specific activity in liver and brain tissues in the rat during postnatal development. The specific activity of GST was measured using MCB as a substrate in liver (A) and brain tissue (B) homogenates prepared from P2, P7, P35, and adult (Ad) animals. Data are the mean  $\pm$  SEM;  $n = 4–8$ . \*\*\* $p < 0.01$ , statistically different from cerebral cortex activity at matching developmental stage, one-way ANOVA followed by *post hoc* Tukey–Kramer test.  $^{\$}p < 0.05$  and  $^{\$\$}p < 0.001$ , significantly different from the activity measured in choroid plexus of the fourth ventricle, two-tailed paired Student's *t* test. CP(VL) and CP(4V), CP of the lateral and fourth ventricle, respectively; Cx, cortex.

uses, and from cerebral cortex (Fig. 1). Liver, which is the main detoxifying organ in the body, was analyzed in parallel as a reference tissue. Glutathione *S*-transferase-specific activity increased sharply in liver in P35 animals compared with P2 pups, indicating the relative immaturity of this organ at birth in the rat. In contrast, GST activity was already high in both types of plexuses in newborn animals and was higher than in the brain cortical tissue. From 5 weeks on, the activity toward MCB measured in the choroidal tissue from the fourth ventricle was twice that measured in the choroidal tissue from the lateral ventricle, as also observed when using CDNB as a substrate (Gherzi-Egea et al., 2006). The activity in choroid plexuses from the fourth ventricle remained significantly higher than in the cerebral cortex at all developmental stages.

To explore the GST-dependent conjugating capacity of live choroidal epithelial cells and investigate the fate of the metabolite, we exposed freshly isolated choroid plexuses to 10  $\mu$ M MCB and recorded fluorescence images in a plane cutting through both the epithelium and the stroma (Fig. 2A–F). The choroidal epithelium became rapidly and intensely fluorescent (Fig. 2C,E, arrowheads), indicating that MCB is readily conjugated to GSH within epithelial cells. The fluorescence in the epithelial layer decreased thereafter (Fig. 2D,F), likely as a result of the sharp drop in MCB concentration that we measured in the incubation medium (data not shown) and the concomitant cellular export of the fluorescent metabolite, which was observed in the underlying stroma at 4 min (Fig. 2F, arrows). This suggests that the conjugate is exported from the cells at least partially at the basolateral membrane. To get more insight into the conjugation capacity of the choroidal epithelium and to characterize the polarity of conjugate efflux from the choroidal cells, we used an *in vitro* cellular model of the blood–CSF barrier (Fig. 2G), which closely reproduces the properties of the choroidal epithelium *in vivo*. In particular, cells in culture maintain the drug metabolism capacity of the native tissue, including its high GST-specific activity (Strazielle and Gherzi-Egea, 1999; Strazielle et al., 2003). Epithelial cells were exposed to 5  $\mu$ M MCB in the lower compartment of the bichamber culture device. The basolateral to apical (blood to

CSF) diffusion of MCB across the epithelial monolayer was completely prevented for up to 30 min, presumably by intracellular MCB conjugation, and remained low thereafter (Fig. 2H). Over the 60 min period, the clearance of MCB did not exceed the clearance of sucrose used as a paracellular marker (data not shown). Adding CDNB as a competitor (data not shown) or raising the MCB concentration from 5 to 50  $\mu$ M (Fig. 2H) negated the barrier effect. To ascertain the metabolic nature of this barrier mechanism, the appearance of the conjugate GS-MCB in the basolateral and apical compartments and its intracellular concentration were monitored by HPLC analysis after a 30 min exposure to 5  $\mu$ M MCB. The conjugate was indeed produced and secreted from epithelial cells, and its efflux rate was 10 times higher at the basolateral membrane compared with the CSF-facing membrane (Fig. 2I). The conjugate was below detection level in the cell monolayer. When choroidal epithelial cells were preincubated with probenecid, an inhibitor of large specificity for organic anion transporters, GS-MCB efflux was reduced at both basolateral and apical membranes and its intracellular concentration increased (Fig. 2I). Collectively, this set of data confirms the strong basolateral (blood-facing) polarity of efflux that we observed in freshly isolated choroid plexuses, and demonstrates that cellular export of the GSH conjugate is mediated by organic anions transporters at both membranes.

We then assessed *in vivo* the efficacy of this enzymatic barrier mechanism in preventing the diffusion of GST substrates from blood to CSF during brain development. The blood–CSF barrier permeability to CDNB was measured in rat pups displaying either a normal or a low capacity to conjugate xenobiotics to GSH in the choroid plexus. CDNB was chosen over MCB as it can be unambiguously detected and quantified in biological fluids including CSF by HPLC. It is also more soluble than MCB and could be used at the high concentration required to approach the maximal GSH-dependent conjugation capacity of the blood–CSF barrier. Functional knockdown of GSH conjugation in choroid plexuses of developing animals was achieved by treating P2 rats with three injections of BSO over a 36 h period. Buthionine sulfoximine is a selective inhibitor of  $\gamma$ -glutamyl cysteine ligase, which catalyzes



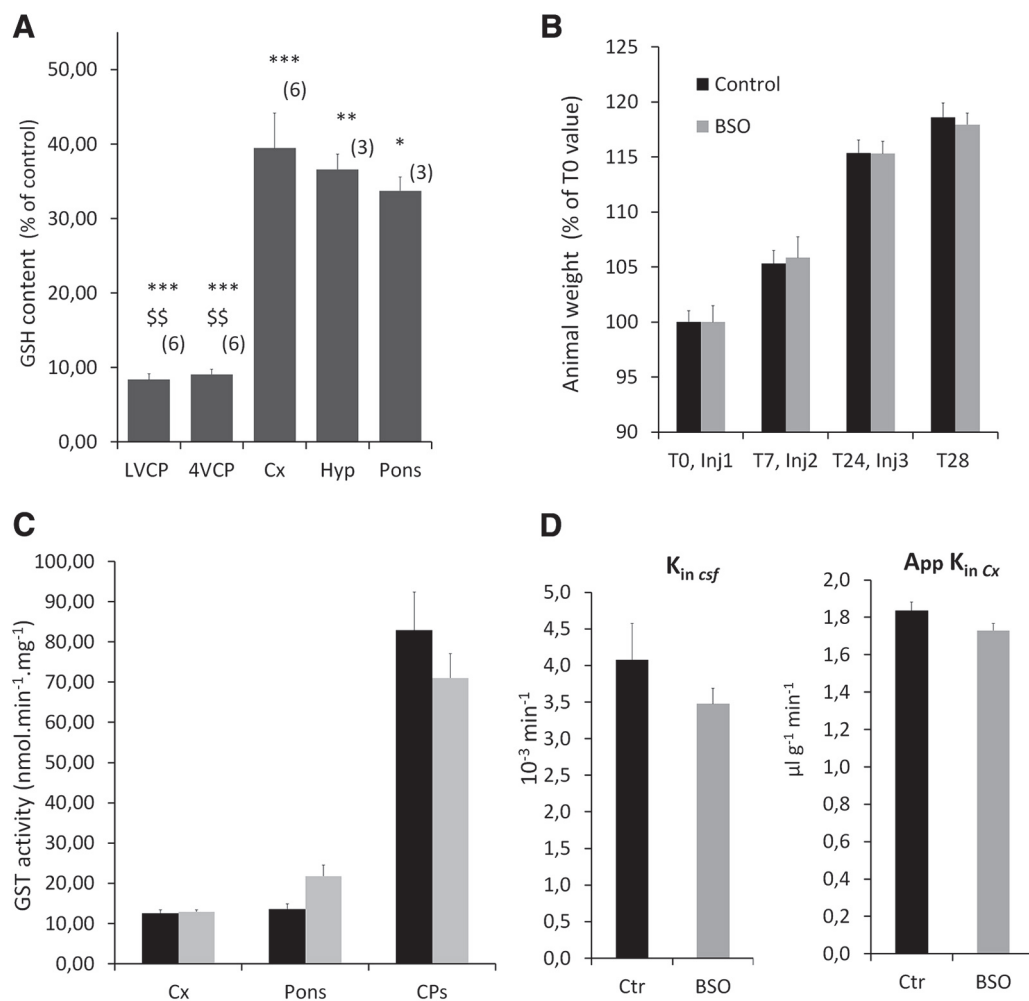
**Figure 2.** Enzymatic conjugation of MCB to glutathione in the blood–CSF barrier. **A**, Method: GST-mediated conjugation of the substrate MCB with GSH produces a fluorescent metabolite that can be monitored over time. **B–F**, *Ex vivo* exposure of freshly isolated choroid plexuses to MCB led to the rapid formation of the fluorescent GSH-conjugated metabolite within epithelial cells (arrowhead in **C** and **E**). After 4 min, the fluorescence signal decreased in the choroidal epithelial cells (arrowheads in **D** and **F**), and seemingly concentrated in the underlying vessel containing stroma (arrows in **E** and **F**). **B** is a negative control. **B–D** and **E, F** show, respectively, low-magnification and high-magnification images of the choroidal tissue exposed to  $10\ \mu\text{M}$  (**C–D**) and  $2.5\ \mu\text{M}$  (**E–F**) MCB. In **F**, the dashed line delimits the apical membrane of epithelial cells. Scale bar,  $20\ \mu\text{m}$ . **G–H**, Choroid plexus epithelial cells cultured on a porous filter (**G**) form an enzymatic barrier preventing the basolateral to apical transfer of MCB. When MCB was added to the basolateral compartment at a concentration of  $5\ \mu\text{M}$ , the appearance of the parent compound in the apical compartment was fully impeded for 30 min and remained strongly limited thereafter (**H**, full line). When the cells were exposed to  $50\ \mu\text{M}$  MCB, the enzymatic barrier effect lasted only 10 min, and the MCB clearance rate strongly increased thereafter (**H**, dashed line). **I**, Excretion of the conjugate produced within the choroidal epithelium was highly polarized, 90% of the metabolite being found in the basolateral medium. The conjugate was not detected intracellularly (black bars, cells exposed to  $5\ \mu\text{M}$  MCB for 30 min). When cells were preincubated with  $3\ \text{mM}$  probenecid before MCB exposure, GS-MCB efflux was strongly reduced at both basolateral and apical membranes, and the metabolite accumulated in the epithelial cells (gray bars). Data are the mean  $\pm$  SEM of four filters.  $**p < 0.01$  and  $***p < 0.001$ , statistically different from GS-MCB amount in the absence of probenecid, one-tailed Student's *t* test for unequal variance. nd, Not detected.

the first and rate-limiting step in GSH synthesis. Four hours after the last injection, the treatment led to an almost complete (92%) depletion of GSH in both the fourth and lateral ventricle choroid plexuses, while the depletion was only partial (60%) in the brain parenchyma (Fig. 3A). This mild BSO treatment did not induce any overt toxicity, as it modified neither the feeding behavior of P2 rats nor their weight gain (Fig. 3B). It did not change the GST intrinsic enzymatic activity in either the brain parenchyma or the choroid plexus (Fig. 3C). Finally, this treatment did not alter the integrity of CNS barriers, as shown by the similar CSF and brain  $K_{in}$  values measured for sucrose in control and treated animals (Fig. 3D).

Four hours following the last BSO injection, animals were underwent intracardiac perfusion of CDNB followed by CSF sampling. In control animals, CDNB was not detected in the CSF when the compound was perfused at concentrations up to  $200\ \mu\text{M}$ , but was measured at a low level when the perfusate concentration was raised to  $500\ \mu\text{M}$  (Fig. 4). The depletion of choroidal GSH resulted in a substantial increase in CDNB influx in CSF at both concentrations. When the xenobiotic was perfused at  $500\ \mu\text{M}$ , its concentration in CSF was 30-fold higher in depleted rats than in control animals. The outflow perfusate collected from the cardiac atrium did not show any significant difference in CDNB concentration between control and BSO-treated animals (Fig. 4, insert), ruling out a possible peripheral effect of the depleting agent on the xenobiotic distribution. The large difference in CDNB levels in CSF observed between control and choroidal GSH-depleted animals demonstrates that the GSH-dependent metabolic activity of the blood–CSF barrier effectively contributes to protect the brain environment from blood-borne chemical substrates during development.

### The ependyma participates in cerebral glutathione-dependent detoxification

Exposure to toxic molecules for a prolonged period may ultimately overcome this choroidal neuroprotective metabolic mechanism. The ependymal cells lining the ventricular system will become the first targets. To address the possibility that these cells could be a site of subsequent protection, we evaluated their conjugating capacity by infusing MCB in the lateral ventricles of P4 rats. A strong fluorescence reflecting GS-MCB production was observed at the ependymal interface in the ipsilateral ventricle of animals killed



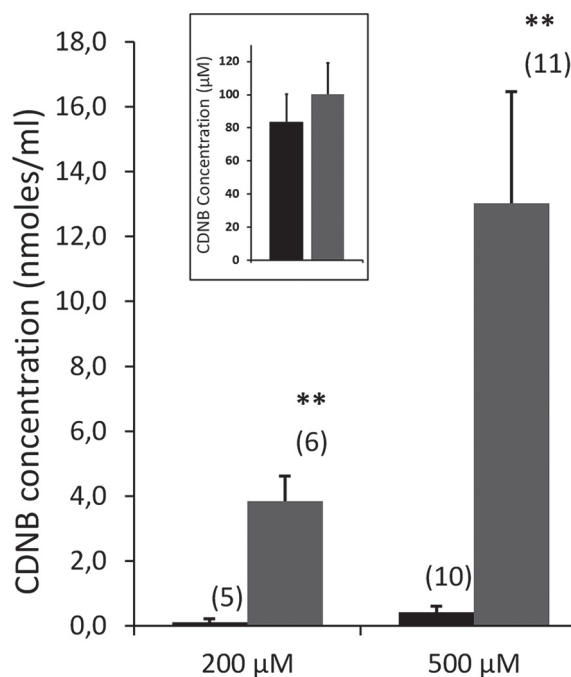
**Figure 3.** Characterization of the choroid plexus glutathione-depleted animal model. **A**, Levels of GSH in tissue from animals treated with BSO. Choroidal tissue is depleted from GSH by >90%, while 40% of GSH is still present in brain tissue after BSO treatment. Data are calculated as micromoles per milligram of tissue and are expressed as the percentage of values measured in DMSO-treated control animals, and the mean  $\pm$  SEM ( $n$ ). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001, different from control animals. \$\$ $p$  < 0.01, different from Cx or Pons, two-tailed Student's  $t$  test for unequal variance. LVCP and 4VCP, choroid plexuses from the lateral and fourth ventricle, respectively; Cx, Cerebral cortex; Hyp, hypothalamus. **B**, Animal weight from the time of treatment initiation (T0) to the time of killing, 4 h following the third injection (T28). Animals were treated by three injections of BSO or vehicle (control). A typical experiment is shown. Data are expressed as the percentage of weight at T0, mean  $\pm$  SEM,  $n$  = 6. No difference in weight gain was observed between the two groups of animals. **C**, Enzymatic GST activity toward CDNB in homogenates from tissue sampled from control (black bars) and GSH-depleted (gray bars) animals. BSO treatment did not induce any significant change in GST-specific activity. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM,  $n$  = 3. **D**, Blood–CSF permeability constant ( $K_{in\ csf}$ ) and apparent blood–cerebral cortex permeability constant (App  $K_{in\ Cx}$ ) for [ $^{14}$ C]-sucrose in control (black bars) and BSO-treated (gray bars) animals. No difference in permeability was observed between the two groups of animals, indicating that the integrity of the blood–brain and blood–CSF barriers is preserved following BSO administration. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM,  $n$  = 5.

within a minute from the beginning of the infusion, indicating that ependymal cells also have a high GSH conjugation capacity (Fig. 5A). The contralateral ependyma, used as a negative control, did not show any fluorescence above background level (Fig. 5B). A similar GSH conjugation activity toward MCB was observed downstream in the ventricular system, namely in the ependyma of the third ventricle (Fig. 5C). Monochlorobimane conjugation was further explored in ependyma-containing brain slices prepared from developing animals (Fig. 5D–F). Six-day-old animals were selected for these studies because at this developmental stage the ependyma appears mostly as a single layer, thus allowing a clear delineation between the ependymocytes and the adjacent tissue, and a more precise quantification of the signal. Following MCB addition to the slice incubation medium, a bright fluorescence reflecting the production of the GSH conjugate rapidly appeared within the ependymal layer, as illustrated at the level of the ventral part of the third ventricle (Fig. 5E). Production of the GSH conjugate in the ependyma was higher than in the adjacent

brain parenchyma (Fig. 5E, G). The ependymal fluorescence intensity decreased after a few minutes (Fig. 5F), presumably due to the transporter-mediated efflux of the polar metabolite from ependymocytes. Accordingly, the addition of 2.5 mM probenecid in slice incubation medium prevented the decrease in fluorescence (Fig. 5G). Identical images were recorded for the ependyma bordering the aqueduct (data not shown). Collectively, these data show the ability of the ependyma to act as a second line of defense toward electrophilic compounds that could have bypassed the blood–CSF barrier and reached the CSF.

#### GSH conjugation at the blood–CSF and CSF–brain interfaces results from the expression of several multispecific isoenzymes

To probe into the diversity of molecules that could be detoxified by the choroid plexus during development, we performed GST activity competitive inhibition studies. The spectrophotometric method using CDNB as the substrate was chosen over the fluori-



**Figure 4.** *In vivo* efficacy of the glutathione-dependent metabolic activity of the blood–CSF barrier toward CDNB. Levels of CDNB were measured in the CSF sampled from control animals (black) and animals depleted in choroidal GSH (BSO treated, gray) in P3 rats perfused with 200 or 500  $\mu$ M CDNB. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, (n). \*\* $p < 0.01$ , statistically different from control animals, one-tailed Student's *t* test for unequal variance. Insert shows no changes in CDNB concentration measured in the outflow perfusate collected from the cardiac atrium between control and BSO-treated animals (mean  $\pm$  SEM, no statistical difference).

metric method with MCB to avoid interference of the competitors with the fluorescent signal. Choroidal CDNB conjugation was inhibited by several xenobiotics such as dietary additives, pharmacological drugs, or products of oxidative stress, which are all potentially toxic (Table 2). The inhibitory effect of these compounds on GST activity was similar in choroid plexuses of the lateral ventricle and fourth ventricle. Large differences were observed among molecules in their effective concentration and in the extent of inhibition. As detoxifying GST isoforms display differential substrate specificities toward the competitors tested, while CDNB is conjugated by all these isoenzymes, this suggests that several isoforms are active in choroid plexuses. Extensive multiple-concentration inhibition studies were not performed as they requested an ethically unacceptable number of developing animals to generate the required amount of choroidal tissue.

We then determined by RT-qPCR the GST isoenzyme expression profiles in lateral ventricle choroid plexus, fourth ventricle choroid plexus, and cortical tissue at three developmental stages, and compared it to the isoenzyme profile in liver. Two preparations each of brain cortical microvessels isolated from P9 and adult rats were also analyzed (Fig. 6). We focused on isoforms involved in detoxification processes, namely GST $\pi$ 1 and the isoforms belonging to the  $\mu$  and  $\alpha$  subfamilies. Differences in  $y$ -scale values between graphs provide an approximation of the respective abundance of the various gene products in the samples. Glutathione-S-transferase isoenzymes were expressed at higher levels in the choroidal tissue forming the blood–CSF barrier than in the microvessels forming the blood–brain barrier. Levels of GST $\mu$  isoform mRNAs increased during development in liver, while in choroid plexuses these isoforms were expressed at a higher or similar level in P2 animals compared with adults.

GST $\mu$ 1 and GST $\mu$ 2 RNAs were the most abundant  $\mu$ -isoform transcripts in the choroid plexuses. At P2, the expression levels of both genes in this tissue exceeded by far those measured in the liver, especially in lateral ventricle choroid plexuses ( $p < 0.001$ ). The choroidal expression of GST $\mu$ 1 and GST $\mu$ 2 was also higher than in the cerebral tissue ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$  for lateral and fourth ventricle choroid plexuses, respectively). This was particularly striking for GST $\mu$ 2, whose messenger was barely detected in the cerebral parenchyma.

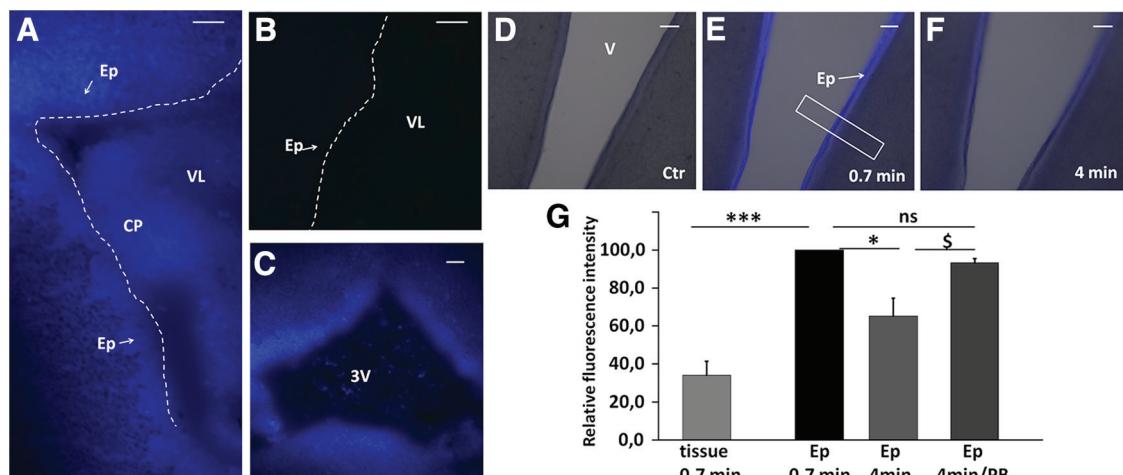
These data were confirmed by Western blot analysis using an antibody recognizing both  $\mu$ 1 and  $\mu$ 2 isoforms (Fig. 7A). The  $\mu$ 5 isoform displayed a differential level of expression between lateral and fourth ventricle choroid plexuses (Fig. 6) that was not reflected at the protein level (Fig. 7B). Both choroidal tissues showed high protein content by Western blot compared with the cerebral cortex and the liver. High levels of GST $\alpha$ 1 expression were detected in the liver, but not in the different brain tissues. In contrast, similar expression levels were observed for GST $\alpha$ 3 in choroid plexuses and liver (Fig. 6;  $p \leq 0.05$ ). These levels increased with age and largely exceeded those measured in cortex. This tissue-specific pattern was confirmed by Western blot (Fig. 7C). The expression of GST $\alpha$ 4 did not vary to a great extent among tissues or with age. Finally, the choroid plexuses and the cortex displayed higher amounts of GST $\pi$ 1 transcripts than liver at all developmental stages ( $p \leq 0.05$ ), the levels in brain tissues being twofold higher in developing animals compared with adults (Fig. 6). The high choroidal expression relative to the liver was also observed by Western blot (Fig. 7D). In summary, the high conjugation activity measured during postnatal development in choroid plexuses compared with the cerebral cortex (Fig. 1) should be mainly catalyzed by the isoforms GST $\mu$ 1, GST $\mu$ 2, GST $\alpha$ 3, and possibly GST $\pi$ 1.

To assess the GST isoenzyme profile in the CSF–brain interface, ependymal cells were isolated by laser microdissection from the lateral ventricle wall at three developmental stages (Fig. 8A), and their mRNA was extracted and analyzed by RT-qPCR. The data were compared with those obtained from laser-microdissected adjacent neuropil (Fig. 8B). In the ependyma, all  $\mu$ -isoforms were expressed at P2 at levels as high or higher than those measured at later stages (Fig. 8C). The most abundant mRNAs were found for GST $\mu$ 1 and GST $\mu$ 5. Their expression level was 11 and 12 times higher in the ependyma than in the adjacent neuropil. GST $\alpha$ 3 was also expressed at higher levels in ependyma than in the adjacent neuropil, its expression increasing with age in both tissues. GST $\pi$ 1 expression was modest and similar between structures and developmental stages. Thus, the high conjugation capacity of the ependyma, relative to the brain parenchyma that was observed at P6, appears mainly related to the GST isoforms  $\mu$ 1,  $\mu$ 5, and possibly  $\alpha$ 3.

## Discussion

This article describes a GSH-dependent metabolic pathway that is especially active during early postnatal development, and by which the blood–CSF barrier prevents harmful compounds from circulating through the CSF–brain system. The GST activities measured in tissue homogenates at different developmental stages indicate that during the postnatal period the GSH conjugation capacity of the choroid plexuses is especially high compared with that of the cerebral tissue. It is also higher than the activity measured at the same age in the liver, which is the reference organ for detoxification processes (Gundert-Remy et al., 2014). This finding was supported by RT-qPCR and Western blot data showing the elevated expression of multiple GST isoforms in





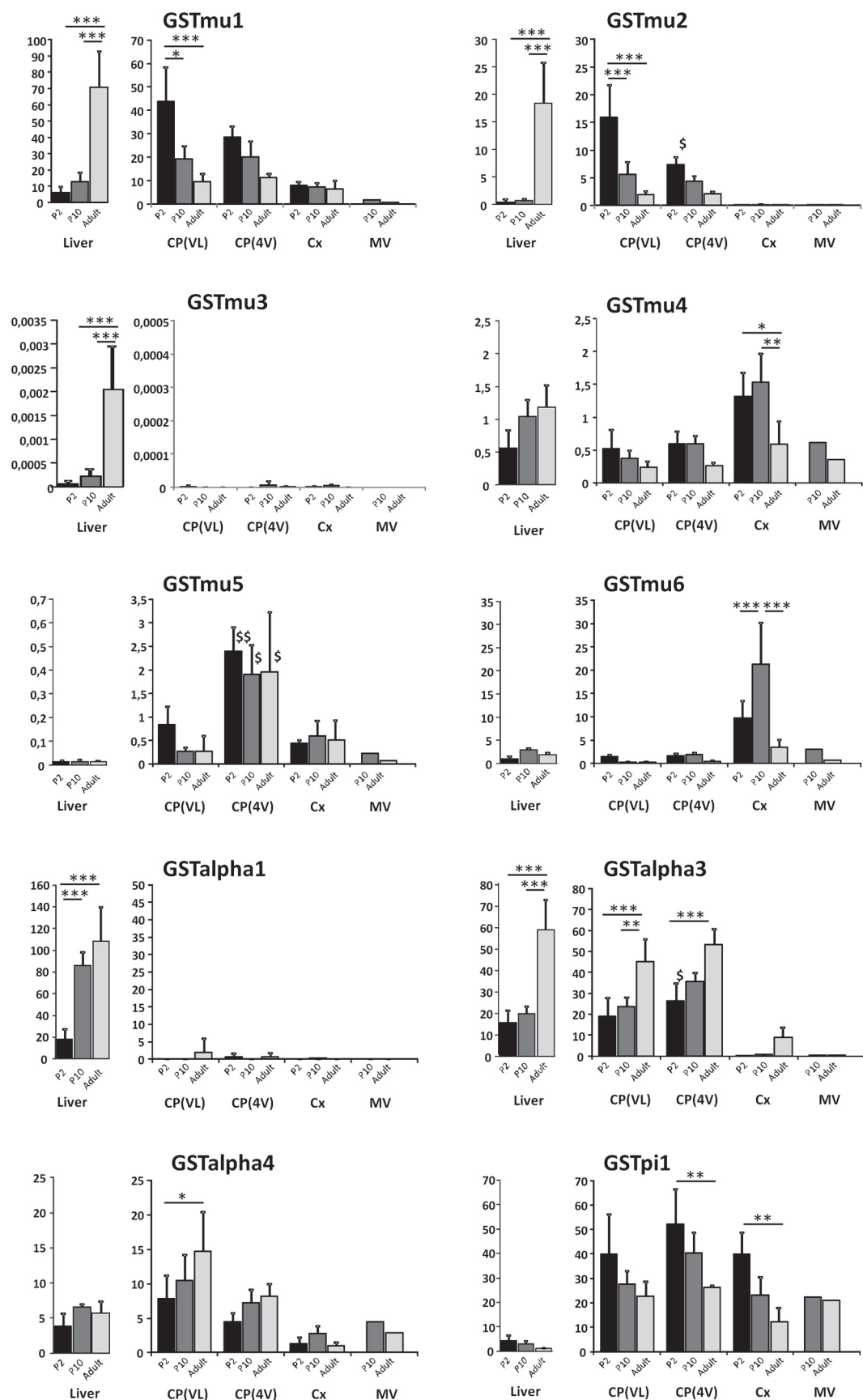
**Figure 5.** Conjugation to glutathione in the ependyma. **A–C**, Intracerebroventricular injection of MCB induced a rapid and strong fluorescence signal in the ependyma, reflecting GS-MCB production in these cells. In the lateral ventricle close to the site of injection, the signal was seen in both the ependyma and choroid plexus (**A**). The contralateral ventricle was used as a negative control (**B**). The ependyma of the third ventricle was also labeled within 1 min following MCB injection (**C**). **D–F**, Freshly prepared ependyma-containing brain slices also generated GSH conjugates upon addition of MCB to the medium. **D** represents the initial image before MCB addition. The fluorescent metabolite GS-MCB was rapidly produced at a higher level in the ependyma than in the adjacent brain tissue (**E**). The concentration of GS-MCB in ependyma decreased over time (**F**). **G**, Relative quantification of fluorescence intensity recorded in the ependyma and adjacent brain tissue in the presence or absence of 2.5 mM probenecid. Data are expressed as percentage values of the signal measured in ependyma in the same slice 0.7 min after MCB addition; data are the mean  $\pm$  SEM ( $n = 6$ ). The box in **E** shows a typical area from which a fluorescent profile was obtained and analyzed (see Materials and Methods). \* $p < 0.05$  and \*\*\* $p < 0.001$ , statistically different, paired  $t$  test for unequal variance.  $^{\S}p < 0.05$ , statistically different, one-tailed  $t$  test for unequal variance. CP, choroid plexus; Ep, Ependymal layer; VL, lateral ventricle; 3V, third ventricle; PB, probenecid. Scale bars: **A–C**, 100  $\mu$ m; **D–F**, 50  $\mu$ m.

**Table 2. Inhibition of the choroidal glutathione S-transferase activity by environmental chemicals and therapeutic drugs**

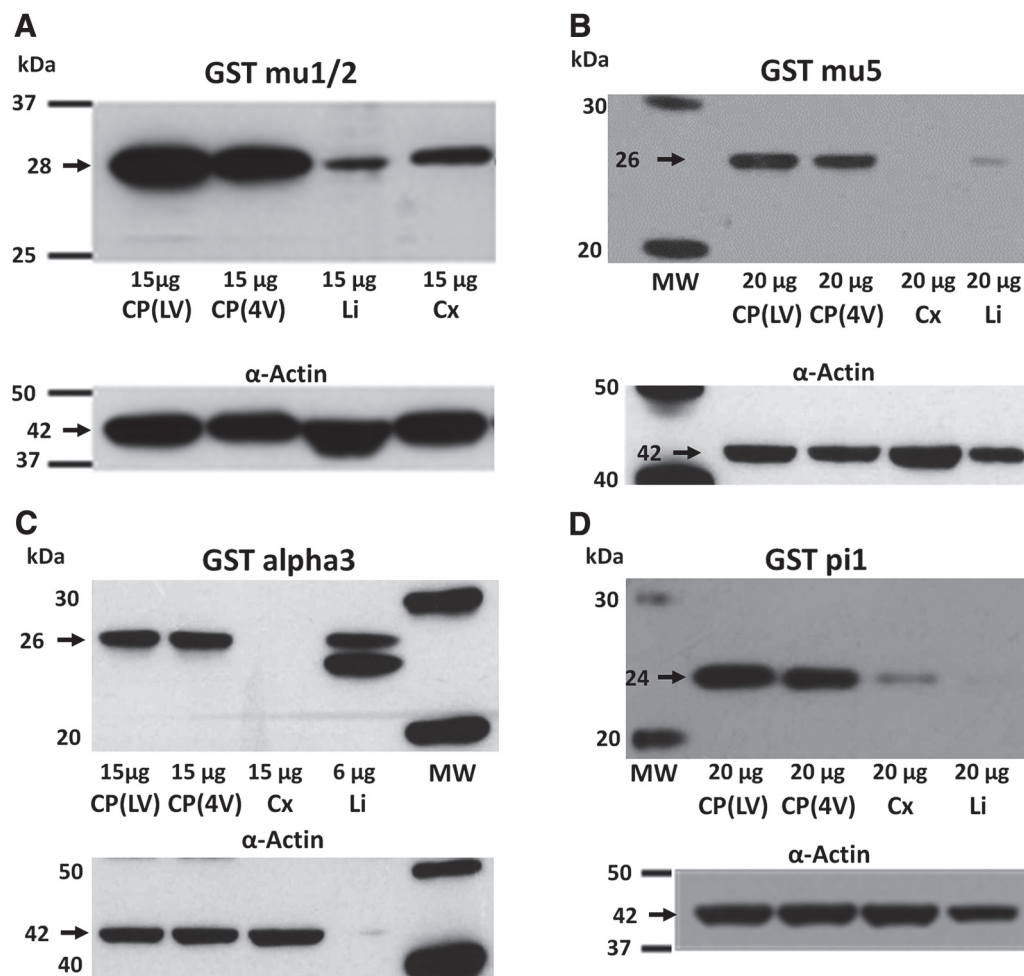
Potential substrate	Potential substrate concentration ( $\mu$ M)	Reference substrate concentration CDNB ( $\mu$ M)	Origin of choroid plexus	Inhibition (%)
Ethacrynic acid	5	200	4V	91.7 $\pm$ 1.5
			LV	81.2 $\pm$ 4.9
Bromosulphthalein	40	200	4V	72.0 $\pm$ 3.5
			LV	73.3 $\pm$ 3.8
Menadione	80	200	4V	41.2 $\pm$ 7.4
			LV	50.0 $\pm$ 19.5
MCB	200	200	4V	77.7 $\pm$ 1.5
			LV	82.7 $\pm$ 2.1
Chlorambucil	200	200	4V	83.5 $\pm$ 3.8
			LV	84.6 $\pm$ 2.7
Benzyl-isothiocyanate	500	200	4V	84.7 $\pm$ 3.2
			LV	79.5 $\pm$ 6.7
Sulforaphane	200	50	4V	26.7 $\pm$ 5.5
			LV	19.5 $\pm$ 6.2
Trans-4-phenyl-3-buten-2-one	500	50	4V	58.1 $\pm$ 7.0
			LV	53.5 $\pm$ 6.9
Acrolein	500	50	4V	53.4 $\pm$ 10.1
			LV	48.4 $\pm$ 10.3
Cisplatin	500	50	4V	41.5 $\pm$ 9.3
			LV	27.7 $\pm$ 10.3

The potential substrates include diuretic, anticancer, or diagnostic drugs (ethacrynic acid, bromosulphthalein, chlorambucil, cisplatin); dietary supplements and flavoring agents (menadione, trans-4-phenyl-3-buten-2-one); phytochemicals (benzyl-isothiocyanate, sulforaphane); or environmental pollutants (acrolein, also a product of lipid peroxidation). The competition was tested using the multispecific GST substrate CDNB as a reference substrate in both lateral ventricle and fourth ventricle choroid plexuses. Data, expressed as percentages of activity inhibition, are mean values  $\pm$  SD ( $n = 3–4$  from multiple CP pools). Owing to the limited choroidal material available per litter, they were generated for only one efficient competing concentration. The reference substrate concentration was typically 200  $\mu$ M. When a low inhibition was observed, CDNB was tested at a lower concentration to increase the inhibitory action of the compound. The average specific activities measured in lateral ventricle choroid plexus tissue in the absence of inhibitors were  $96 \pm 22$  and  $54 \pm 10$  nmol/min/mg of proteins toward 200 and 50  $\mu$ M CDNB, respectively. The same activities measured in fourth ventricle choroid plexus tissue were  $87 \pm 15$  and  $48 \pm 10$  nmol/min/mg of proteins (Data are the mean  $\pm$  SD of three different batches).

choroid plexus compared with cortex and liver during postnatal development. Live imaging of the metabolite formation in isolated choroid plexus illustrated the early functionality of the GST-mediated detoxifying pathway. Using a functional GSH conjugation knock-down strategy resulting in a selective and extensive GSH depletion in choroid plexuses, we showed that the high conjugation capacity of this interface translates into an efficient metabolic blood–CSF barrier, preventing the penetration and accumulation of GST substrates into the CSF during early postnatal development. Assuming that CDNB plasma concentration increased linearly from 0 to 500  $\mu$ M over the 5 min perfusion in P3 animals in the present study, the influx permeability constant  $K_{in\ csf}$  for CDNB calculated as in the study by Gherzi-Egea et al. (2015) would be  $0.3 \times 10^{-3}$ /min in control pups. Sucrose, used as a polar marker of the integrity of the blood–CSF barrier, has  $K_{in\ csf}$  values of  $2.9 \times 10^{-3}$ /min in P2 rats and  $2.6 \times 10^{-3}$ /min in P9 rats (Gherzi-Egea et al., 2015). The permeability of the blood–CSF barrier to the lipophilic compound CDNB, even when used at a high concentration, was therefore lower than that of cell membrane-nonpermeating molecules in control animals. Choroidal GSH depletion increased CDNB permeability 30 times, without affecting the barrier integrity. These findings demonstrate the great efficacy with which the choroidal enzymatic barrier pathway reduces the blood-to-CSF permeability of lipophilic molecules. The enzymatic mechanism is further coupled to the polarized excretion of the metabolites at the basolateral membrane of the epithelium for their subsequent elimination through the choroidal blood stream. The small fraction of the detoxified polar metabolite that is effluxed at the apical membrane could be further eliminated from the brain by the CSF bulk flow. Glutathione S-transferase activity in choroid plexuses in the developing human brain is as high or higher than the choroidal activity in newborn rats, and is also several fold higher than in the human neuropil (Gherzi-Egea et al., 2006). The potent enzymatic blood–CSF barrier we demonstrated in rat should also be efficient in the human neonate brain.



**Figure 6.** Developmental profiles of glutathione S-transferase transcript levels in choroid plexuses, cerebral cortex, cerebral microvessels, and liver in the rat. RT-qPCR was performed in tissues sampled at three developmental stages. For each isoenzyme gene, the right panel shows data obtained for cerebral structures, and the left panel shows liver data. The results, expressed relative to the bacterial AraB gene added as an external standard, are shown as the mean  $\pm$  SD,  $n = 4$ , except for the microvessels, for which values represent the mean (Figure legend continues.)



**Figure 7.** Western blot analysis of several GST isoforms in choroid plexus isolated from the lateral and fourth ventricles of the developing rat. Tissue was isolated from 2 P2 (**A**, **C**, **D**) and P9 (**B**) animals. **A**, The GST $\mu$ 1/2 isoenzymes are expressed at a higher level in choroid plexuses than in the cerebral cortex and liver. **B**, Both types of choroid plexuses display similar levels of the GST $\mu$ 5 protein, which are higher than in the cerebral cortex and liver. **C**, The GST $\alpha$ 3 protein is abundant in both types of choroid plexuses relative to the cortical neuropil. **D**, The GST $\pi$ 1 isoenzyme is highly enriched in the choroid plexuses compared with the liver and is also more abundant than in the cerebral cortex. All analyses were repeated on two different sets of samples. CP(LV) and CP(4V), choroid plexuses from the lateral and fourth ventricles, respectively; Cx, Cerebral cortex; Li, liver; MW, molecular weight markers.

During the perinatal period, the brain tissue is still poorly vascularized (Caley and Maxwell, 1970; Saunders et al., 2012), and the choroid plexuses represent a major gate of entry into the CNS. The CSF represents 20% of the cranial cavity volume in P2 rats (Gherzi-Egea et al., 2015). It is considered to play a pivotal role in the delivery of multiple guidance molecules and growth factors to brain structures for their development and maturation (Redzic et al., 2005; Lehtinen et al., 2013). Several of these trophic

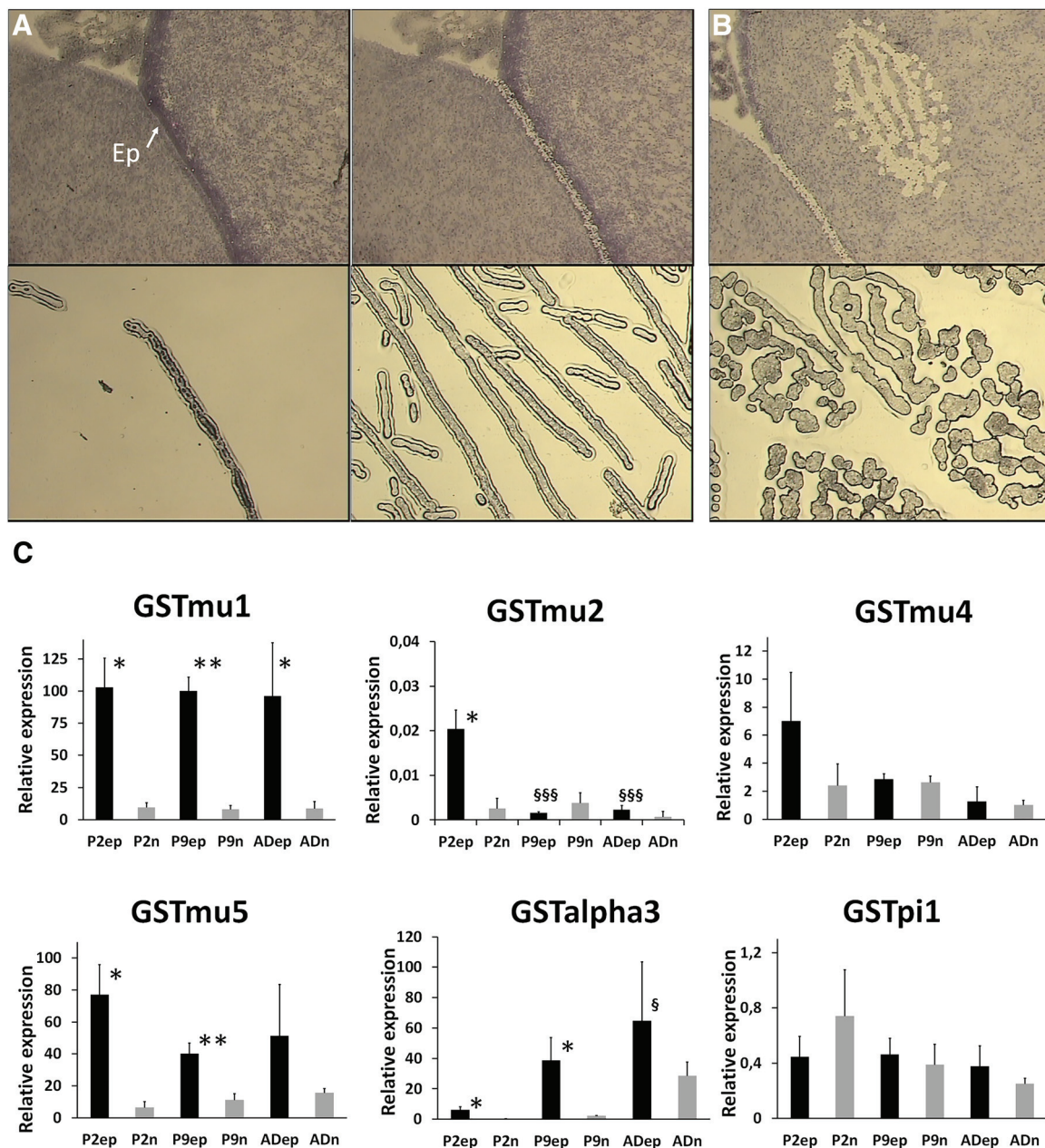
factors are secreted into the CSF by the choroid plexuses, which grow and mature early during the embryonic period (Dziegielewska et al., 2001; Johansson et al., 2013; Lehtinen et al., 2013). By means of their potent enzymatic barrier activity, the plexuses will prevent a similar intracerebral distribution of deleterious electrophilic endobiotics/xenobiotics. They will thereby fulfill a crucial neuro-protective function during development, at a time when the liver is still immature in its xenobiotic metabolism activity (Coughtrie, 2015; Fig. 1).

The GSTs form a multigenic family whose members display different, yet partially overlapping, substrate specificities. Conjugation of CDNB in choroid plexuses was partially or completely inhibited in the presence of various chemicals. Published catalytic efficiency or affinity data showed that some of these molecules are preferred substrates for specific GST isozymes. For instance, bromosulphophthalein and trans-4-phenyl-3-buten-2-one are preferred substrates for rodent GST $\mu$  isoforms (Hayes and Pulford, 1995; Sano et al., 2002). Cisplatin is a preferred substrate for GST $\pi$ 1 and ethacrynic acid for both GST $\pi$ 1 and  $\alpha$ 4 (Hayes and Pulford, 1995; Nagar et al., 2015). Both ethacrynic acid and its GSH conjugate also inhibit various other rat GSTs, in particular  $\mu$ -isoforms, with IC<sub>50</sub> values <5  $\mu$ M (Ploemen et al., 1990). Data

←

(Figure legend continued.) of two preparations. Gene expression levels did not differ by >44% between the two age-matched microvessel preparations or were both low (<0.3). The results are expressed as arbitrary units and are all normalized to the expression level found for GST $\mu$ 1 in one sample of liver obtained from an adult animal and set arbitrarily at 100 (see Materials and Methods; for details on calculations, see Kratzer et al., 2013). \* $p$  < 0.05, \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001, statistical significance of differences in expression levels between developmental stages, analyzed by one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple-comparison test. <sup>2</sup> $p$  < 0.05 and <sup>55</sup> $p$  < 0.01, statistical significance of differences in expression levels between age-matched choroid plexuses of the lateral and fourth ventricle, two-tailed paired Student's  $t$  test. For clarity, other relevant statistical significances, assessed by one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple-comparison test are stated in the Results section. CP(LV) and CP(4V), choroid plexuses from the lateral and fourth ventricles, respectively; Cx, Cerebral cortex; MV, cerebral microvessels.





**Figure 8.** Glutathione *S*-transferase transcript levels in ependymal cells and adjacent neuropil during postnatal development. **A**, Top, An example of a tissue section before and after laser microdissection of the ependyma. The lower sections show the ependyma microdissected from the tissue and a preparation of pooled microdissected ependyma. **B**, The two panels show the area of adjacent neuropil analyzed and the microdissected tissue obtained. **C**, Transcript levels of selected GST isoenzymes at three developmental stages. The results, expressed relative to the bacterial *AraB* gene added as an external standard, are shown as the mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . The results are expressed as arbitrary units and are all normalized to the expression level found for GST $\mu$ 1 in one sample of ependyma obtained from P2 animals, and set arbitrarily at 100. GST $\alpha$ 1, GST $\alpha$ 4, and GST $\mu$ 6 were not detected in microdissected samples. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ , statistical significance of the difference in expression levels between the ependyma and the adjacent neuropil, one-tailed paired Student's *t* test.  $^{\S}p < 0.05$  and  $^{\S\S}p < 0.001$ , statistical significance of the differences in expression levels in P9 and adult animals compared with P2 animals in a given tissue, one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple-comparison test. Ep, Ependyma; P2ep and P2n, ependyma and adjacent neuropil from P2 rat; P9ep and P9n, ependyma and adjacent neuropil from P9 rat; ADep and ADn, ependyma and adjacent neuropil from adult rat.

generated with human enzymes showed that acrolein is a preferred substrate for GST  $\pi$  while benzyl-isothiocyanate is metabolized by both  $\mu$ 1 and  $\pi$ 1 isoforms (Berhane and Mannervik, 1990; Kolm et al., 1995). The pattern of inhibition produced by this large spectrum of molecules toward the multispecific GST substrate CDNB indicates that multiple isoenzymes of GSTs are significantly active in the choroid plexuses during the early postnatal period in rat. This was corroborated by the high levels of expression in the developing choroid plexus of various isoenzymes belonging to different GST classes, namely GST $\mu$ 1, GST $\mu$ 2,

GST $\alpha$ 3, GST $\alpha$ 4, and GST $\pi$ 1. This unusually large pattern of isoenzymes is reminiscent of the adult liver GST load. For all compounds tested, differences in the extent of GST inhibition between lateral ad fourth ventricle choroid plexuses were minor, indicating that the forebrain and hindbrain blood–CSF interfaces display a similar broad spectrum of xenobiotic detoxification. The competitive inhibition study also showed that choroid plexuses metabolize a large range of structurally unrelated chemicals, including different drugs; cytotoxic, carcinogenic, or genotoxic electrophilic compounds issued from oxidative insults; environ-

mental pollutants; or food additives (Table 2 legend). The blood–CSF enzymatic barrier should therefore be essential to prevent chemically induced abnormal neural development and reduce the risks of periventricular and meningeal tumors.

Intracerebroventricular injections of MCB in developing animals revealed that, like the choroidal epithelium, the ependyma displays a high conjugation capacity. *Ex vivo* conjugation experiments performed on brain slices showed that GST-mediated metabolism in the ependyma is markedly more active than in the surrounding neuropil. This indicates that the ependyma could act as a second line of defense for neural cells against electrophilic molecules that would reach the CSF. According to GST mRNA expression analysis, this protection remains active throughout development up to the adult stage. Neural stem cell niches are present in several discrete regions of the ventricular system, the subventricular zone in the lateral ventricle (Chaker et al., 2016), as well as subependymal regions of the third and fourth ventricles (Lin et al., 2015). They contribute to physiological neurogenesis and gliogenesis during brain development, and the lateral subventricular zone remains active later on in the healthy adult brain. All these niches also participate in adult brain repair following injuries such as stroke. The detoxifying functions of the ependyma may be essential to protect these regions throughout life. Astrocytes fulfill neuroprotective functions as well, especially against products of oxidative stress (Baxter and Hardingham, 2016). Because astrocyte growth and maturation occur at a late postnatal stage, it is conceivable that during the perinatal period ependymal GSTs play a major role in conjunction with choroidal enzymes in the detoxification of potentially neurotoxic lipid peroxidation products released by neural cells (Lovell et al., 2000; Hubatsch et al., 2002).

The profile of GST isoenzymes expressed in the ependyma differs from that in the choroid plexuses. Histologically, the choroidal epithelium and the ependyma share a neuroectodermal origin. Yet, the marked differential expression of GST $\mu$ 5 and GST $\mu$ 2 between these epithelial cell layers implies that they should be considered as independent interfaces with respect to their metabolic properties. The exact functional significance of this difference calls for additional investigations.

To be fully efficient, GSTs need to work in concert with cellular efflux systems that can export the metabolites out of the producing cells. In some instances, the efflux system can govern the cell sensitivity to toxicants (Paumi et al., 2001). We showed that intracellular GSH conjugates are exported by a probenecid-sensitive organic anion transporter at both the ependyma and the choroidal epithelium. The organic anion transporter Slc21a5 and the export pumps Abcc1 and Abcc4, which transport GSH conjugates, are present at the basolateral membrane of the choroidal epithelium (for review, see Gherzi-Egea et al., 2006). They likely participate in the GSH-dependent detoxification pathway in choroid plexus. The identity of the transporters involved in GSH conjugate efflux in the ependyma is more elusive, and the transporter-mediated ependymal efflux process discovered in this work opens a new field of investigation on transport mechanisms in the CSF–brain interface. Of note, the cystine/glutamate antiporter expressed in both the choroid plexus and the ependyma (Sato et al., 2002; Lee et al., 2012) should favor *de novo* GSH synthesis within these interfaces to replenish the intracellular pool of this essential cofactor.

In conclusion, the GSH-dependent metabolic detoxification capacity of the choroid plexuses and ependyma during the postnatal period identifies these structures as key actors in the protection of the developing brain, at a time when the astrocytic

network is still immature and liver xenobiotic metabolism is limited. This reveals a new facet of the means by which the brain can protect itself at a period of high vulnerability. The choroid plexus–CSF pathway is also highly significant for drug delivery into the CNS during the perinatal period (Strazielle and Gherzi-Egea, 2016). Taking into account the metabolic process highlighted in this work will be useful in understanding the mechanisms setting the cerebral bioavailability of therapeutic agents at that developmental stage, and to optimize neonatal and pediatric pharmacological treatments.

**Note Added in Proof:** The names of the authors were accidentally incorrectly listed backwards in the Early Release version published March 5, 2018. The author names have now been corrected.

## References

- Baxter PS, Hardingham GE (2016) Adaptive regulation of the brain's antioxidant defences by neurons and astrocytes. *Free Radic Biol Med* 100: 147–152. [CrossRef Medline](#)
- Berhane K, Mannervik B (1990) Inactivation of the genotoxic aldehyde acrolein by human glutathione transferases of classes alpha, mu, and pi. *Mol Pharmacol* 37:251–254. [Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Chaker Z, Codega P, Doetsch F (2016) A mosaic world: puzzles revealed by adult neural stem cell heterogeneity. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 5:640–658. [CrossRef Medline](#)
- Coughtrie MW (2015) Ontogeny of human conjugating enzymes. *Drug Metab Lett* 9:99–108. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD, Saunders NR (2001) Development of the choroid plexus. *Microsc Res Tech* 52:5–20. [CrossRef Medline](#)
- Eklund BI, Edalat M, Stenberg G, Mannervik B (2002) Screening for recombinant glutathione transferases active with monochlorobimane. *Anal Biochem* 309:102–108. [CrossRef Medline](#)
- Favrais G, van de Looij Y, Fleiss B, Ramanantsoa N, Bonnin P, Stoltenburg-Didinger G, Lacaud A, Saliba E, Dammann O, Gallego J, Sizonenko S, Hagberg H, Lelièvre V, Gressens P (2011) Systemic inflammation disrupts the developmental program of white matter. *Ann Neurol* 70:550–565. [CrossRef Medline](#)
- Gazzini S, Strazielle N, Schmitt C, Fevre-Montange M, Ostrow JD, Tiribelli C, Gherzi-Egea JF (2008) Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCB1 and ABCG1 between blood–brain interfaces. *J Comp Neurol* 510:497–507. [CrossRef Medline](#)
- Gherzi-Egea JF, Strazielle N, Murat A, Jouvét A, Buénerd A, Belin MF (2006) Brain protection at the blood–cerebrospinal fluid interface involves a glutathione-dependent metabolic barrier mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1165–1175. [CrossRef Medline](#)
- Gherzi-Egea JF, Babikian A, Blondel S, Strazielle N (2015) Changes in the cerebrospinal fluid circulatory system of the developing rat: quantitative volumetric analysis and effect on blood–CSF permeability interpretation. *Fluids Barriers CNS* 12:8. [CrossRef Medline](#)
- Gherzi-Egea JF, Strazielle N, Catala M, Silva-Vargas V, Doetsch F, Engelhardt B (2018) Molecular anatomy and functions of the choroidal blood–cerebrospinal fluid barrier in health and disease. *Acta Neuropathol* 135: 337–361. [CrossRef Medline](#)
- Gundert-Remy U, Bernauer U, Blömeke B, Döring B, Fabian E, Goebel C, Hessel S, Jäckh C, Lampen A, Oesch F, Petzinger E, Völkel W, Roos PH (2014) Extrahepatic metabolism at the body's internal–external interfaces. *Drug Metab Rev* 46:291–324. [CrossRef Medline](#)
- Hayes JD, Pulford DJ (1995) The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30: 445–600. [CrossRef Medline](#)
- Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR (2005) Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:51–88. [CrossRef Medline](#)
- Hubatsch I, Mannervik B, Gao L, Roberts LJ, Chen Y, Morrow JD (2002)

- The cyclopentenone product of lipid peroxidation, 15-A(2t)-isoprostane (8-isoprostaglandin A(2)), is efficiently conjugated with glutathione by human and rat glutathione transferase A4–4. *Chem Res Toxicol* 15: 1114–1118. [CrossRef Medline](#)
- Johansson PA, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Liddelow SA, Potter AM, Stolp HB, Saunders NR (2006) Blood–CSF barrier function in the rat embryo. *Eur J Neurosci* 24:65–76. [CrossRef Medline](#)
- Johansson PA, Irmeler M, Acampora D, Beckers J, Simeone A, Götz M (2013) The transcription factor Otx2 regulates choroid plexus development and function. *Development* 140:1055–1066. [CrossRef Medline](#)
- Kolm RH, Danielson UH, Zhang Y, Talalay P, Mannervik B (1995) Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. *Biochem J* 311:453–459. [CrossRef Medline](#)
- 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. *Histochem Cell Biol* 138:861–879. [CrossRef Medline](#)
- Kratzer I, Liddelow 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 Barriers CNS* 10:25. [CrossRef Medline](#)
- Lee A, Anderson AR, Rayfield AJ, Stevens MG, Poronnik P, Meabon JS, Cook DG, Pow DV (2012) Localisation of novel forms of glutamate transporters and the cystine–glutamate antiporter in the choroid plexus: implications for CSF glutamate homeostasis. *J Chem Neuroanat* 43:64–75. [CrossRef Medline](#)
- Lehtinen MK, Björnsson CS, Dymecki SM, Gilbertson RJ, Holtzman DM, Monuki ES (2013) The choroid plexus and cerebrospinal fluid: emerging roles in development, disease, and therapy. *J Neurosci* 33:17553–17559. [CrossRef Medline](#)
- Lin R, Cai J, Nathan C, Wei X, Schleidt S, Rosenwasser R, Iacovitti L (2015) Neurogenesis is enhanced by stroke in multiple new stem cell niches along the ventricular system at sites of high BBB permeability. *Neurobiol Dis* 74:229–239. [CrossRef Medline](#)
- Lovell MA, Xie C, Markesbery WR (2000) Acrolein, a product of lipid peroxidation, inhibits glucose and glutamate uptake in primary neuronal cultures. *Free Radic Biol Med* 29:714–720. [CrossRef Medline](#)
- Nagar R, Khan AR, Poonia A, Mishra PK, Singh S (2015) Metabolism of cisplatin in the organs of *rattus norvegicus*: role of glutathione S-transferase P1. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 40:45–51. [CrossRef Medline](#)
- Neuwelt E, Abbott NJ, Abrey L, Banks WA, Blakley B, Davis T, Engelhardt B, Grammas P, Nedergaard M, Nutt J, Pardridge W, Rosenberg GA, Smith Q, Drewes LR (2008) Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol* 7:84–96. [CrossRef Medline](#)
- Paumi CM, Ledford BG, Smitherman PK, Townsend AJ, Morrow CS (2001) Role of multidrug resistance protein 1 (MRP1) and glutathione S-transferase A1–1 in alkylating agent resistance. kinetics of glutathione conjugate formation and efflux govern differential cellular sensitivity to chlorambucil versus melphalan toxicity. *J Biol Chem* 276:7952–7956. [CrossRef Medline](#)
- Peterson GL (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346–356. [CrossRef Medline](#)
- Ploemen JH, van Ommen B, van Bladeren PJ (1990) Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate. *Biochem Pharmacol* 40:1631–1635. [CrossRef Medline](#)
- Redzic ZB, Preston JE, Duncan JA, Chodobski A, Szymdynger-Chodobska J (2005) The choroid plexus–cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr Top Dev Biol* 71:1–52. [CrossRef Medline](#)
- Sano K, Totsuka Y, Ikegami Y, Uesugi T (2002) Metabolism of sulphobromophthalein II. species differences between rats, guinea-pigs and rabbits. *J Pharm Pharmacol* 54:231–239. [CrossRef Medline](#)
- Sato H, Tamba M, Okuno S, Sato K, Keino-Masu K, Masu M, Bannai S (2002) Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)<sup>−</sup>, in the mouse brain. *J Neurosci* 22:8028–8033. [Medline](#)
- Saunders NR, Liddelow SA, Dziegielewska KM (2012) Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol* 3:46. [CrossRef Medline](#)
- 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. [CrossRef Medline](#)
- 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. [Medline](#)
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF (2013) Physiology of blood–brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Mol Pharm* 10:1473–1491. [CrossRef Medline](#)
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF (2015) Efflux transporters in blood–brain interfaces of the developing brain. *Front Neurosci* 9:21. [CrossRef Medline](#)
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF (2016) Potential pathways for CNS drug delivery across the blood–cerebrospinal fluid barrier. *Curr Pharm Des* 22: 5463–5476. [CrossRef Medline](#)
- Strazielle N, Preston JE (2003) Transport across the choroid plexuses in vivo and in vitro. *Methods Mol Med* 89:291–304. [CrossRef Medline](#)
- Strazielle N, Belin MF, Ghersi-Egea JF (2003) Choroid plexus controls brain availability of anti-HIV nucleoside analogs via pharmacologically inhibitable organic anion transporters. *Aids* 17:1473–1485. [CrossRef Medline](#)
- Strazielle N, Khuth ST, Ghersi-Egea JF (2004) Detoxification systems, passive and specific transport for drugs at the blood–CSF barrier in normal and pathological situations. *Adv Drug Deliv Rev* 56:1717–1740. [CrossRef Medline](#)

## 2. Autres articles

**Gherzi-Egea, J.-F., Saudrais, E., & Strazielle, N.** (2018). “Barriers to drug distribution into the perinatal and postnatal brain.” *Pharmaceutical Research*, 35(84), 1–10.

**Koehn L., Dziegielewska K., Mollgard K., Saudrais E., Strazielle N., Gherzi-Egea J.-F., Saunders N., Habgood M.** “Developmental differences in the expression of ABC transporters at rat brain interfaces following chronic xenobiotic exposure.” *En révision, Scientific Reports*.





# Barriers to Drug Distribution into the Perinatal and Postnatal Brain

Jean-François Gherzi-Egea<sup>1,2</sup>  • Elodie Saudrais<sup>1,2</sup> • Nathalie Strazielle<sup>1,2,3</sup>

Received: 12 November 2017 / Accepted: 21 February 2018 / Published online: 7 March 2018  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

**ABSTRACT** Drug bioavailability to the developing brain is a major concern in the treatment of neonates and infants as well as pregnant and breast-feeding women. Central adverse drug reactions can have dramatic consequences for brain development, leading to major neurological impairment. Factors setting the cerebral bioavailability of drugs include protein-unbound drug concentration in plasma, local cerebral blood flow, permeability across blood-brain interfaces, binding to neural cells, volume of cerebral fluid compartments, and cerebrospinal fluid secretion rate. Most of these factors change during development, which will affect cerebral drug concentrations. Regarding the impact of blood-brain interfaces, the blood-brain barrier located at the cerebral endothelium and the blood-cerebrospinal fluid barrier located at the choroid plexus epithelium both display a tight phenotype early on in embryos. However, the developmental regulation of some multispecific efflux transporters that also limit the entry of numerous drugs into the brain through barrier cells is expected to favor drug penetration in the neonatal brain. Finally, drug cerebral bioavailability is likely to be affected following perinatal injuries that alter blood-brain interface properties. A thorough investigation of these mechanisms is mandatory for a better risk assessment of drug treatments in

pregnant or breast-feeding women, and in neonate and pediatric patients.

**KEY WORDS** blood-brain barrier · cerebrospinal fluid · choroid plexus · development · efflux transporters

## ABBREVIATIONS

ADR	Adverse drug reaction
BBB	Blood-brain barrier
BCSFB	Blood-CSF barrier
CNS	Central nervous system
CSF	Cerebrospinal fluid

## INTRODUCTION

Drug bioavailability to the central nervous system (CNS) is a major concern in neonatal and pediatric treatments. Both the perinatal period lasting from the 28th week of gestation to one month after birth and the postnatal period covering the first few years of life in human are critical for neural cell maturation and neuronal network formation. Overexposure to pharmacologically active molecules or toxic xenobiotics, at these periods of life can impair neural cell division, migration, differentiation, and synaptogenesis. Consequences can be dramatic and include life-long neurological impairments. Hence, dosage of drugs used to treat CNS diseases in newborn and children needs careful adjustments. Using drugs to treat non-CNS diseases in this population is also challenging, because of the risk of potential central side effects.

Far too little accurate information is currently available on drug efficacy, safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic in the neonatal and pediatric population. The range of approved therapeutic molecules available to treat CNS or non-CNS diseases in neonates and children is very limited.

Guest Editor: Sara Eyal

✉ Jean-François Gherzi-Egea  
jean-francois.ghersi-egea@inserm.fr

<sup>1</sup> FLUID Team, Lyon Neurosciences Research Center, INSERM U1028 CRNS UMR 5292, Université Claude Bernard Lyon-I, 69008 Lyon, France

<sup>2</sup> Blood-Brain Interfaces Exploratory Platform BIP, Lyon Neurosciences Research Center, 69008 Lyon, France

<sup>3</sup> Brain-I, 69008 Lyon, France

Most of the drugs available on the market are not recommended for the neonatal and pediatric population, although such decisions have not been supported by scientific studies. Limitation of drug approval also bears on placental permissive drugs prescribed to pregnant women. Clinicians have a very succinct number of approved drugs to treat mother illnesses, or to prevent or treat the consequences of perinatal injuries such as hypoxia, inflammation or infection in babies.

Therefore, prescription of unlicensed or off-label medicines for those populations is very common, reaching 45 to 60% of prescribed drugs in the pediatric population in Europe, and more than 90% in the premature neonate subpopulation (1). Not surprisingly, several studies have shown that in children, the risk of developing adverse drug reactions (ADRs) is higher for off-label and unlicensed medicines than for authorized medicines (2–4). Like in adult, the risk of ADRs in children is clearly dependent on the type of medicine used (e.g. anti-cancer drugs have a high potential for ADRs) and on the number of drugs administered. Large associations induce additive risks and drug-drug interactions. This can explain why ADRs occur in 10% of hospitalized children, which are often polymedicated (2). According to prospective and retrospective studies, ADRs in the pediatric population are frequently attributed to anti-infectious, anti-epileptic, and non-steroidal anti-inflammatory drugs (2,5,6). Drugs used to treat attention deficit hyperactivity disorders, prescribed especially by physicians from North America, are also involved in ADRs in the pediatric population (5). The most frequently reported ADRs in children are skin disorders, CNS disorders, and fever, with CNS disorders amounting to 11–25% of ADRs (2,5,6). Different types of drugs are suspected of inducing neurotoxic ADRs. Retrospective studies suggested that exposition to anesthetics and sedatives during the first years of life amplifies the rate of behavioral, learning, or developmental disabilities during childhood. Anesthetic exposition concerns 3.5 to 4.5 millions of children under 36 months of age every year in the US (7). Other therapeutic drugs, which can be taken by pregnant women or breastfeeding mothers, can induce neurotoxic ADRs. These include antiepileptic drugs, antidepressants and corticosteroids (5,8). Even excipients can induce neurotoxic effects. As an example, some surfactants can inhibit the protective efflux transport capacity of the blood-brain barrier (BBB) (9).

To remedy this worrisome situation, governments encourage drug companies to provide new pediatric information by extrapolating data on efficacy from adult to children if possible, or by conducting specific pediatric studies when necessary (10,11). In 2002, the US Food and Drug Administration (FDA) published the Best Pharmaceuticals for Children Act (BPCA), which incites drug companies to conduct FDA-requested pediatric studies. In 2003, this act was reinforced by the Pediatric Research Equity Act, which permits FDA to require pediatric studies under certain circumstances. Few

years later, the European Medicines Agency (EMA) organized the Pediatric Regulation, which aims at facilitating the development and availability of medicines for the pediatric population. In particular, the EMA has conducted an important survey among health professionals to precisely define pediatric drug requirements (12). Analyzing this survey indicated that for most drugs, dose information, efficacy, safety, and pharmacokinetic studies in the pediatric population are lacking. Cerebral drug bioavailability, pharmacology and toxicity are especially poorly documented (13). The penetration of drugs into the developing CNS is set by multiples parameters, some relevant to general pharmacokinetic principles, other specific to the anatomical organization and functions of blood-brain interfaces, which change throughout brain development. Our current partial knowledge of these developmental specificities is reviewed in the next sections.

## PHARMACOKINETIC FACTORS AFFECTING CEREBRAL DRUG DELIVERY IN THE DEVELOPING BRAIN

### Plasma Drug Concentration

Plasma drug concentration over time is the first factor influencing the cerebral availability of a drug. The factors that influence drug pharmacokinetic in plasma during infancy and adulthood are different (5). For instance, gut flora changes during development, as well as gastric pH, which decreases from neutral to acidic. Transdermal and pulmonary absorptions are more efficient in young than in adult patients. Overall blood flow is reduced in younger individuals. The body water-to-body fat ratio is higher in children and this increases the distribution volume of hydrophilic drugs. The hepatic drug metabolism machinery differs between infants and adults. For instance, the expression of the important drug metabolizing cytochrome P-450 CYP3A4 is low at birth, and increases sharply during the first 3 months of life. In contrast, cytochrome P-450 CYP3A7 expression peaks shortly after birth and disappears in adulthood in most individuals. Finally, renal tubular secretion and glomerular filtration are reduced in neonates, thus affecting drug elimination. (5). All these developmental differences in absorption, biodistribution, metabolism and clearance account for differences in plasma concentration profiles between adult and newborn individuals, as illustrated for morphine in pig (14). These age-related variations greatly impede a safe extrapolation of drug plasma pharmacokinetic data from adults to younger populations in human.

In adult, the blood-brain interfaces are not permissive to proteins unless receptor-mediated transcytotic mechanisms exist. As a result, the unbound drug concentration in plasma is the driving force for drug penetration into the adult brain.



This unbound drug concentration depends on the extent of drug binding to different plasma proteins, whose respective concentrations change throughout development. For instance, fetuin concentration in plasma is higher in preterm babies than in end-of-term babies (15). Total protein concentration in plasma increases from  $5.9 \pm 0.4$  to  $7.2 \pm 0.6$  g/100 mL between birth and adulthood, and albumin concentration parallels this increase (16). These changes will affect the unbound drug fraction in plasma, hence their extent of brain penetration. It is noteworthy that, especially during prenatal development, drug-protein complexes may nevertheless reach the cerebrospinal fluid (CSF) and the brain through the choroid plexuses (see below). Finally, newborns and preterm infants present higher levels of bilirubin bound to albumin than the adult. In this young population, highly protein-bound drugs can displace bilirubin from albumin to a greater extent and cause a neurotoxic syndrome (17,18).

### Factors Related to Specific Features of Brain Physiology

The overall cerebral drug concentration is also dependent on factors pertaining to the physiology and anatomical organization of the developing brain. The brain develops within the cranial cavity in a liquid environment provided by the CSF circulation. Blood-to-brain drug transfer can take place either across the BBB located at the endothelium of the microvasculature, or across the epithelium of the choroid plexuses that forms the barrier between blood and the ventricular CSF (19) (Fig. 1). The arachnoid membrane, which is part of the meninges, forms a second barrier between blood and CSF, but is a less significant gateway for drug entry into the brain, as it is situated downstream in the CSF circulatory system. Because of this complex blood-brain interface organization, brain-specific factors influencing the distribution of drugs into this organ are multiple, and their influence differs between the developing and mature brain. A large part of our knowledge about factors that set blood-brain exchanges during development comes from experimental data gathered in particular in rodents. Because birth occurs at an earlier stage of development in rat and mouse as compared to human (20), some aspects of the neonatal period in these animal species reflect the situation of a late stage of gestation in human. This complicates the extrapolation of experimental data on blood-brain exchanges to human, but several main factors differently influencing drug delivery to the developing and adult brains can nonetheless be identified.

#### Brain Hemodynamics

The extent of penetration of highly CNS permissive drugs, i.e. drugs completely extracted from the blood during the first pass through the brain, is dependent on the local cerebral blood flow (21,22). Experimental data show that this flow is

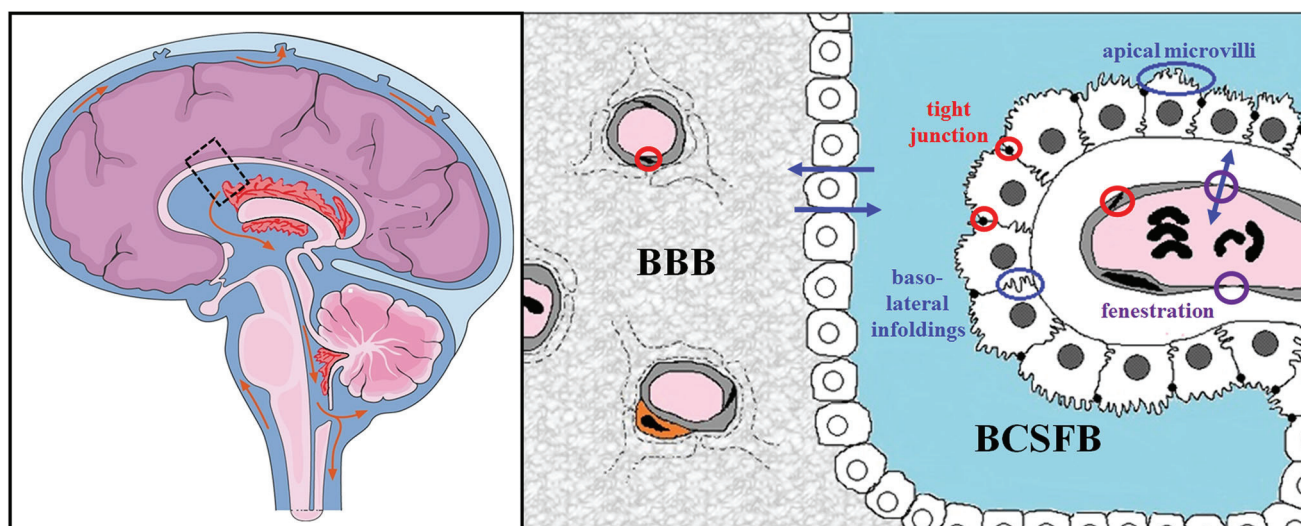
lower and more homogeneous among brain structures in the developing than the adult brain (23). The local parenchymal capillary density and the development of choroid plexus villi set the surface area available for exchange across blood-brain interfaces. In adult, the capillary density is very high, with differences between brain structures. The white matter is less vascularized than the grey matter (24). The choroid plexuses also develop a significant surface area of exchange between blood and CSF, owing to their anatomical organization in numerous villi and to the peculiar morphology of their epithelium presenting basal membrane infoldings and an extensive network of microvilli at the apical membrane (25) (Fig. 1). The density of the microvasculature increases during pre- and postnatal development. The combined effects of a decrease in neural cell density and an increase in the vascular network in the rat cortex during the first three weeks of life lead to a vessel-to-neural cells ratio that increases 23 times between birth and 21 days of age (26). In contrast, the choroid plexuses develop early in the fetal brain in mammals (27), and already represent a large surface of blood-CSF exchange at the perinatal period. In addition, choroid plexuses display the highest cerebral blood flow of all cerebral structures, and the choroid plexus-to-cortex local blood flow ratio is even higher in the developing (ratio of 8) than adult (ratio of 4–6) brain (28). Although choroid plexuses are still growing postnatally to follow overall brain growth, the relative importance of the choroidal blood-CSF barrier (BCSFB) *versus* the BBB as a gate of entry into the CNS is higher during postnatal development than in adult.

#### Permeability across Blood-Brain Interfaces

The permeability across blood-brain interfaces can vary between developmental stages. This is a determinant factor, which depends on the efficiency of tight junctions, transporters, and vesicular processes at brain barriers. This will be examined in more details in the next section.

#### Drug Binding to - and Uptake by Neural Cells

Binding and uptake processes can occur in neurons, astrocytes, oligodendrocytes and myelin sheets. They explain the apparent overall cerebral accumulation of certain drugs, but because these processes decrease the free drug concentration in the extracellular space, they diminish the efficacy of molecules acting on plasma membrane receptors (29). While the time of birth does not correspond to the exact same stage of development among species (20), the sequence and relative rate of progress of neural events that conduce to brain development and maturation is very similar (20). Myelination occurs gradually during pre- and postnatal development, and astrocyte maturation happens mostly during the postnatal period both in mouse and in human (20,30). The influence of



**Fig. 1** Schematic representation of the two major blood-brain interfaces. The left panel illustrates the flow of cerebrospinal fluid (blue) and the localization of the choroid plexuses (red) in the human brain. The right panel is a cartoon representing the different tissues of the dotted rectangle. The structural features of the blood-brain barrier (BBB) and blood-CSF barrier (BCSFB) are illustrated. The endothelial cells of the microvessels, sealed with tight junctions (red circle), form the BBB. They are in close proximity to pericytes (orange cell). Astrocytic endfeet (dotted grey cell membranes) unsheath the microvessels. These astrocytic processes appear only gradually during the peri- and postnatal stage of development. The epithelial cells of the choroid plexuses, also sealed by tight junctions, form the BCSFB. Basolateral infoldings and apical microvilli extend the surface area available for regulated exchanges between the blood and CSF. The choroidal capillaries do not display a BBB phenotype as they are fenestrated (purple circle). Modified from (72).

such developmental changes on drug binding to neural cell membranes is expected to be significant both in human and in animal models used for drug pharmacokinetic studies, but this has not been documented. Evaluating changes in unbound drug concentration in the brain extracellular space during development is further complicated by the presence of higher amounts of plasma proteins in brain fluids of developing individuals compared to adults.

#### *Dynamics of Interstitial Fluid and CSF Flows*

The overall cerebral biodisposition of drugs is greatly influenced by the three following factors: drug diffusion through the extracellular space, drug circulation along perivascular spaces, and the sink action of CSF. All three factors are evolving with age. First, the extracellular space volume changes during postnatal development. In rat, it represents about 40% of the parenchyma volume in 2- to 3-day-old animals, and decreases thereafter to reach the adult value of around 20% (26,31). Consequently, drug diffusion rates within the brain parenchymal extracellular space are likely to differ between developing and adult brain (32). Second, drug circulation along perivascular spaces in both directions (subarachnoid spaces to brain and vice versa) also depends on the progressive establishment of the adult brain vascular network. Third, the characteristics of the CSF circulation differ greatly between developing and adult brain. The CSF is secreted mainly by the choroid plexuses. It flows through the ventricles of the brain, then into the subarachnoid and cisternal spaces, before being resorbed in the venous system through the arachnoid granulations or in the lymphatics along cranial nerves

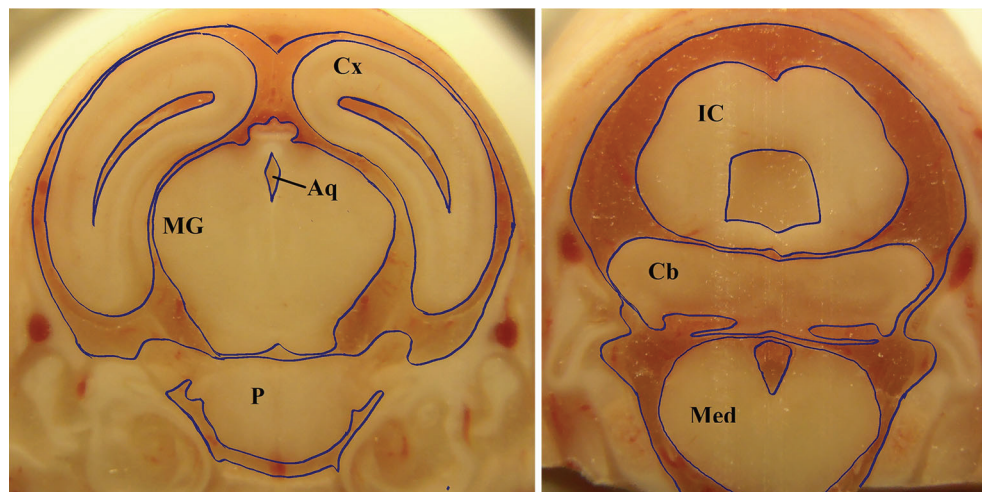
and olfactory bulbs (33,34). The ratio of CSF to brain tissue volume is much higher in the developing brain than in the adult. In rat, the volume of CSF relative to the cranial cavity is 3 times higher two days before birth than nine days after birth (35) (Fig. 2). In addition, the rate of CSF secretion by the choroid plexuses is lower in embryos and neonates than in adults (36,37, and reviewed in 38). As a correlate, CSF flow rate is low in the developing brain as compared to the adult brain (39), which should favor drug accumulation into the CSF, even if the overall CSF turnover (secretion rate as a percentage of CSF volume) does not change much during development (40). Thus, CSF could act as a large reservoir for drugs that crossed the BCSFB, and the choroid plexus-CSF system is likely to play a significant role in controlling drug concentration into the parenchyma during the perinatal and postnatal periods. As an example, morphine reaches higher concentration levels in CSF in neonatal pigs as compared to older animals, and the drug turnover in CSF is lower (14).

### **SPECIFICITIES OF BLOOD-BRAIN INTERFACE PERMEABILITY TO DRUGS DURING THE PERINATAL AND POSTNATAL PERIODS**

#### **Mechanisms Regulating Blood-Brain Interface Permeability to Drugs**

The ability of pharmacological compounds to cross blood-brain interfaces is a major factor setting their cerebral

**Fig. 2** Cutting-plane photographs of a whole-head mounted specimen illustrating the importance of CSF spaces in a 19-day-old rat fetus. The blue lines delineate fluid spaces (ventricles, subarachnoid spaces, cisterns) and the cranial cavity. Aq: aqueduct; Cb: cerebellum; Cx: cerebral cortex; IC: inferior colliculus; Med: medulla; MG: Medial geniculate complex, P: pons. Experimental protocol as described in (35).



bioavailability. In adult, as tight junctions seal both the endothelial cells that form the BBB and the choroidal epithelial cells that form the BCSFB, drug access to the brain is through the transcellular pathway. Non-specific transcytosis does not occur at the BBB. Drug entry into the brain occurs only for the free fraction of the compound, through diffusion across cell membrane, and is set by the lipophilicity and size of the drug. Overton's rule predicts blood-brain permeability to be roughly proportional to the octanol/water partition coefficient of the drug divided by the square root of its molecular weight (21). Thus, highly polar compounds, especially large ones, have a very limited access to the brain, unless they are substrates for influx transporters. The latter systems are highly specific for natural endogenous nutrients and micronutrients, and seldom accept structurally modified substrates. They are solute carrier (SLC) members, and contribute to the cerebral delivery of only a few drugs (41,42 and reviewed in 43). Examples include Slc16a1/Mct1 for valproic acid, Slc7a5/LAT-1 for antiepileptic drugs such as gabapentin, and Slc22a5/octn2 for cholinesterase inhibitors. These three transporters locate on both membrane domains of the barrier cells. By contrast, an array of multispecific efflux transporters prevent or reduce the blood-to-brain and blood-to-CSF penetration of a large range of lipophilic xenobiotics, including immunosuppressor, antiretroviral, antibiotic, antitumoral, antiepileptic, antidepressant, anti-inflammatory, antidiabetic, and psychotropic agents (for bibliographic references, see 19). These transporters belong to the ATP Binding Cassette (ABC) transporter families ABCC, ABCB, ABCG, and to the SLC21/SLCO (organic anion transport polypeptide) and SLC22, SLC15, SLC29, and SLC47 subfamilies. These various transport proteins can also increase the elimination of their drug substrates from the brain/CSF spaces (reviewed in 19). Of note, a number of these therapeutic agents are prescribed to pregnant women and may pass the placental barrier (44). The main drug efflux transporters include

ABCB1 (p-glycoprotein), ABCG2 (breast cancer resistant protein), ABCC1 and 4 (multidrug resistance associated protein), SLC22A8 (organic anion transporter 3), and SLCOs. At the choroid plexus, an additional enzymatic barrier exists, that metabolizes selected xenobiotics (45). Recent drug development has introduced biotherapeutic macromolecules such as antibodies. The brain bioavailability of immunoglobulins, which from their size and polar nature are not prone to diffuse across cellular membranes, is further limited by an efflux mechanism located at both the BBB and BCSFB, likely involving the FcRn receptor (19,46).

### Transport Properties of Blood-Brain Interfaces during the Perinatal and Postnatal Period

For decades, blood-brain interfaces of the developing brain have been considered immature and “leaky”. This immaturity has been revisited, and it is now acknowledged that tight junctions form precociously. It occurs both in the nascent cerebral microvessels under the influence of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway and of recruited pericytes, and in the choroidal epithelium by a yet unknown mechanism (reviewed in 19). In human, claudin 5, a landmark of BBB tight junctions, already seals endothelial cells of brain vessels at 5–7 weeks post conception (47). Similarly, claudin 5, ZO-1, and occludin form tight junctions in cerebral endothelial cells in 12-day-old rat embryos (30). Claudin 1, a landmark of BCSFB tight junctions, is present at cell-cell contact between choroidal epithelial cells as early as week 8 of gestation in human, and probably sooner (48). These structural features efficiently seal the paracellular pathway in both barriers, as demonstrated experimentally in rat and opossum fetuses (49,50). Non-specific vesicular transport across cerebral endothelial cells decreases rapidly during fetal development, under the influence of pericytes (30,51). Therefore, lipophilicity and size are key factors setting drug diffusion through blood-brain interfaces in younger



individuals as in adult. As an example, in pig, a precocial species whose brain developmental pattern closely mimics that of primates (52), the transfer constant for mannitol across the BBB in newborn was found similar to that measured in adult (53).

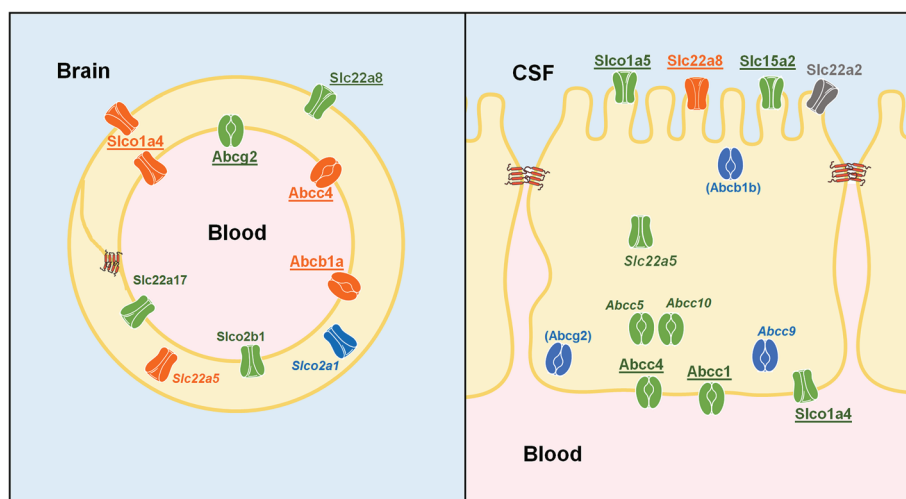
There are however substantial differences in the expression of drug influx and efflux transporters at the BBB and BCSFB between the developing and adult brain. Developmental profiles of expression have not been thoroughly investigated for all transporters. Among the few influx transporters mediating drug entry into the brain (see above), MCT1 is expressed at a higher level at the BBB in neonatal rat than in adult (54). Owing to their more potent impact on drug delivery to the brain, efflux transporters deserve more attention. The main findings collected from the literature have been analyzed in details in (55), and are summarized in Fig. 3. Three main conclusions provided by these data are as follows.

First, the developmental pattern of expression of efflux transporter genes is more stable in the choroid plexuses than in the BBB. In the latter barrier, several efflux carriers are expressed at substantially lower levels during development compared to adulthood. In particular, although ABCB1 and ABCC4 expression increases in cerebral capillaries during preterm development, a period during which the placental barrier efficiency decreases, it remains low around birth as compared to the adult (reviewed in 55). This suggests that the developing brain will be more sensitive to drugs that are substrates for these efflux carriers. A quantitative analysis of ABCB1 protein level in capillaries isolated from 9-day-old and adult rats revealed a 5-fold difference between the two stages (56). Assuming the conservation across species of the sequence

and progress of neural events setting brain development and maturation (20) can be extended to those of blood-brain barrier functions, these rodent data predict that infants would have a lower BBB-associated ABCB1 protein level than the adult human. This prediction is in line with immunohistochemical and PET data collected in human and non-human primates (reviewed in 55). The time of ABCB1 induction and the lack of pericyte influence on this process suggest that the upregulation of this transporter during development results from increasing astrocyte endfeet differentiation and influence on the BBB (30,57).

Second, several efflux transporters are expressed at higher levels during development than in adulthood. This occurs mainly in choroid plexus. Thus, like for influx carriers (58), the developmental regulation of efflux transporters seems to relate to stage-specific developmental needs rather than reflect an overall immaturity of the barriers, at least at the BCSFB site.

Third, species differences in transporter expression exist and need to be taken into account when evaluating drug transport to the developing brain. In the human BBB, ABCG2 seems to be expressed at higher levels than ABCB1, while the opposite is true in the mouse (59). Furthermore, while ABCB1 expression level increases largely between neonates and adults, ABCG2 expression remains steady throughout development in the cerebral endothelium of all species. These two transporters have partially overlapping substrate specificities. Thus, variations in the BBB permeability to drugs that are substrates of both ABC proteins between developing and adult individuals will depend on the respective affinity of these drugs for the two transporters, and may be less



**Fig. 3** Drug efflux transporters at the blood–brain (left) and blood–cerebrospinal fluid (right) barriers in adult and during development. Both primary ATP-dependent transporters (Abc) and other solute carriers (Slc) identified at the interfaces are shown. The major transporters are underlined. Some transporters whose cell membrane location has not been formally established are named in *italics*. The expression or function of the transporters between parentheses is debated. Transporters whose expression decreases from the perinatal to the adult stage are noted in blue. Transporters whose expression is stable during development are noted in green. Transporters whose expression increases from the perinatal to the adult stage are noted in orange. Transporters whose developmental profile is unknown appear in grey. Based on a detailed analysis of the literature described in (55).

important in human than in rodents. Finally, the drug metabolism capacity of the choroid plexus tissue has not been extensively investigated in the developing brain in human. Partial findings, mainly obtained in rodents, suggest that these mechanisms are functional in choroid plexuses during the perinatal period (60).

The downregulation of non-specific intracellular vesicular transport through cerebral endothelial cells and the molecular organization of efficient interendothelial tight junctions occur rapidly after formation of neovessels in embryos, as a result of pericyte-mediated signaling (51). This prevents albumin to enter the brain through the BBB (61). Yet plasma proteins are found in the brain, especially in the CSF, explaining why the barriers were previously considered as immature and leaky during development. The level of plasma proteins in the fetal and neonatal CNS results from the low turnover of CSF at these stages, and from the presence of specific protein-transporting cells in the choroidal epithelium (reviewed in 19). It is conceivable that albumin-bound drugs can enter the CSF and brain through these transporting cells. The significance of this pathway for the entry of some drugs into the CNS remains to be evaluated.

Finally, new generation drugs are appearing in the clinic, or are currently under development. These include large molecular weight proteins such as antibodies, nanoparticle carriers developed for gene or enzyme therapies, engineered cells, viral capsids. Some of these new generation drugs are developed to treat brain illnesses, and mechanisms of protein or particle translocation into the brain are explored. The most promising approach appears to be through receptor-mediated transcytosis, targeting BBB and BCSFB enriched receptors such as members of the LRP family (55,62). These receptors are important for normal brain function, and may display developmental specificities to adjust the need of the maturing brain. Hence, a thorough investigation of the expression and function of these receptors throughout development is needed.

## INFLUENCE OF BLOOD-BRAIN INTERFACE ALTERATIONS ON DRUG DELIVERY TO THE DEVELOPING BRAIN

Several pathological events such as inflammation, hypoxia, hyperbilirubinemia, or exposure to environmental toxicants during the perinatal period can induce neurological adverse effects. An alteration of the integrity of blood-brain interfaces can occur during perinatal injuries, as blood-brain interfaces display structure- and stage-specific sensitivity to different stresses. First, some parts of the developing brain present a physiologically more fragile BBB. For instance, the germinal matrix is particularly prone to brain hemorrhage during perinatal development because this highly vascularized structure is

characterized by capillaries presenting a large diameter, a thin basement membrane, and few pericytes (63). Second, inflammation and infections produce complement proteins, pro-inflammatory cytokines, and endotoxins that can affect the BBB during development, in particular by modifying the expression and subcellular localization of tight junction proteins. A specific susceptibility of the BBB following exposure to endotoxin around birth has been documented. It results in protein extravasation into the white matter (64). Placental or maternal exposure to endotoxins can also alter the BBB in fetuses (65). Third, a window of increased susceptibility for hypoxic ischemic insults, stroke, and traumatic brain injury exists during the perinatal period. It induces exacerbated brain damage with more dramatic cognitive impairment when the injury occurs in the developing brain as compared to the sequelae observed in adults following the same type of injury. In these pathologies, the BBB is altered. Alterations result from the direct or indirect effects of free radical formation, excitotoxicity, upregulation of vascular endothelial growth factor, and cytokine production (reviewed in 63,66). However, whether the specific perinatal vulnerability of the brain to hypoxic-ischemic stresses including stroke translates in an exacerbated alteration of the BBB remains debated (e.g. 67,68). Overall, an alteration of the BBB integrity during perinatal injuries may increase brain vulnerability to therapeutic drugs. This remains to be documented as no effect of perinatal injuries on cerebral drug delivery has been reported so far.

Perinatal insults may alter the capacity of blood-brain interfaces to protect the brain in a more subtle way and affect mainly efflux transporter functions. Pathologic neonatal jaundice, occurring when the plasma bilirubin concentration exceeds the albumin binding capacity, induces permanent neurological sequelae. Unbound bilirubin readily crosses blood-brain interfaces and is toxic to neural cells, impairing normal brain development. Bilirubin is a substrate for ABCC1 located in the choroid plexuses. Exposure of choroid plexuses to bilirubin does not impair the tightness of the BCSFB junctions, but specifically leads to a decrease in ABCC1 protein level in the epithelial cells, thus weakening the barrier efflux properties (69). Repeated administration of antenatal glucocorticoids downregulates ABCB1 expression in the BBB during the early postnatal period (70), a phenomenon that seems exacerbated by exposure to inflammatory mediators (71). Expression levels of *Abcb1*, *Abcg2* and *Slc22a8* genes is also decreased in cerebral endothelial cells isolated from the injured brain region one day after stroke in rat neonates (68). Thus, by altering the structural and/or biochemical barrier properties of the BBB and BCSFB, various perinatal or postnatal injuries may favor drug penetration in the developing brain, and in most instances enhance the risk of ADRs.

## CONCLUSION

Both the blood-brain and the blood-CSF interfaces are efficient barriers toward the entry of polar drugs into the neonatal and postnatal brain. Efflux transporter-mediated barrier mechanisms acting on more lipophilic compounds are likely to be efficient around birth at the BCSFB, whose barrier properties mature at an early fetal stage. The degree of protection may not be so precocious at the BBB, where the expression of several transporters is downregulated by comparison to the adult levels. Additional characteristics of the developing brain, independent of the barrier permeability, are also important factors setting the cerebral concentration of drugs. Finally, changes in barrier properties induced by perinatal pathologies can alter the permeability of blood-brain interfaces to drugs. Our current knowledge of the different factors influencing CNS drug bioavailability in the developing brain is only partial. Further thorough investigations are needed before the risks of CNS adverse effects can be safely managed when treating neonates and infants, as well as pregnant women and breast feeding mothers.

## ACKNOWLEDGEMENTS AND DISCLOSURES

This work was funded by ANR-10-IBHU-0003 CESAME grant.

## REFERENCES

- Agency EM. Report on the survey of all paediatric uses of medicinal products in Europe. 2010 [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Report/2011/01/WC500101006.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2011/01/WC500101006.pdf).
- Smyth RM, Gargon E, Kirkham J, Cresswell L, Golder S, Smyth R, et al. Adverse drug reactions in children—a systematic review. *PLoS One*. 2012;7(3):e24061.
- Bellis JR, Kirkham JJ, Thiesen S, Conroy EJ, Bracken LE, Mannix HL, et al. Adverse drug reactions and off-label and unlicensed medicines in children: a nested case-control study of inpatients in a pediatric hospital. *BMC Med*. 2013;11:238.
- Agency EM. Evidence of harm from off-label or unlicensed medicines in children. 2004 [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Other/2009/10/WC500004021.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Other/2009/10/WC500004021.pdf).
- Elzagallaai AA, Greff M, Rieder MJ. Adverse drug reactions in children: the double-edged sword of therapeutics. *Clin Pharmacol Ther*. 2017;101(6):725–35.
- Cliff-Eribo KO, Sammons H, Choonara I. Systematic review of paediatric studies of adverse drug reactions from pharmacovigilance databases. *Expert Opin Drug Saf*. 2016;15(10):1321–8.
- Andropoulos DB. Effect of anesthesia on the developing brain: infant and fetus. *Fetal Diagn Ther*. 2018;43(1):1–11.
- Jain KK. Drug-induced neurological disorders. Hogrefe Publishing; 2011.
- Hanke U, May K, Rozehnal V, Nagel S, Siegmund W, Weitschies W. Commonly used nonionic surfactants interact differently with the human efflux transporters ABCB1 (p-glycoprotein) and ABCG2 (MRP2). *Eur J Pharm Biopharm*. 2010;76(2):260–8.
- Agency EM. Reflection paper on extrapolation of efficacy and safety in 4 paediatric medicine development. 2016 [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Regulatory\\_and\\_procedural\\_guideline/2016/04/WC500204187.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Regulatory_and_procedural_guideline/2016/04/WC500204187.pdf).
- Administration UfAd. Pediatric Science and Research Activities. <https://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/PediatricTherapeuticsResearch/ucm106614.htm>.
- Agency EM. Needs for paediatric medicines. [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document\\_listing/document\\_listing\\_000096jsp&mid=WC0b01ac0580925b1e](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/document_listing/document_listing_000096jsp&mid=WC0b01ac0580925b1e).
- Ward RM, Benjamin DK, Jr., Davis JM, Gorman RL, Kauffman R, Kearns GL, et al. The need for pediatric drug development. *J Pediatr*. 2017.
- Rai A, Bhalla S, Rebello SS, Kastrissios H, Gulati A. Disposition of morphine in plasma and cerebrospinal fluid varies during neonatal development in pigs. *J Pharm Pharmacol*. 2005;57(8):981–6.
- Hausler M, Schafer C, Osterwinter C, Jähnen-Dechent W. The physiologic development of fetuin-a serum concentrations in children. *Pediatr Res*. 2009;66(6):660–4.
- Ehrnebo M, Agurell S, Jalling B, Boreus LO. Age differences in drug binding by plasma proteins: studies on human foetuses, neonates and adults. *Eur J Clin Pharmacol*. 1971;3(4):189–93.
- Sammons HM, Choonara I. Learning lessons from adverse drug reactions in children. *Children (Basel)*. 2016;3(1):1.
- Thyagarajan B, Deshpande SS. Cotrimoxazole and neonatal kernicterus: a review. *Drug Chem Toxicol*. 2014;37(2):121–9.
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Mol Pharm*. 2013;10(5):1473–91.
- Workman AD, Charvet CJ, Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Modeling transformations of neurodevelopmental sequences across mammalian species. *J Neurosci*. 2013;33(17):7368–83.
- Fenstermacher JD. The pharmacology of the blood-brain barrier. In: Neuwelt E, editor. Implications of the blood-brain barrier and its manipulation. New York: Plenum; 1989. p. 137–55.
- Westerhout J, Danhof M, De Lange EC. Preclinical prediction of human brain target site concentrations: considerations in extrapolating to the clinical setting. *J Pharm Sci*. 2011;100(9):3577–93.
- Nehlig A, Pereira de Vasconcelos A, Boyet S. Postnatal changes in local cerebral blood flow measured by the quantitative autoradiographic [<sup>14</sup>C]iodoantipyrine technique in freely moving rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1989;9(5):579–88.
- Wei L, Otsuka T, Acuff V, Bereczki D, Pettigrew K, Patlak C, et al. The velocities of red cell and plasma flows through parenchymal microvessels of rat brain are decreased by pentobarbital. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1993;13(3):487–97.
- Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(7):561–74.
- Caley DW, Maxwell DS. Development of the blood vessels and extracellular spaces during postnatal maturation of rat cerebral cortex. *J Comp Neurol*. 1970;138(1):31–47.
- Dziegielewska KM, Ek J, Habgood MD, Saunders NR. Development of the choroid plexus. *Microsc Res Tech*. 2001;52(1):5–20.
- Szmydynger-Chodobska J, Chodobski A, Johanson CE. Postnatal developmental changes in blood flow to choroid plexuses and cerebral cortex of the rat. *Am J Phys*. 1994;266(5 Pt 2):R1488–92.
- Hammarlund-Udenaes M, Friden M, Syvanen S, Gupta A. On the rate and extent of drug delivery to the brain. *Pharm Res*. 2008;25(8):1737–50.
- Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*. 2010;468(7323):562–6.
- Lehmenkuhler A, Sykova E, Svoboda J, Zilles K, Nicholson C. Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical

- white matter during postnatal development determined by diffusion analysis. *Neuroscience*. 1993;55(2):339–51.
32. Yang S, Wang Y, Li K, Tang X, Zhang K, Shi C, et al. Extracellular space diffusion analysis in the infant and adult rat striatum using magnetic resonance imaging. *Int J Dev Neurosci*. 2016;53:1–7.
  33. Ghersi-Egea JF, Finnegan W, Chen JL, Fenstermacher JD. Rapid distribution of intraventricularly administered sucrose into cerebrospinal fluid cisterns via subarachnoid velae in rat. *Neuroscience*. 1996;75(4):1271–88.
  34. Knopf PM, Cserr HF, Nolan SC, Wu TY, Harling-Berg CJ. Physiology and immunology of lymphatic drainage of interstitial and cerebrospinal fluid from the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1995;21(3):175–80.
  35. Ghersi-Egea JF, Babikian A, Blondel S, Strazielle N. Changes in the cerebrospinal fluid circulatory system of the developing rat: quantitative volumetric analysis and effect on blood-CSF permeability interpretation. *Fluids Barriers CNS*. 2015;12:8.
  36. Bass NH, Lundborg P. Postnatal development of bulk flow in the cerebrospinal fluid system of the albino rat: clearance of carboxyl-(14 C)inulin after intrathecal infusion. *Brain Res*. 1973;52:323–32.
  37. Jones HC, Deane R, Bucknall RM. Developmental changes in cerebrospinal fluid pressure and resistance to absorption in rats. *Dev Brain Res*. 1987;33(1):23–30.
  38. Johanson CE, Duncan JA 3rd, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res*. 2008;5:10.
  39. Dziegielewska KM, Evans CA, Malinowska DH, Mollgard K, Reynolds JM, Reynolds ML, et al. Studies of the development of brain barrier systems to lipid insoluble molecules in fetal sheep. *J Physiol*. 1979;292:207–31.
  40. Saunders NR, Knott GW, Dziegielewska KM. Barriers in the immature brain. *Cell Mol Neurobiol*. 2000;20(1):29–40.
  41. Dickens D, Webb SD, Antonyuk S, Giannoudis A, Owen A, Radisch S, et al. Transport of gabapentin by LAT1 (SLC7A5). *Biochem Pharmacol*. 2013;85(11):1672–83.
  42. Lee NY, Choi HO, Kang YS. The acetylcholinesterase inhibitors competitively inhibited an acetyl L-carnitine transport through the blood-brain barrier. *Neurochem Res*. 2012;37(7):1499–507.
  43. Vlieghe P, Khrestchatsky M. Medicinal chemistry based approaches and nanotechnology-based systems to improve CNS drug targeting and delivery. *Med Res Rev*. 2013;33(3):457–516.
  44. Goasdoue K, Miller SM, Colditz PB, Bjorkman ST. Review: the blood-brain barrier; protecting the developing fetal brain. *Placenta*. 2017;54:111–6.
  45. Strazielle N, Khuth ST, Ghersi-Egea JF. Detoxification systems, passive and specific transport for drugs at the blood-CSF barrier in normal and pathological situations. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004;56(12):1717–40.
  46. Schlachetzki F, Zhu C, Pardridge WM. Expression of the neonatal Fc receptor (FcRn) at the blood-brain barrier. *J Neurochem*. 2002;81(1):203–6.
  47. Mollgard K, Dziegielewska KM, Holst CB, Habgood MD, Saunders NR. Brain barriers and functional interfaces with sequential appearance of ABC efflux transporters during human development. *Sci Rep*. 2017;7(1):11603.
  48. Kratzer I, Vasiljevic A, Rey C, Fevre-Montange M, Saunders N, Strazielle N, et al. Complexity and developmental changes in the expression pattern of claudins at the blood-CSF barrier. *Histochem Cell Biol*. 2012;138(6):861–79.
  49. Liddelow SA, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Bauer H, Bauer HC, et al. Mechanisms that determine the internal environment of the developing brain: a transcriptomic, functional and ultrastructural approach. *PLoS One*. 2013;8(7):e65629.
  50. Ek CJ, Dziegielewska KM, Stolp H, Saunders NR. Functional effectiveness of the blood-brain barrier to small water-soluble molecules in developing and adult opossum (*Monodelphis domestica*). *J Comp Neurol*. 2006;496(1):13–26.
  51. Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010;468(7323):557–61.
  52. Conrad MS, Johnson RW. The domestic piglet: an important model for investigating the neurodevelopmental consequences of early life insults. *Annu Rev Anim Biosci*. 2015;3:245–64.
  53. Stonestreet BS, Burgess GH, Cserr HF. Blood-brain barrier integrity and brain water and electrolytes during hypoxia/hypercapnia and hypotension in newborn piglets. *Brain Res*. 1992;590(1–2):263–70.
  54. Leino RL, Gerhart DZ, Drewes LR. Monocarboxylate transporter (MCT1) abundance in brains of suckling and adult rats: a quantitative electron microscopic immunogold study. *Brain Res Dev Brain Res*. 1999;113(1–2):47–54.
  55. Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain. *Front Neurosci*. 2015;9:21.
  56. Gazzin S, Strazielle N, Schmitt C, Fevre-Montange M, Ostrow JD, Tiribelli C, et al. Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCB1 and ABCG1 between blood-brain interfaces. *J Comp Neurol*. 2008;510(5):497–507.
  57. Baello S, Iqbal M, Gibb W, Matthews SG. Astrocyte-mediated regulation of multidrug resistance p-glycoprotein in fetal and neonatal brain endothelial cells: age-dependent effects. *Phys Rep*. 2016;4(16):e12853.
  58. Saunders NR, Dziegielewska KM, Mollgard K, Habgood MD, Wakefield MJ, Lindsay H, et al. Influx mechanisms in the embryonic and adult rat choroid plexus: a transcriptome study. *Front Neurosci*. 2015;9:123.
  59. Shawahna R, Uchida Y, Decleves X, Ohtsuki S, Yousif S, Dauchy S, et al. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol Pharm*. 2011;8(4):1332–41.
  60. Kratzer I, Liddelow SA, Saunders NR, Dziegielewska KM, Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Developmental changes in the transcriptome of the rat choroid plexus in relation to neuroprotection. *Fluids Barriers CNS*. 2013;10(1):25.
  61. Virgintino D, Robertson D, Benagiano V, Errede M, Bertossi M, Ambrosi G, et al. Immunogold cytochemistry of the blood-brain barrier glucose transporter GLUT1 and endogenous albumin in the developing human brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2000;123(1):95–101.
  62. Strazielle N, Ghersi-Egea JF. Potential pathways for CNS drug delivery across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Curr Pharm Des*. 2016;22(35):5463–76.
  63. Moretti R, Pansiot J, Bettati D, Strazielle N, Ghersi-Egea JF, Damante G, et al. Blood-brain barrier dysfunction in disorders of the developing brain. *Front Neurosci*. 2015;9:40.
  64. Stolp HB, Dziegielewska KM, Ek CJ, Habgood MD, Lane MA, Potter AM, et al. Breakdown of the blood-brain barrier to proteins in white matter of the developing brain following systemic inflammation. *Cell Tissue Res*. 2005;320(3):369–78.
  65. Hutton LC, Castillo-Melendez M, Walker DW. Uteroplacental inflammation results in blood brain barrier breakdown, increased activated caspase 3 and lipid peroxidation in the late gestation ovine fetal cerebellum. *Dev Neurosci*. 2007;29(4–5):341–54.
  66. Kratzer I, Chip S, Vexler ZS. Barrier mechanisms in neonatal stroke. *Front Neurosci*. 2014;8:359.
  67. Muramatsu K, Fukuda A, Togari H, Wada Y, Nishino H. Vulnerability to cerebral hypoxic-ischemic insult in neonatal but not in adult rats is in parallel with disruption of the blood-brain barrier. *Stroke*. 1997;28(11):2281–8. discussion 8–9



68. Fernandez-Lopez D, Faustino J, Daneman R, Zhou L, Lee SY, Derugin N, et al. Blood-brain barrier permeability is increased after acute adult stroke but not neonatal stroke in the rat. *J Neurosci*. 2012;32(28):9588–600.
69. Gazzin S, Berengeno AL, Strazielle N, Fazzari F, Raseni A, Ostrow JD, et al. Modulation of Mrp1 (ABCC1) and Pgp (ABCB1) by bilirubin at the blood-CSF and blood-brain barriers in the Gunn rat. *PLoS One*. 2011;6(1):e16165.
70. Neuhaus W, Schlundt M, Fehrholz M, Ehrke A, Kunzmann S, Liebner S, et al. Multiple antenatal dexamethasone treatment alters brain vessel differentiation in newborn mouse pups. *PLoS One*. 2015;10(8):e0136221.
71. Iqbal M, Baello S, Javam M, Audette MC, Gibb W, Matthews SG. Regulation of multidrug resistance P-glycoprotein in the developing blood-brain barrier: interplay between glucocorticoids and cytokines. *J Neuroendocrinol*. 2016;28(3):12360.
72. Gherzi-Egea JF, Gazzin S, Strazielle N. Blood-brain interfaces and bilirubin-induced neurological diseases. *Curr Pharm Des*. 2009;15(25):2893–907.





## RESUME

---

Plus de 50 % des handicaps neurodéveloppementaux sont dus à une exposition périnatale à des stress toxiques ou oxydants. Comprendre comment le cerveau est protégé au cours du développement périnatal et pourquoi ses mécanismes de défense sont dépassés lorsque l'enfant est soumis à un stress important est donc crucial. La barrière sang – liquide céphalorachidien (LCR), localisée au niveau des plexus choroïdes, présente une capacité de détoxification élevée et pourrait donc avoir un rôle prépondérant dans la protection du cerveau au stade périnatal. Nous avons étudié la capacité de plusieurs enzymes choroïdiennes à protéger l'environnement liquidien cérébral pendant la période postnatale chez le rat, et évalué si leurs activités pouvaient être induites par la voie du *nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (Nrf2). Le facteur Nrf2 peut en effet moduler l'expression de différents gènes codant pour des enzymes de détoxification. Nous avons montré que les glutathion transférases (Gst) et les glutathion peroxydases (Gpx), intervenant respectivement dans l'inactivation des molécules toxiques et dans la régulation du stress oxydant, présentaient des activités choroïdiennes élevées pendant la période postnatale, et avons caractérisé fonctionnellement leur capacités de neuroprotection. Le traitement des rats avec du diméthylfumarate (DMF), inducteur de la voie Nrf2, induit la migration nucléaire de Nrf2, augmente l'activité choroïdienne Gst, et réduit de 40 % le passage cérébral de toxiques substrats des Gst. Ces données montrent la capacité neuroprotectrice précoce des plexus choroïdes, et indique qu'elle peut être induite pharmacologiquement.

**Mots clés :** Plexus choroïdes, Glutathion transférases, Glutathion peroxydase, Liquide céphalorachidien, Nrf2, Diméthylfumarate

## ABSTRACT

---

### **Glutathione-dependant neuroprotection mechanisms in the choroidal blood - cerebrospinal fluid barrier during perinatal development**

More than 50 % of intellectual or sensory-motor deficits in children are due to perinatal exposure to oxidative stress or toxicants. Understanding brain protection mechanisms during development is crucial to design therapeutic strategies to address these disabling disorders. The choroid plexuses, forming an interface between the blood and the cerebrospinal fluid (CSF), have a high detoxifying capacity, suggesting their involvement in neuroprotection. The nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) pathway can modulate the expression of several genes encoding for antioxidant proteins and detoxifying enzymes. We studied the ability of several choroidal enzyme families to protect the brain fluid environment during the postnatal period in rat and explored whether this protection can be enhanced by Nrf2 pathway. We focused on glutathione transferases (Gsts), which conjugate toxic compounds to glutathione, and glutathione peroxidases (Gpxs), which detoxify reactive oxygen species. Gst and Gpx specific activities were high during the postnatal period in choroid plexuses compared to the cerebral cortex, and their neuroprotective functions were efficient. The Nrf2 factor is expressed in choroid plexuses during the perinatal period. Treatment of rat pups with Nrf2 activator dimethylfumarate induced Nrf2 nuclear translocation and increased Gst activities in choroid plexus tissues. The dimethylfumarate treatment resulted in a large decrease of the blood-to-CSF permeability of a prototypical Gst substrate. These data substantiate the early neuroprotective functions of choroid plexuses, which can be enhanced upon treatment with clinically used pharmacological compounds.

**Key word :** Choroid plexuses, Glutathione transferases, Glutathione peroxidases, Cerebrospinal fluid, Nrf2, Dimethylfumarate

## INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

---

Centre de recherche en neurosciences de Lyon, INSERM U1028 – CNRS UMR5292

Centre Hospitalier Le Vinatier – Bâtiment 462 (Neurocampus) – 95, boulevard Pinel – 69675 BRON cedex