



**HAL**  
open science

# Etude des conséquences de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité d'un modèle in vitro de barrière hémato-encéphalique

Morgane Chatard

► **To cite this version:**

Morgane Chatard. Etude des conséquences de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité d'un modèle in vitro de barrière hémato-encéphalique. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSES002 . tel-02369696

**HAL Id: tel-02369696**

**<https://theses.hal.science/tel-02369696>**

Submitted on 19 Nov 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.

# **THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE DE LYON**

Faculté de médecine de l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne

Ecole doctorale sciences-ingénierie-santé de Lyon (EDSIS 488)

## **Etude des conséquences de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de barrière hémato- encéphalique**

Thèse présentée et soutenue publiquement le 8 février 2017 pour l'obtention d'un grade de  
**Docteur de l'Université de Lyon**

Opérée à l'Université Jean Monnet de Saint Etienne par

**Morgane CHATARD**

**Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire**

Directeur de thèse : Pr Frédéric Roche

Co-directeur de thèse : Pr Nathalie Perek

### **Membres du Jury**

Pr Marie-Pierre Dehouck (Rapporteur)

Dr Rosin Owens (Rapporteur)

Dr Anne Briançon-Marjollet (Examineur)

Dr Laurent Seugnet (Examineur)

Pr Patrick Mismetti (Examineur)

Pr Nathalie Perek (Co-directeur de thèse)

Pr Frédéric Roche (Directeur de thèse)



## THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE DE LYON

Faculté de médecine de l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne

Ecole doctorale sciences-ingénierie-santé de Lyon (EDSIS 488)

# Etude des conséquences de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de barrière hémato- encéphalique

Thèse présentée et soutenue publiquement le 8 février 2017 pour l'obtention d'un grade de  
**Docteur de l'Université de Lyon**

Opérée à l'Université Jean Monnet de Saint Etienne par

**Morgane CHATARD**

**Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire**

Directeur de thèse : Pr Frédéric Roche

Co-directeur de thèse : Pr Nathalie Perek

### Membres du Jury

Pr Marie-Pierre Dehouck (Rapporteur)

Dr Rosin Owens (Rapporteur)

Dr Anne Briançon-Marjollet (Examineur)

Dr Laurent Seugnet (Examineur)

Pr Patrick Mismetti (Examineur)

Pr Nathalie Perek (Co-directeur de thèse)

Pr Frédéric Roche (Directeur de thèse)

## **REMERCIEMENTS**

**A mes directeurs de thèse,**

### **Le Professeur Frédéric Roche**

Merci pour l'intérêt et l'enthousiasme que vous accordez à ce travail depuis maintenant bientôt quatre ans. Je tenais à vous remercier, notamment, pour la confiance et les responsabilités que vous m'avez accordées au sein du laboratoire SNA-EPIS, qui m'ont enrichie professionnellement et humainement. Merci pour votre disponibilité durant ce travail, pour la richesse de nos échanges qui m'ont permis de mieux appréhender les liens existant entre le cerveau et les pathologies liées à l'hypoxie. Enfin, je vous remercie pour votre écoute, plus particulièrement, lors de mes moments de doute, qui m'a toujours permis d'aller de l'avant. Veuillez trouver dans ce travail, mon sincère respect.

### **Le Professeur Nathalie Perek**

Merci pour tous les conseils que vous m'avez apportés durant ces années de thèse, que ce soit sur un plan scientifique ou sur un plan enseignement. Je tiens particulièrement à vous remercier pour votre disponibilité, votre écoute, la confiance que vous m'avez accordée, mais aussi pour toutes les réunions faites ensemble qui m'ont guidée et permise de finaliser ce travail de recherche. Enfin, vos précieux conseils et votre confiance en enseignement m'ont permis de m'enrichir professionnellement et de renforcer ma conviction qu'une carrière scientifique n'est pas incompatible avec une carrière universitaire. Veuillez trouver dans ce travail, le témoignage de ma profonde reconnaissance.

**A mes rapporteurs,**

### **Le Docteur Roisin Owens**

C'est un grand honneur et un plaisir de vous compter parmi ce jury. Je vous remercie d'avoir acceptée de rapporter ce travail de recherche. Votre expertise, notamment, dans les mesures de résistance électrique transendothéliale sur des modèles *in vitro* de BHE, est un grand avantage pour juger et améliorer ce travail. Permettez-moi de vous témoigner mes sincères remerciements à travers ces quelques mots.

### **Le Professeur Marie-Pierre Dehouck**

C'est un immense plaisir et un honneur pour moi de vous compter parmi mon jury de thèse, et je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de rapporter ce manuscrit. Votre expertise sur la

barrière hémato-encéphalique, reconnue dans le monde scientifique, va être bénéfique et conduira sûrement à des échanges qui seront très productifs. Veuillez trouver dans ce témoignage mes sincères remerciements ainsi que ma profonde reconnaissance.

**A mes examinateurs,**

**Le Docteur Anne Briançon-Marjollet**

Merci infiniment d'avoir accepté de juger ce travail de recherche. Votre expertise dans le domaine de l'hypoxie intermittente est un atout pour ce travail. Je tenais également à vous remercier pour les échanges que l'on a pu avoir lors de mes déplacements à Grenoble. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

**Le Docteur Laurent Seugnet**

Merci infiniment d'avoir accepté de juger ce travail de recherche. Vos expertises dans le domaine des modèles de BHE (drosophiles et souris) et sur le sommeil sont des atouts pour ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

**Le Professeur Patrick Mismetti**

Je vous remercie infiniment d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse. Votre expertise dans le passage des médicaments aux niveaux des différentes barrières de l'organisme va permettre un échange très intéressant. C'est un honneur et un plaisir que vous soyez examinateur de cette thèse, et veuillez recevoir le témoignage de ma sincère reconnaissance.

**Ce travail n'aurait pas pu aboutir sans soutien financier,**

Je tiens donc à remercier sincèrement l'Université Jean Monnet de Saint-Etienne pour le financement d'une partie de ce projet mais également pour le poste d'ATER (à mi-temps) qui m'a permis de terminer ce travail de doctorat. Merci à l'association de recherche SYNAPSE et à son président Charles Travaglini, pour leur aide précieuse dans la recherche de financement, qui a permis d'acquiescer une enceinte à hypoxie essentielle à la poursuite de ce travail de thèse.

**Mes remerciements vont ensuite à tous les membres de l'équipe d'accueil SNA-EPIS (médecins, ingénieurs, thésards, techniciennes, infirmières et secrétaire),**

Merci pour votre soutien et nos échanges très constructifs lors de nos réunions de laboratoire. Je tiens à remercier plus particulièrement Michelle Gallet, ma « deuxième maman », qui m'a toujours soutenue, encouragée et surveillée durant ce travail de thèse, merci à toi !

**Merci à l'équipe PIB du laboratoire DVH (INSERM U1059 SAINBIOSE),**

Merci pour les échanges pertinents que nous avons eu lors de nos réunions qui ont enrichi mon travail de thèse. Un immense merci à Clémentine, pour son aide technique durant ce travail de recherche. Je tiens également à te remercier pour le soutien que tu m'as apporté, pour ton écoute, merci d'avoir toujours été là !

**Mes remerciements s'adressent ensuite à tous ceux qui ont contribué à ma formation professionnelle d'enseignante, et à ceux qui m'ont soutenue dans la réalisation de ce travail,**

Merci à l'équipe enseignante – le Professeur Perek, le Docteur Guignandon, le Docteur Prévot, le Professeur Guyotat, les scolarités- pour votre soutien, vos précieux conseils et votre confiance qui m'ont permis de m'affirmer en tant qu'enseignante.

Merci à Madame Sabine Palle qui m'a aidé pour l'imagerie confocale. Je tenais à vous remercier pour votre expertise, notamment dans l'analyse d'images, qui m'a été très précieuse durant ce travail de thèse.

Merci aux stagiaires que j'ai pu encadrer et qui ont contribué d'une certaine façon à ce travail de recherche. Je tiens également à remercier Monsieur Florian Bergandi pour son aide technique dans la préparation des inserts pour l'imagerie confocale. Merci également pour ton soutien ainsi que celui d'Isabelle, lors de nos petites « pauses cafés ».

**Enfin, mes remerciements vont à ma famille,**

Je tiens plus particulièrement à remercier mes parents et ma sœur pour leur soutien sans faille durant toutes ces années, et cela bien avant mon entrée en doctorat. Votre soutien, vos encouragements et votre amour ont contribué à mon épanouissement. Merci !

**A mon grand-père et parrain, parti trop tôt mais qui m'a toujours soutenu,**

## SOMMAIRE

<b>Introduction.....</b>	<b>14</b>
<b>Première partie :.....</b>	<b>21</b>
<b>Etude Bibliographique.....</b>	<b>21</b>
<b>Chapitre 1 : La barrière hémato-encéphalique (BHE).....</b>	<b>22</b>
1. Historique de la BHE .....	22
2. La BHE : une structure complexe et organisée .....	23
2.1. Une barrière biologique organisée .....	23
2.1.1. Les capillaires cérébraux : support anatomique de la BHE .....	23
2.1.2. Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales .....	24
2.1.3. Les astrocytes.....	25
2.1.4. Les péricytes.....	26
2.1.5. La membrane basale .....	27
2.1.6. Les neurones .....	28
2.1.7. La microglie .....	29
2.2. Une barrière physique formée par des complexes jonctionnels intercellulaires .....	30
2.2.1. gap junctions .....	31
2.2.2. Les jonctions adhérentes .....	32
2.2.3. Les jonctions serrées .....	34
2.3. Une barrière physiologique .....	40
2.3.1. Le transport paracellulaire au sein de la BHE.....	40
2.3.2. Le transport transcellulaire .....	40
2.4. Une barrière métabolique .....	44
2.4.1. Les enzymes .....	45
2.4.2. Les pompes d'efflux .....	46
3. Une barrière dynamique .....	62
3.1. Les astrocytes.....	62
3.1.1. Les voies de signalisation .....	63
3.1.2. Les facteurs sécrétés .....	63
3.2. Les péricytes .....	65
<b>Chapitre 2 : Modèles d'étude <i>in vitro</i> de la BHE .....</b>	<b>67</b>
1. Critères attendus pour un modèle <i>in vitro</i> de BHE.....	68
2. Les types cellulaires .....	71
2.1. Les cellules primaires .....	71
2.1.1. Origine des cellules .....	71
2.1.2. Avantages et limites des cellules primaires .....	72
2.2. Les lignées cellulaires.....	73
2.2.1. Origine des lignées cellulaires .....	73
2.2.2. Avantages et limites de ces lignées cellulaires immortalisées .....	74
3. Les différents types de modèles <i>in vitro</i> de BHE .....	74
3.1. Les modèles statiques.....	75
3.1.1. Modèles mono-culture.....	75
3.1.2. Modèles co-culture .....	77
3.1.3. Les modèles tri-culture .....	82
3.2. Modèles <i>in vitro</i> dynamiques de BHE .....	87
3.2.1. Le modèle dynamique.....	87
3.2.2. Les modèles microfluides.....	90
4. Sélection du modèle approprié .....	93
<b>Chapitre 3 : Effets des conditions hypoxiques sur la BHE .....</b>	<b>95</b>

1.	Voie cellulaire de l'hypoxie .....	95
1.1.	Définition de l'hypoxie .....	95
1.2.	Mécanismes cellulaires impliqués dans l'hypoxie .....	96
1.3.	Méthodes <i>in vitro</i> d'induction de l'hypoxie .....	98
1.3.1.	Les enceintes hermétiques .....	99
1.3.2.	Les milieux hypoxiques pré-conditionnés .....	100
1.3.3.	Les méthodes d'induction d'hypoxie utilisant des agents chimiques .....	101
2.	Impact de l'hypoxie sur la BHE .....	102
2.1.	Pathologies du SNC liées directement à l'hypoxie aiguë .....	103
2.2.	Effets de l'hypoxie aiguë sur la BHE .....	104
3.	Hypoxie intermittente et BHE.....	107
3.1.	Pathologies neurologiques liées à l'hypoxie intermittente .....	108
3.2.	Effets de l'hypoxie intermittente sur la BHE .....	110
	<b>Conclusion de l'Etude Bibliographique.....</b>	<b>114</b>
	<b>Deuxième partie : .....</b>	<b>116</b>
	<b>Travaux Personnels.....</b>	<b>116</b>
	<b>Chapitre 1 : Mise en place d'un modèle <i>in vitro</i> de BHE en co-culture contact.....</b>	<b>117</b>
1.	Choix des lignées cellulaires .....	117
2.	Mise en place des différentes configurations de co-culture .....	118
2.1.	Le modèle co-culture « non-contact ».....	119
2.2.	Le modèle co-culture « contact » .....	122
2.3.	Le modèle co-culture « inversé ».....	124
3.	Caractérisation du modèle co-culture « contact » .....	127
3.1.	Etude de l'expression des protéines de jonctions serrées du modèle de co-culture contact ..	127
3.2.	Etude de l'expression et de la fonctionnalité des transporteurs d'efflux du modèle de co-culture « contact » .....	130
4.	Avantages et limites du modèle co-culture « contact » .....	132
	<b>Chapitre 2 : Validation de l'hydralazine comme agent mimétique de la voie hypoxique pour étudier l'impact de ce stress sur la BHE .....</b>	<b>133</b>
1.	Résultats .....	134
2.	Discussion .....	135
2.1.	Validation de l'hydralazine comme agent mimétique de la voie hypoxique .....	136
2.2.	Impact de stress hypoxique sur un modèle <i>in vitro</i> de BHE .....	136
	<b>Chapitre 3 : Comparaison de deux agents mimétiques de la voie hypoxique afin de déterminer l'agent le plus adéquat pour des études <i>in vitro</i> de la BHE .....</b>	<b>152</b>
1.	Résultats .....	153
2.	Discussion .....	154
2.1.	Un stress hypoxique prolongé induit une perte d'intégrité du modèle et une augmentation de l'activité des transporteurs d'efflux .....	154
2.2.	L'hydralazine est l'agent mimétique le plus adéquat pour les études sur la BHE. ....	155
	<b>Chapitre 4: Impact de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de la BHE.....</b>	<b>180</b>
1.	Résultats .....	181
2.	Discussion .....	182
2.1.	Induction de stress hypoxiques répétés par l'hydralazine.....	182
2.2.	Des stress hypoxiques répétés conduisent à des changements progressifs au sein de la BHE	183
	<b>Troisième partie :.....</b>	<b>203</b>
	<b>Discussion générale- conclusion et perspectives de l'étude .....</b>	<b>203</b>

<b>Discussion générale .....</b>	<b>204</b>
Mise en place d'un modèle co-culture contact pour étudier le fonctionnement de la BHE en condition pathologique (hypoxie) .....	205
Une induction d'un stress hypoxique par des agents mimétiques est adéquate pour étudier son impact sur la BHE.....	206
Impact de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de la BHE et les mécanismes de défense liés aux transporteurs d'efflux.....	208
<b>Conclusion.....</b>	<b>209</b>
<b>Perspectives envisagées.....</b>	<b>210</b>
Amélioration de la méthode d'induction hypoxie intermittente .....	210
Stratégies envisagées pour inhiber ou réduire l'impact de l'hypoxie sur la BHE .....	211
<b>Perspectives personnelles.....</b>	<b>213</b>
<b><i>Bibliographie .....</i></b>	<b>214</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Etapes clés de la recherche sur la BHE .....	23
<b>Figure 2</b> : structure des capillaires cérébraux (Abbott, 2013).....	24
<b>Figure 3</b> : Intéractions cellules endothéliales-astrocytes permettant le maintien des propriétés de barrière de la BHE (Prat <i>et al.</i> , 2001).....	26
<b>Figure 4</b> : Présence de jonctions entre les cellules endothéliales cérébrales de la BHE d'après Wong <i>et al</i> (Wong <i>et al.</i> , 2013).....	31
<b>Figure 5</b> : Structure des gap junctions(Evans and Martin, 2002 modifié)..	32
<b>Figure 6</b> : structure des occludines, claudines et JAMs d'après Schneeberger et al. (Schneeberger and Lynch, 2004). .....	36
<b>Figure 7</b> : Schéma illustrant les différents mécanismes de transport présents au sein de la barrière hémato-encéphalique (Abbott <i>et al.</i> , 2006).....	41
<b>Figure 8</b> : structure de la protéine Pgp d'après Sharom et al. (Sharom, 2011).....	48
<b>Figure 9</b> : Mécanisme d'action par translocase pour l'expulsion des substrats par la protéine Pgp (Johnstone <i>et al.</i> , 2000).....	50
<b>Figure 10</b> : mécanisme d'action de flippase par la protéine Pgp pour transporter ses substrats (Johnstone <i>et al.</i> , 2000).....	51
<b>Figure 11</b> : Topologie membranaire des protéines MRPs d'après Dallas et al. (Dallas <i>et al.</i> , 2006)..	55
<b>Figure 12</b> : Structure de la protéine BCRP d'après Schinkel et al. (Schinkel and Jonker, 2003)..	58
<b>Figure 13</b> : Schéma représentant les systèmes de culture sur insert (transwell).....	68
<b>Figure 14</b> : schéma d'un modèle mono-culture.....	76
<b>Figure 15</b> : Schéma des différentes configurations de co-culture cellules endothéliales/astrocytes..	79
<b>Figure 16</b> : Schémas représentant les deux configurations du modèle tri-culture développé par Nakagawa et al. (Nakagawa <i>et al.</i> , 2007). .....	83
<b>Figure 17</b> : Schéma du modèle développé par Al Ahmad et al. (Al Ahmad <i>et al.</i> , 2011). .....	84
<b>Figure 18</b> : Schéma représentant le modèle tri-culture développé par Thomsen et al. (Thomsen <i>et al.</i> , 2015).....	85
<b>Figure 19</b> : Schéma d'un modèle tri-culture associant cellules endothéliales cérébrales, astrocytes et neurones.....	86
<b>Figure 20</b> : représentation schématique du système « cone-plate » extrait de Naik et al. (Naik and Cucullo, 2012).....	88
<b>Figure 21</b> : schéma du système DIV extrait de Naik et al. (Naik and Cucullo, 2012)..	89
<b>Figure 22</b> : schéma modèle $\mu$ BBB extrait de l'article He et al. (He <i>et al.</i> , 2014).....	91
<b>Figure 23</b> : schéma du dispositif extrait de l'article He et al. (He <i>et al.</i> , 2014). .....	92
<b>Figure 24</b> : schéma du modèle SyM-BBB, extrait de l'article He et al. (He <i>et al.</i> , 2014).....	93
<b>Figure 25</b> : Schéma illustrant la voie normoxique.....	97
<b>Figure 26</b> : Schéma illustrant la voie hypoxique..	98
<b>Figure 27</b> : Représentation schématique du modèle de Polotsky extrait de l'article de Ryan et al. (Ryan <i>et al.</i> , 2005). .....	101
<b>Figure 28</b> : Images prises au microscope à fluorescence et extraites de l'article d'Engelhardt et al. (Engelhardt <i>et al.</i> , 2014).....	105
<b>Figure 29</b> : Schéma illustrant un mécanisme d'action de l'hypoxie aiguë sur la BHE, et particulièrement sur les protéines de jonctions serrées, proposé par Engelhardt et al. (Engelhardt <i>et al.</i> , 2014).....	106
<b>Figure 30</b> : Profil expérimental d'hypoxie intermittente sur des rats nouveaux-nés, d'après Morken et al. (Morken <i>et al.</i> , 2013).....	111

<b>Figure 31</b> : Profil d'exposition à l'hypoxie intermittente de Philipps et al. (Phillips <i>et al.</i> , 2004). .....	112
<b>Figure 32</b> : Schéma des différentes configurations de co-culture testées lors de la mise en place du modèle <i>in vitro</i> de BHE.....	119
<b>Figure 33</b> : Mesures de TEER sur 8 jours.....	120
<b>Figure 34</b> : Mesures de la perméabilité au sodium fluorescéine à J6. ....	121
<b>Figure 35</b> : Schéma illustrant la mise en place du modèle co-culture « contact ».. .....	122
<b>Figure 36</b> : Mesures de TEER sur 8 jours.....	123
<b>Figure 37</b> : Mesures de la perméabilité au sodium fluorescéine à J6.....	124
<b>Figure 38</b> : Mesures de TEER sur 8 jours pour différentes concentrations en cellules bEnd.3.....	125
<b>Figure 39</b> : Mesures de la perméabilité au sodium fluorescéine à J6 pour les différentes concentrations en cellules bEnd.3.. .....	126
<b>Figure 40</b> : Expressions de ZO-1, occludine et claudine-5 en µg/ml, déterminées par cell-ELISA. ....	128
<b>Figure 41</b> : Marquages de ZO-1, occludine et claudine-5, observés en microscopie confocale.....	129
<b>Figure 42</b> : Expressions de Pgp et MRP-1 en µg/ml, déterminées par cell-ELISA. ....	130
<b>Figure 43</b> : Transport du BCECF par Pgp et MRP-1 afin d'évaluer la fonctionnalité de ces pompes..	131
<b>Figure 44</b> : L'hypoxie intermittente génère une augmentation de stress oxydatif, active la voie HIF-1 et induit un état d'inflammation chronique. Hypothèse de Lim & Pack (Lim and Pack, 2014). .....	213

## **LISTE DES TABLES**

<b>Tableau 1</b> : Substrats de la protéine Pgp d'après Sharom et al. (2011).....	52
<b>Tableau 2</b> : Inhibiteurs de la protéine Pgp d'après Sharom et al. (2011).....	53
<b>Tableau 3</b> : Récapitulatif des résultats obtenus pour les différentes configurations. ....	127

## RESUME

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est la structure essentielle au système nerveux central (SNC), localisée au sein des capillaires cérébraux. Elle est responsable du maintien de l'homéostasie cérébrale ainsi que de sa protection. En effet, les pathologies affectant le SNC sont souvent associées à une altération au niveau de la BHE. L'un des nombreux facteurs, pouvant altérer l'homéostasie du SNC, est l'hypoxie puisque le cerveau est le premier consommateur d'oxygène. De nombreuses études ont démontré qu'une hypoxie aiguë (modélisation de l'ischémie cérébrale transitoire ou l'AVC), altère la perméabilité de cette barrière. Cependant, certaines pathologies sont liées à une hypoxie intermittente, notamment les troubles respiratoires associés au sommeil, comme le syndrome d'apnées du sommeil. Cette hypoxie intermittente ne semble pas être sans conséquence sur la structure et la fonction du cerveau, car des études menées chez l'Homme ont démontré que ces patients souffraient de troubles cognitifs. L'enjeu dans l'étude de ces pathologies est d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes amenant à l'altération de la BHE, afin de développer des stratégies thérapeutiques adéquates. Toutefois, peu d'études à ce jour se sont intéressées à l'impact de l'hypoxie intermittente sur la BHE en raison de la complexité du cerveau. De ce fait, les modèles *in vitro* de BHE semblent être des outils adéquats à l'étude de la BHE en conditions pathologiques. L'objectif de ce travail de thèse a été de mettre en place un modèle *in vitro* de BHE permettant l'étude de l'impact de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de cette barrière.

Le modèle mis en place est un modèle de co-culture « contact » mettant en jeu des cellules endothéliales cérébrales immortalisées de souris et des astrocytes immortalisés de rat. En effet, de nombreuses études ont montré l'importance des interactions entre les astrocytes et les cellules endothéliales, dans la mise en place du phénotype de barrière de la BHE. Nous avons fait le choix de développer un modèle murin afin d'être en adéquation avec les études menées, chez le petit animal, au laboratoire. Ce modèle a été caractérisé en termes de résistance électrique transendothéliale (TEER), de perméabilité membranaire, de jonctions serrées et de transporteurs d'efflux. Ce modèle répond aux critères attendus pour un modèle *in vitro* de BHE et est rapide à mettre en place.

L'impact cellulaire de l'hypoxie intermittente est difficile à étudier *in vitro* en raison de la rapidité du phénomène. De ce fait, nous avons mis en place une méthode alternative d'induction de stress hypoxique par un agent chimique, l'hydralazine, qui soit reproductible, contrôlable et réversible, afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires induits au niveau de cette BHE. Cette méthode a été validée par comparaison avec une hypoxie physique. Les résultats ont montré que l'induction de HIF-1 $\alpha$  (facteur de l'hypoxie) était similaire avec les deux méthodes et que l'impact sur le modèle de BHE était semblable entre une induction avec l'hydralazine et celle induite par une hypoxie physique. Par la suite cette méthode d'induction d'hypoxie par l'hydralazine, a permis d'étudier les conséquences de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de la BHE sur un temps de 24 heures. Nos résultats ont montré qu'un stress hypoxique répété altérait de façon progressive la voie paracellulaire des cellules endothéliales, en diminuant l'expression des protéines de jonctions serrées de notre modèle. Par ailleurs, la voie transcellulaire est également affectée car l'activité des transporteurs d'efflux est augmentée.

Ce travail a permis de mettre en place une méthode alternative d'induction de l'hypoxie qui est contrôlable et reproductible dans le temps. De plus, c'est la première étude menée *in vitro* qui s'intéresse aux conséquences de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de la BHE. Ainsi ce travail a permis d'apporter des premiers éléments de réponses sur les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les pathologies liées à des stress hypoxiques répétés.

**Mots clés** : barrière hémato-encéphalique, hydralazine, hypoxie répétée, modèle *in vitro*, intégrité

## **GLOSSAIRE**

$\gamma$ -GT :  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase

2-ME-2 : methoxyestradiol

ABC : ATP binding cassette

AED : anti-epileptic drug

ALP : alcaline phosphatase

AMP : adénosine monophosphate cyclique

ATP : adénosine tri-phosphate

AVC : accident vasculaire cérébral

BCECF : 2',7' - bis-(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester

BCRP: breast cancer resistance protein

bFGF: basic fibroblast growth factor

BHE: barrière hémato encéphalique

CoCl<sub>2</sub>: chlorure de cobalt

DMEM: dubelcco modified eagle medium

FGF: fibroblast growth factor

GDNF: glial-derived neurotrophic factor

GK: guanyl kinase

GLUT-1: transporteur glucose-1

GSH: glutathion peroxidase

HIF-1: hypoxia inducible factor-1

HRE: hypoxia response element

IL-6: interleukine-6

JAM: junctional adhesion molecule

LP-1: low density lipoprotein receptor-related protein-1

MAGUK: membrane-associated guanylate kinase-like

MAO: monoamine oxydase

MCT-1: monocarboxylate transporter-1

MDR: multidrug resistance protein  
MRP: multidrug resistance-associated protein  
Na-F: sodium fluorescéine  
NBD: nucleotide binding domain  
OAT: organic anion transporter  
OATP: organic anion transporting polypeptide  
PDZ: post synaptic density drosophila disc large tumor suppressor ZO-1 protein  
PHD: proly hydroxylase domain  
Pgp: P-glycoprotéine  
PMEA: 9-(2-phosphorylmethyloxyethyl) adenine  
RA: acide rétinoïque  
ROS: radicaux oxygen species  
SAS: syndrome d'apnée du sommeil  
SH3: SRC homology 3  
SLC: solute carrier  
SNC: système nerveux central  
SVF: serum de veau foetal  
TEER: transendothelial electrical resistance  
TGF- $\beta$ : transforming growth factor- $\beta$   
TJ: tight junction  
TMD: transmembrane domain  
TMH: transmembrane helice  
TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor- $\alpha$   
UNV: unité neuro-vasculaire  
VE-cadherin: vascular endothelial-cadherin  
VEGF: vascular endothelial growth factor  
YC-1: 3-(5'-hydroxyethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole  
ZO: zonula occludens

# Introduction

Le bon fonctionnement neuronal du système nerveux central (SNC) nécessite un contrôle et un maintien de l'homéostasie, ainsi que des structures permettant son approvisionnement en oxygène et en nutriments. Le fonctionnement optimal du système nerveux est permis par deux structures biologiques : la barrière hémato-liquidienne (BHL), qui contrôle les échanges entre la circulation sanguine et le liquide céphalo-rachidien, et la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui permet les échanges entre le sang et le tissu parenchymateux cérébral. Récemment, un troisième système biologique a été décrit et permettrait d'approvisionner et de protéger le SNC : le système « glymphatique » (Iiff *et al.*, 2013). Ce système favoriserait l'élimination des protéines solubles et des métabolites du SNC. Par ailleurs, le système « glymphatique » permettrait également l'apport de plusieurs composés dans le cerveau, tels que le glucose, les lipides, les acides aminés, les neuromodulateurs... (Jessen *et al.*, 2015). Toutefois, ce système est sujet à débat dans la littérature (Jin *et al.*, 2016).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés uniquement à la BHE. Le siège anatomique de cette barrière est l'endothélium qui tapisse les capillaires cérébraux. Cet endothélium se distingue, des endothélia périphériques, par ses propriétés spécifiques : la présence de jonctions serrées, un transport vésiculaire réduit, la présence d'enzymes et de transporteurs d'efflux, ainsi qu'une absence de fenestration (Hawkins and Davis, 2005). Ces propriétés permettent de limiter le passage paracellulaire et transcellulaire de nombreuses molécules, renforçant ainsi l'étanchéité de la BHE. Toutefois, les cellules endothéliales n'agissent pas seules au sein de la barrière. En effet, les capillaires cérébraux sont entourés par des prolongements astrocytaires, intervenant dans l'induction des propriétés de l'endothélium citées précédemment (DeBault and Cancilla, 1980). Enfin, l'endothélium des capillaires cérébraux interagit étroitement avec les péricytes, afin de maintenir les propriétés de la BHE (Lai and Kuo, 2005).

La BHE, étant une structure complexe, son étude peut être difficile *in vivo*. C'est pourquoi, de nombreux modèles *in vitro* de BHE ont été développés. Ces modèles peuvent être de configurations simplistes (un seul type cellulaire) ou complexes (plusieurs types cellulaires et/ou ajout de contraintes mécaniques). Le développement d'un modèle *in vitro* de BHE dépend de l'objectif de l'étude. Néanmoins, ces modèles ont un intérêt élevé pour les études concernant la structure et la fonction de cette barrière, et plus particulièrement pour comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires induits lors de phénomènes pathologiques.

Un des facteurs pathologiques pouvant altérer l'homéostasie du SNC est l'hypoxie. L'hypoxie correspond à une réduction de la pression partielle en oxygène. Or, le cerveau est un grand consommateur d'oxygène, ainsi cette hypoxie va entraîner des conséquences au niveau cérébral. En effet, l'hypoxie est souvent associée à un dysfonctionnement de la BHE. Deux types d'hypoxie se distinguent et conduisent à des conséquences cérébrovasculaires différentes : l'hypoxie aiguë (ischémie cérébrale) et l'hypoxie intermittente (syndrome d'apnées du sommeil). L'un des enjeux, dans le traitement de ces pathologies, est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires pouvant entraîner une altération de la BHE et *a posteriori* un dysfonctionnement cérébral. Toutefois, si l'impact d'une hypoxie aiguë sur la BHE est bien décrit dans la littérature, les conséquences d'une hypoxie intermittente sur cette barrière restent encore peu décrites. Il semblerait, néanmoins, que l'hypoxie intermittente ne soit pas sans conséquence, puisque des chercheurs de notre laboratoire ont montré que des patients souffrant d'apnées du sommeil développaient des troubles cognitifs (Sforza *et al.*, 2010). Ceci a également été confirmé dans une étude plus récente (Kerner and Roose, 2016). **Dans ce cadre, l'objectif de ce travail de thèse a consisté à mettre en place un modèle *in vitro* de BHE permettant l'étude de l'impact de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de cette barrière.**

La première étape de ce travail a été de mettre en place un modèle *in vitro* de BHE permettant l'étude de la structure et de la fonction de cette barrière. Pour cela, un modèle de co-culture « contact » est mis en place, qui est composé de cellules endothéliales cérébrales et d'astrocytes. La caractérisation du modèle a montré que ce dernier exprimait des protéines de jonctions serrées, le rendant ainsi étanche, et des transporteurs d'efflux. Ce modèle est rapide à mettre en place et donc adéquat à l'étude de phénomènes pathologiques. La seconde partie de ce travail, a consisté à la mise en place d'une méthode d'induction de stress hypoxique par des agents mimétiques, qui soit reproductible, contrôlable et réversible afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires induits au niveau de la BHE. Enfin, la dernière partie du travail de thèse, a été d'étudier l'impact de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de la BHE. Ce travail a pour but de comprendre les premiers mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les pathologies liées à une hypoxie répétée.

Ce travail de thèse a été réalisé sous la direction du Pr Frédéric Roche, directeur du laboratoire du système nerveux autonome-épidémiologie, physiologie, ingénierie, santé (SNA-EPIS, EA4607, Université de Lyon, Faculté de médecine de l'Université Jean Monnet-Saint-

Etienne, F-42023, Saint-Etienne) et la co-direction du Pr Nathalie Perek, membre du laboratoire INSERM SAINBIOSE U1059, équipe DVH (Université de Lyon, Faculté de médecine de l'Université Jean Monnet-Saint-Etienne, F-42023, Saint-Etienne).

De plus, ce travail a été permis grâce à une bourse délivrée par le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, et financé par l'Université Jean Monnet de Saint Etienne.

Ce manuscrit de thèse est composé en trois grandes parties. Une première partie a consisté à l'étude bibliographique de ce travail, qui expose la structure de la BHE, les modèles cellulaires permettant son étude, puis les effets de l'hypoxie sur cette barrière. Ensuite cette partie est suivie par l'exposé de nos travaux faisant échos aux trois objectifs décrits précédemment. Enfin, une discussion générale, comportant les conclusions de l'étude et ses perspectives, termine ce manuscrit.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de ce travail de thèse a été publié et a fait l'objet de communications orales ou affichées lors de congrès nationaux et internationaux.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont fait l'objet des publications suivantes :

- ✓ Hypoxic Stress Induced by Hydralazine Leads to a Loss of Blood-Brain Barrier Integrity and an increase in Efflux Transporter Activity.  
**Morgane.Chatard**, Clémentine.Puech, Frédéric.Roche, Nathalie.Perek ; *Plos One*, 2016.
  
- ✓ Hydralazine is a suitable mimetic agent of hypoxia to study the impact of hypoxic stress on in vitro blood-brain barrier model.  
**Morgane.Chatard**, Clémentine.Puech, Nathalie.Perek, Frédéric Roche  
*Soumis dans la revue Cellular Physiology and Biochemistry (en révision)*

- ✓ Blood-brain barrier cells progressively lose tight junction protein expression after repetitive hypoxic stress and set up defense mechanisms by increasing ABC transporter activities.

**Morgane.Chatard**, Sabine Palle, Frédéric.Roche, Nathalie.Perek

*Soumis dans la revue Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*

Les communications orales suivantes ont été présentées :

- ✓ Impact of repeated hypoxic stress on transendothelial transport mediated efflux pumps P-glycoprotein (Pgp) and MRP-1 on blood-brain barrier co-culture model.

**Morgane.Chatard**, Clémentine.Puech, Nathalie.Perek, Frédéric.Roche

*Early Career Physiologists' Symposium du Congrès The American Physiological Society and European Physiological Society, Juin 2016, Dublin*

- ✓ An original and suitable induction method of repeated hypoxic stress by hydralazine to investigate the integrity of an *in vitro* blood-brain barrier model.

**Morgane.Chatard**, Clémentine.Puech, Nathalie.Perek, Frédéric.Roche

*18th International Conference on Cerebral Vascular Biology and Medicine, Septembre 2016, Londres. **Prix de la meilleure communication orale***

Les communications affichées suivantes ont été présentées :

- ✓ Conséquences d'une hypoxie chimique sur un modèle de barrière hémato-encéphalique (BHE) *in vitro*.

**Morgane Chatard**, Nathalie Perek, Frédéric Roche

*Congrès du sommeil, Lille 2014. **Bourse voyage SFRMS jeune chercheur. Résumé publié dans la revue Médecine du Sommeil, janvier 2015.***

- ✓ Effects of hypoxia/normoxia cycles on membrane integrity in rodent *in vitro* blood-brain barrier model.

**Morgane Chatard**, Nathalie Perek, Frédéric Roche

*Congrès de Physiologie et de Biologie Intégrative, Strasbourg 2015. Résumé publié dans Acta Physiologica, mai 2015.*

- ✓ Effets d'inductions répétées de HIF 1 $\alpha$  sur l'intégrité membranaire d'un nouveau modèle *in vitro* de barrière hémato-encéphalique (BHE).

**Morgane Chatard**, Frédéric Roche, Nathalie Perek

*Journée de l'école doctorale EDSIS 488, 2015*

- ✓ Conséquences de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de BHE.

**Morgane.Chatard**, Clémentine.Puech, Nathalie.Perek, Frédéric.Roche

*Journée de l'Académie Française de Médecine, Mai 2016, Saint-Etienne*

- ✓ L'altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) : une approche innovante de l'atteinte parenchymateuse cérébrale dans l'hypoxie de l'apnée du sommeil. Giraud A, Sapin M, **Chatard M**, Pépin J.L, Roche F, Patural H

*Journée de l'Académie Française de Médecine, Mai 2016, Saint Etienne*

- ✓ *In vitro* studies of impact of repeated hypoxic stress on transendothelial transport mediated efflux pumps Pgp and MRP-1 of blood-brain barrier co-culture model.

**Morgane.Chatard**, Clémentine.Puech, Nathalie.Perek, Frédéric.Roche

*Congrès The American Physiological Society and European Physiological Society, Juin 2016, Dublin*

- ✓ Etude des conséquences d'une hypoxie intermittente sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de barrière-hémato-encéphalique.

**Morgane Chatard**, Clémentine Puech, Anne Briançon-Marjollet, Nathalie Perek, Frédéric Roche

*Congrès du sommeil, Strasbourg 2016.*

Enfin, ces travaux de thèse m'ont permis d'encadrer des étudiants de cursus différents :

#### 4 étudiants en Master :

- ✓ Verdière Léa (Janvier à Avril 2015) : « Mise au point d'un protocole de marquage des jonctions serrées en microscopie confocale dans le cadre d'un modèle *in vitro* de BHE».
- ✓ Younib Mehdi (Janvier à Avril 2015) : « Caractérisation d'un modèle *in vitro* de BHE».
- ✓ Fontaney Quentin (Avril à Juin 2015) : « Influence d'une hypoxie intermittente chimique sur la sécrétion de facteurs inflammatoires par un modèle *in vitro* de BHE ».
- ✓ Caire Robin (Avril à Juin 2016) : « Etude de la voie inflammatoire sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de BHE).

#### Une étudiante en licence 3 de Biologie :

- ✓ Saidi Fadila (Janvier 2015) : « Optimisation d'un modèle *in vitro* de BHE »

#### Un étudiant en IUT génie biologique :

- ✓ Gery Nathanaël (Avril à Juin 2014) : « Etudes des conséquences d'une hypoxie chimique sur un modèle *in vitro* de BHE en monoculture ».

#### Une étudiante en BTS :

- ✓ Dumas Romane (Avril à Juillet 2015) : « Mise en place d'un modèle de BHE *in vitro* inversé ».

**Première partie :**  
**Etude**  
**Bibliographique**

# Chapitre 1 : La barrière hémato-encéphalique (BHE)

Le système nerveux central (SNC) est le système le plus sensible et le plus critique de l'organisme des vertébrés. En effet, ce système régule les fonctions végétatives, sensitivo motrices et cognitives. Il est composé essentiellement de neurones et de cellules gliales (Ogunshola, 2011). Son bon fonctionnement nécessite un contrôle du milieu extracellulaire cérébral. Par ailleurs, les demandes métaboliques du cerveau étant nombreuses (le SNC consomme, à lui seul, 20% de l'oxygène), l'interface entre le SNC et la circulation sanguine systémique doit posséder des mécanismes très efficaces afin de faciliter le transport des nutriments spécifiques. Elle doit aussi pouvoir réguler l'équilibre ionique entre les compartiments sanguin et cérébral, ainsi que limiter le passage dans le cerveau des substances pouvant être toxiques (Ronaldson and Davis, 2015). Cette interface entre le SNC et le sang s'appelle la barrière hémato-encéphalique (BHE).

## **1. Historique de la BHE**

La BHE a été décrite pour la première fois par Paul Ehrlich en 1885. En effet dans ses travaux, il a observé que l'injection de colorant hydrosoluble dans le système circulatoire colorait tous les organes à l'exception du cerveau et de la corde spinale. Ehrlich attribua cette observation à une faible affinité du tissu nerveux pour ce colorant. Cependant l'étudiant de Paul Ehrlich, Edwin Goldmann, montra que la conclusion de son mentor était erronée. En effet, il a repris les travaux d'Ehrlich et a injecté un colorant, le bleu trypan, directement dans le liquide cébrospinal (CSF). Il a montré que tous les types cellulaires du cerveau étaient colorés mais le colorant n'a pas pu pénétrer en périphérie. Ces résultats suggéraient l'existence d'une barrière au colorant entre le SNC et la circulation périphérique (Hawkins and Davis, 2005). Des années plus tard, l'équipe de Reese confirme ces résultats grâce à la microscopie électronique, en décrivant la présence d'une barrière cellulaire composée de cellules endothéliales cérébrales qui tapissent le système vasculaire cérébrale (Reese and Karnovsky, 1967). Lewandowsky est le premier a utilisé le terme de barrière hémato-encéphalique (BHE) (Hawkins and Davis, 2005)

(Figure 1). Au départ l'appellation de BHE était limitée aux cellules endothéliales cérébrales. De nos jours, le terme BHE définit une unité neurovasculaire multicellulaire (UNV) (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012).

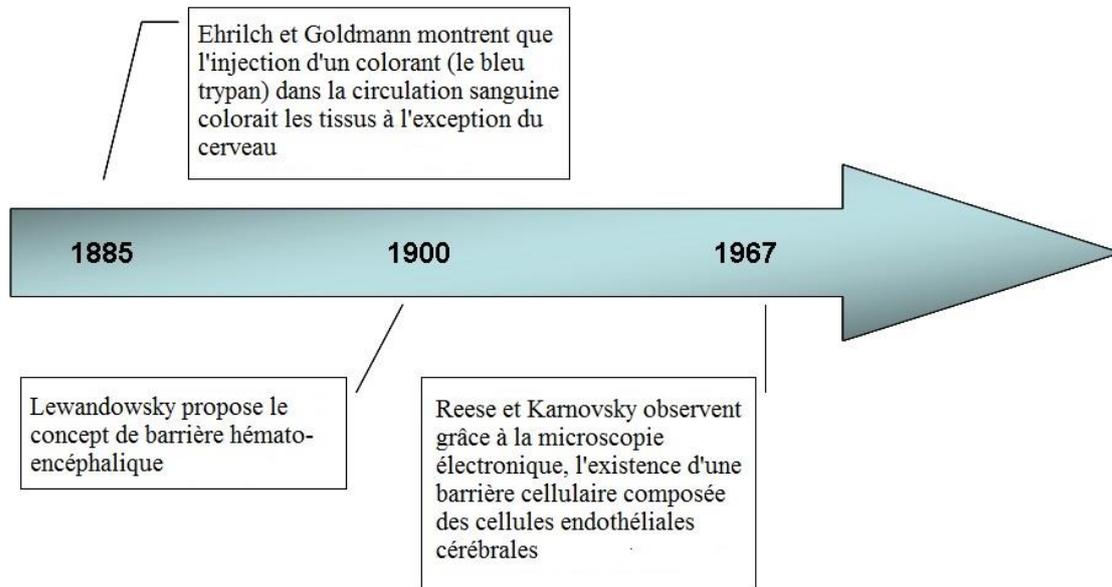


Figure 1 : Etapes clés de la recherche sur la BHE

## 2. La BHE : une structure complexe et organisée

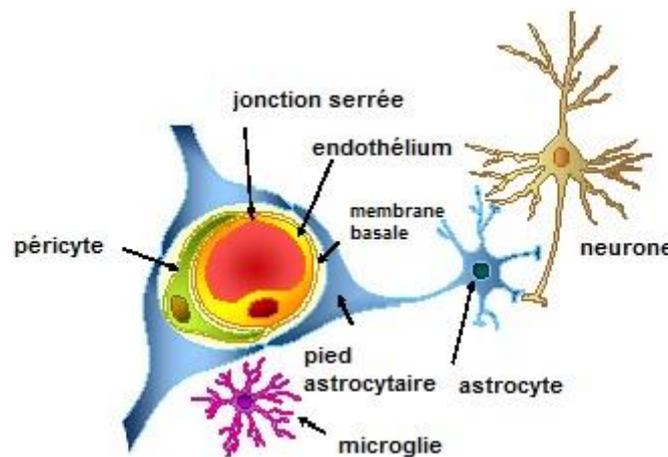
### 2.1. Une barrière biologique organisée

La BHE est constituée de cellules endothéliales des capillaires ou microvaisseaux cérébraux, d'astrocytes, de péricytes et de cellules microgliales. Certains auteurs incluent les neurones dans la BHE (Wilhelm *et al.*, 2011) mais leur présence au sein de cette barrière est très controversée.

#### 2.1.1. Les capillaires cérébraux : support anatomique de la BHE

Les capillaires cérébraux sont constitués d'une monocouche de cellules endothéliales jointives qui reposent sur une membrane basale continue, dans laquelle les péricytes sont

emboîtés. Ces capillaires sont entourés d'un manchon ininterrompu de pieds astrocytaires (**Figure 2**). En effet, l'équipe de Mathiisen a montré un chevauchement serré des péricytes et des astrocytes autour des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Mathiisen *et al.*, 2010). Les astrocytes sont également étroitement liés aux neurones et à la microglie. De la lumière du capillaire vers la périphérie, sont observés les cellules endothéliales, une lame basale, les péricytes et enfin les astrocytes (Hawkins and Davis, 2005)



**Figure 2: structure des capillaires cérébraux (Abbott, 2013).** Les cellules endothéliales sont étroitement liées aux péricytes avec lesquelles elles partagent une membrane basale commune et délimitent la face interne des capillaires cérébraux. Les astrocytes émettent de nombreux prolongements, appelés pieds astrocytaires, qui forment un manchon continu autour des capillaires cérébraux. Les astrocytes sont également liés aux neurones et aux cellules de la microglie.

### 2.1.2. Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales

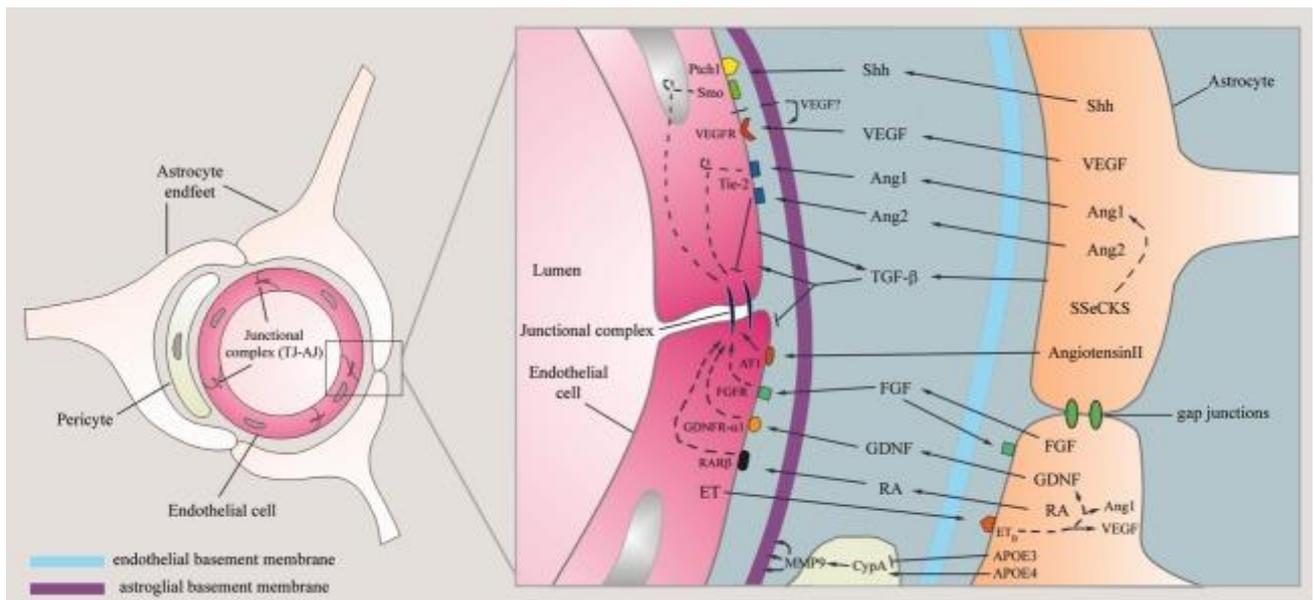
Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales forment la base anatomique de la BHE et possèdent des caractéristiques structurales et métaboliques qui permettent de différencier l'endothélium des capillaires cérébraux de celui des autres endothélia (Ballabh *et al.*, 2004). Parmi ces caractéristiques il faut noter que les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sont polarisées et connectées entre elles par des jonctions intercellulaires spécifiques (jonctions serrées et jonctions adhérentes qui seront développées dans un prochain paragraphe), qui leur permettent de limiter les mouvements moléculaires et ioniques entre les cellules (mouvement paracellulaire) (Daneman, 2012). Par ailleurs, ces cellules sont riches en mitochondries. Il est estimé que les capillaires cérébraux possèdent cinq à six fois plus de mitochondries que les capillaires du muscle squelettique. Cette richesse en

mitochondries s'explique par les besoins énergétiques importants de ces cellules, notamment pour le maintien de leurs caractéristiques structurales et de leurs activités métaboliques, telles que le transport actif des nutriments au cerveau (Persidsky *et al.*, 2006). Enfin ces cellules endothéliales microvasculaires cérébrales ont également comme caractéristique d'avoir une faible densité de vésicules endocytiques et pinocytiques (invagination de la membrane de la cellule formant une vésicule et permettant le transport de nutriment ou de liquide) (Persidsky *et al.*, 2006; Daneman, 2012). L'ensemble de ces propriétés tendent à restreindre les échanges entre le sang et le cerveau.

### 2.1.3. Les astrocytes

Les astrocytes sont les cellules gliales majoritaires au sein du SNC. Ce sont des cellules en forme d'étoile, dont leurs extrémités se finissent par un renflement appelé pied astrocytaire. Ils recouvrent plus de 99% de l'endothélium de la BHE. L'interaction des astrocytes avec les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales induit et module le développement de la BHE ainsi que le phénotype particulier de ces cellules endothéliales. En effet, les astrocytes induisent le phénotype de barrière des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales en libérant des facteurs solubles tels que VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), l'oxide nitrique (Ogunshola, 2011), GDNF (glial-derived neurotrophic factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) ou IL-6 (interleukine-6) (Wilhelm and Krizbai, 2014) (**Figure 3**). De plus, cette interaction favorise la formation des jonctions serrées présentes au sein des cellules endothéliales, réduit la surface des jonctions communicantes (gap junctions) et augmente la densité des astrocytes (Tao-Cheng and Brightman, 1988; Abbott, 2002). Les interactions des pieds astrocytaires, avec le pôle basal des capillaires cérébraux, sont importantes dans la régulation de l'activité neuronale, dans la synchronisation des niveaux de métabolites avec le flux sanguin, et dans la vasodilatation (Keaney and Campbell, 2015). Des études récentes ont montré que les astrocytes sécrétaient de nombreuses molécules, qui favorisaient et maintenaient le caractère imperméable de la BHE. En effet, la sécrétion d'alipoprotéine E, par exemple, régule les jonctions serrées des cellules endothéliales, par l'intermédiaire des récepteurs LP1 (low density lipoprotein receptor-related protein 1) présents à la fois au niveau des péricytes et des cellules endothéliales (Nishitsuji *et al.*, 2011). Par ailleurs, ces pieds astrocytaires possèdent différentes protéines qui interviennent au sein de la BHE. En effet, le complexe dysroglycane-dystrophine lie ces pieds astrocytaires à la membrane

basale par l'intermédiaire d'agrine. Une autre protéine présente au sein de ces prolongements est l'aquaporine 4, qui est un canal spécifique au transport de l'eau. Ces aquaporines 4 permettent de réguler l'homéostasie aqueuse du SNC (Haj-Yasein *et al.*, 2011; Daneman and Prat, 2015). Enfin, ces pieds astrocytaires expriment également sur leurs membranes lumineales, des protéines spécifiques telles que le transporteur 1 au glucose (GLUT-1), la connexine-43 et les canaux au potassium (Wilhelm and Krizbai, 2014).



**Figure 3 : Interactions cellules endothéliales-astrocytes permettant le maintien des propriétés de barrière de la BHE (Prat *et al.*, 2001).** Les astrocytes sécrètent des facteurs qui sont cruciaux dans l'établissement et le maintien de la BHE.

#### 2.1.4. Les péricytes

Les péricytes sont des cellules plates, indifférenciées, du tissu conjonctif contractile qui se développe autour des parois des capillaires. Il a été montré que les péricytes cérébraux possédaient des protéines contractiles amenant à la conclusion qu'ils pourraient réguler le flux sanguin des capillaires (Bandopadhyay *et al.*, 2001). Cependant ces péricytes microvasculaires ne présentent pas l'isoforme  $\alpha$ -actine, ce qui remettrait en question l'implication des péricytes dans la contraction capillaire (Lai and Kuo, 2005). De plus, il a été montré *in vitro* que les péricytes ont une association physique étroite avec l'endothélium, notamment grâce aux jonctions communicantes (gap junctions) qui existent entre les péricytes et les cellules endothéliales (Lai and Kuo, 2005). Cette association est d'autant plus importante que les

péricytes possèdent des prolongements cellulaires, qui pénètrent dans la membrane basale et recouvrent approximativement 20 à 30% de la circonférence microvasculaire (Bonkowski *et al.*, 2011). En effet la vascularisation du SNC est riche en péricytes en comparaison des vaisseaux périphériques. Le ratio péricytes-cellules endothéliales est estimé à un pour trois, alors qu'au niveau du muscle il est de un pour cent (Daneman and Prat, 2015; Keaney and Campbell, 2015). La contribution des péricytes sur le phénotype de la BHE a longtemps été négligée et reste encore à déterminer à ce jour. Cependant, plusieurs études *in vitro* suggèrent que les péricytes favoriseraient la fonction de la BHE (Hayashi *et al.*, 2004; Hori *et al.*, 2004a). En effet, les péricytes seraient nécessaires à la formation de cette BHE telle que la régulation du trafic vésiculaire dans les cellules endothéliales du SNC, la formation des jonctions serrées ou la polarisation des astrocytes (Armulik *et al.*, 2010). Enfin, certains péricytes de la BHE proviendraient d'une lignée de macrophage, possédant des capacités de phagocytose des protéines exogènes (Williams *et al.*, 2001).

Tout ceci concourt à impliquer les péricytes dans l'induction et/ou le maintien des propriétés de barrière de la BHE. Ces points seront détaillés dans le paragraphe *Une barrière dynamique*.

### **2.1.5. La membrane basale**

La membrane basale sert de support aux cellules endothéliales. Elle est composée principalement de collagène de type IV, de laminine et de fibronectine. La membrane basale présente également des charges anioniques portées soit par des protéoglycanes riches en héparanes sulfates, soit par des glycoprotéines riches en acides sialiques. Au sein du SNC, la membrane basale diffère un peu puisque les vaisseaux sanguins sont entourés par deux couches de membrane basale : la membrane basale endothéliale interne et la membrane basale parenchymateuse externe, appelée aussi la *glia limitans* (Daneman and Prat, 2015). La membrane basale interne est sécrétée par les cellules endothéliales et les péricytes qui y sont inclus. La membrane basale externe est sécrétée par les astrocytes. La liaison des astrocytes à cette membrane basale se fait par des interactions protéiques. De plus, les deux couches de la membrane basale diffèrent dans leur composition moléculaire. En effet la couche interne est riche en laminines alpha 4 et alpha 5 tandis que la couche externe est riche en laminines alpha 1 et alpha 2 (Daneman, 2012). Par ailleurs, les protéines de la membrane basale favorisent

l'expression des protéines des jonctions présentes au sein des cellules endothéliales (Savettieri *et al.*, 2000) et les interactions des cellules avec la membrane basale sont importantes pour le maintien de leur phénotype et l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaires (Tilling *et al.*, 2002). En effet, une altération de la protéine laminine astrocytique, présente au sein de la membrane basale, permet le passage des péricytes d'un état de repos à celui de phénotype contractile, qui a pour conséquence d'entraîner une diminution des aquaporines 4 des pieds astrocytaires, mais cette altération conduit également à la diminution de l'expression des jonctions serrées des cellules endothéliales (Yao *et al.*, 2014). Enfin la dégradation de cette membrane basale est fortement associée à une augmentation de la perméabilité de la BHE dans des conditions pathologiques, qui conduit, à *posteriori*, à une rupture de la BHE (Rascher *et al.*, 2002; Jian Liu and Rosenberg, 2005).

En conclusion, cette membrane basale fournit un point d'ancrage pour de nombreux processus de signalisation du système vasculaire, mais forme également une barrière supplémentaire aux molécules et aux cellules voulant pénétrer dans le tissu neuronal.

### **2.1.6. Les neurones**

Les neurones sont des cellules essentielles du système nerveux. Ils sont constitués de trois parties : le soma, les dendrites et l'axone. Les neurones ressentent les modifications de l'environnement, communiquent ces informations à d'autres neurones puis commandent les réponses de l'organisme à ces informations.

Lee et al. ont démontré que la perméabilité accrue de la BHE pouvait être un évènement compensatoire, ce qui suggère que les communications neuronales-microvasculaires pourraient moduler cette perméabilité (Lee *et al.*, 1999). En effet, les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales associées, ou non, aux astrocytes sont innervées par des neurones de types noradrenergiques, serotonergiques (Cohen *et al.*, 1997), cholinergiques (Tong and Hamel, 1999) et GABAergiques (Vaucher *et al.*, 2000). La perte significative des innervations cholinergiques des microvaisseaux corticaux, dans la maladie d'Alzheimer, est associée à une altération cérébrovasculaire (Tong and Hamel, 1999). De plus, Tontsch et al. ont montré que les neurones induisaient l'expression d'enzymes spécifiques aux cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (Tontsch and Bauer, 1991). En conclusion, si le rôle des neurones

dans le développement du phénotype de la BHE n'a pas encore été démontré, il semblerait cependant qu'ils puissent réguler certains aspects des fonctions de la BHE.

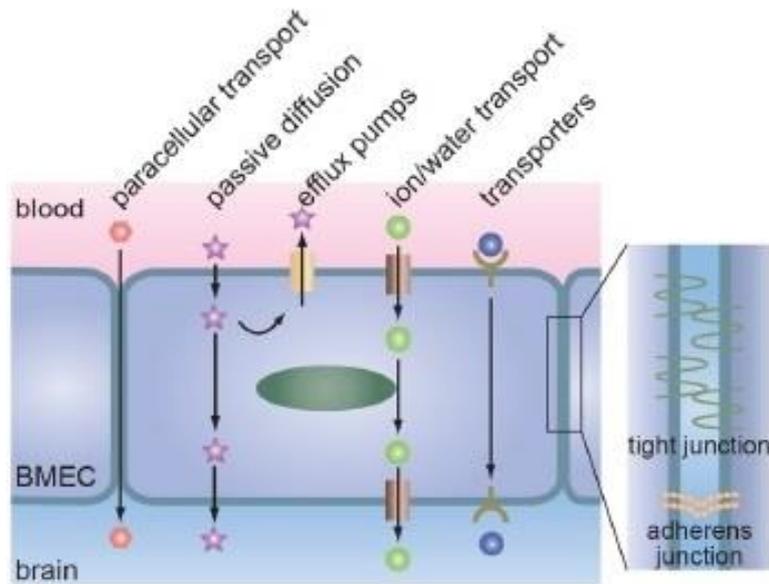
### 2.1.7. La microglie

La microglie est un terme qui désigne les cellules microgliales. Les cellules microgliales ont été décrites pour la première fois par Del Rio Hortega et al. dans les années 1920. Ce sont des cellules immunitaires résidents au sein du SNC, qui représentent environ 5% de la population cellulaire du cerveau. La microglie agit comme principale ligne de défense, après la BHE, et joue un rôle essentiel dans les réponses de l'immunité innée (Ginhoux *et al.*, 2010). En condition physiologique, ces cellules présentent une morphologie ramifiée et expriment des molécules associées à la phagocytose, permettant l'élimination des déchets relargués par les neurones (Venneti *et al.*, 2009). Cependant, les cellules microgliales sont prédisposées à être activées lors de blessures cérébrales et de stimuli inflammatoires ou immunologiques. Une fois activée, la microglie peut exister sous deux formes. Dans le cas classique, la microglie activée va sécréter des cytokines proinflammatoires, tels que l'interleukine-1 $\beta$ , des espèces réactives à l'oxygène (ROS) et le facteur de nécrose tumorale (TNF- $\alpha$ ). Le deuxième état d'activation s'effectue principalement lors de réparation de tissus, de phagocytoses de neurones endommagés ou de matériels étrangers. Dans ce cas la microglie sécrète des chimiokines et du VEGF, et active des voies neurotrophiques (Aguzzi *et al.*, 2013). Par ailleurs lors de leur activation, et quelque soit l'activation, ces cellules subissent des altérations morphologiques sévères (Rock and Peterson, 2006). De plus, la microglie semble influencer les propriétés de la BHE. En effet, l'interaction entre les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales et la microglie favorise les fonctions de la BHE, notamment en permettant le maintien de l'homéostasie cérébrale. Cependant les mécanismes, participant à cette homéostasie, ne sont pas encore bien connus (Choi and Kim, 2008). Enfin, les cellules endothéliales cérébrales peuvent également sécréter des molécules, qui vont induire l'activation de la microglie. Par exemple, la thrombine (protéase neurotrophique sécrétée par les cellules endothéliales cérébrales de patients atteints de la maladie d'Alzheimer) augmente les taux d'oxyde nitrique qui entraîne l'activation de la microglie, et conduit à la perte des neurones dopaminergiques (Huang *et al.*, 2008).

Tous les éléments, qui ont été décrits, permettent à la BHE d'être une barrière à la fois physique, physiologique et métabolique. Tous ces phénotypes de barrière régulent les échanges entre le sang et le SNC, permettant ainsi de maintenir l'homéostasie cérébrale essentielle pour le fonctionnement du cerveau. Les différents phénotypes de barrière de la BHE font l'objet des paragraphes suivants.

## **2.2. Une barrière physique formée par des complexes jonctionnels intercellulaires**

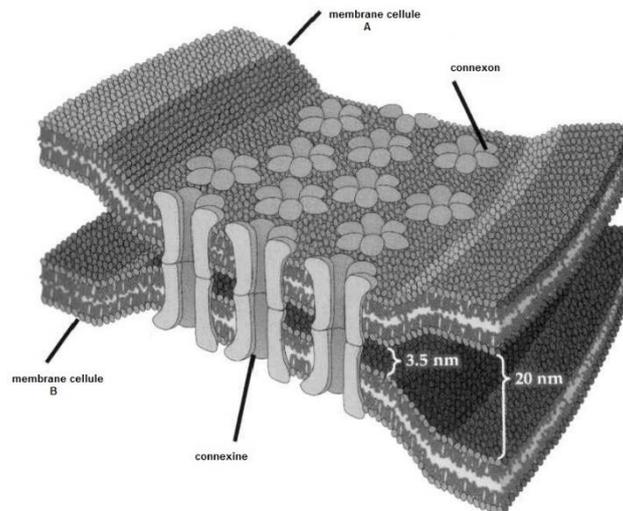
Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales contrôlent le passage des composés entre le compartiment sanguin et le compartiment cérébral. Cette fonction est régulée par deux voies : les voies paracellulaire et transcellulaire. La voie transcellulaire définit le passage des composés plasmatiques à travers le cytoplasme des cellules endothéliales grâce à des systèmes de transports vésiculaires. La voie paracellulaire, voie qui va être décrite dans ce paragraphe, est régulée par l'ouverture de complexes protéiques et/ou par le réarrangement de leur architecture (Bazzoni and Dejana, 2004). Ces complexes protéiques sont constitués des jonctions, présents au niveau de l'interface endothéliale des microvaisseaux cérébraux. Ces jonctions sont composées de jonctions adhérentes, de jonctions serrées, et certains auteurs incluent également les jonctions communicantes. Si les jonctions communicantes servent essentiellement d'intermédiaire dans la communication intercellulaire, les jonctions adhérentes et les jonctions serrées permettent de restreindre la perméabilité de l'endothélium cérébral (**Figure 4**) (Hawkins and Davis, 2005).



**Figure 4: Présence de jonctions entre les cellules endothéliales cérébrales de la BHE d'après Wong *et al.* (Wong *et al.*, 2013).** Les jonctions serrées et les jonctions adhérentes sont présentes à l'interface de deux cellules endothéliales cérébrales adjacentes. Ces jonctions vont permettre de restreindre la perméabilité de la BHE.

### 2.2.1. gap junctions

Les gap junctions sont des canaux qui communiquent directement avec le cytoplasme de deux cellules adjacentes, permettant le passage intercellulaire de petits solutés comme les ions ou les seconds messagers (Evans and Martin, 2002). Ces canaux intercellulaires sont composés par deux héli-canaux, appelés connexines, provenant chacun de deux cellules voisines. Chaque connexine est formée par six connexons qui forment le canal (**Figure 5**).



**Figure 5 : Structure des gap junctions (Evans and Martin, 2002 modifié).** Les gap junctions sont formées par deux connexines, provenant chacune des membranes de deux cellules voisines. Chaque connexine est formée par six connexons qui délimitent un canal.

Il existe au moins vingt isoformes de connexines (Saez *et al.*, 2003). Au sein des cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux, il semblerait que ce soit les connexines-40 et -37 qui soient exprimées (Bazzoni and Dejana, 2004).

La fonction principale des jonctions communicantes est de permettre une communication directe entre les cellules. Cependant les connexines interviennent dans des processus de signalisation, puisque ces canaux relâchent, de façon paracrine (dans leur entourage), des signaux tels que du monoxyde d'azote (NO), des prostaglandines et de l'ATP (Saez *et al.*, 2003). Enfin ces gap junctions pourraient être des régulateurs clés de la BHE, puisque les connexines semblent co-localisées avec les protéines des jonctions serrées, afin de stabiliser la communication entre les cellules et de maintenir l'intégrité de la BHE. Seulement les mécanismes restent encore peu connus (Gaete *et al.*, 2014).

### 2.2.2. Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes sont spécialisées dans l'interaction cellules-cellules. Elles sont omniprésentes dans les systèmes vasculaires, et permettent l'adhésion entre les cellules endothéliales (Hawkins and Davis, 2005). Les jonctions adhérentes sont formées par des cadhérines et par des caténines. Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires,

composées d'une unique chaîne transmembranaire. Cette chaîne transmembranaire interagit avec du calcium pour permettre l'adhésion aux cellules adjacentes (Dejana and Del Maschio, 1995). Les cellules endothéliales cérébrales expriment à leur surface une cadhérine spécifique, appelée VE-cadhérine (vascular endothelial-cadhérin). Au sein des jonctions adhérentes, les caténines jouent un rôle analogue aux protéines zonula occludens des jonctions serrées (décrites dans le prochain paragraphe), en permettant d'ancrer les cadhérines, et plus particulièrement les VE-cadhérines, à l'actine du cytosquelette (Hawkins and Davis, 2005). En effet, la queue cytoplasmique des VE-cadhérines est liée aux  $\beta$ - et  $\gamma$ -caténines. Ces protéines sont liées à l'actine par l'intermédiaire des  $\alpha$ -caténines, ce qui permet de stabiliser l'association des jonctions adhérentes au cytosquelette. Steiner et al. ont démontré, sur la lignée immortalisée de cellules endothéliales cérébrales de souris bEnd.3, que les protéoglycanes héparanes sulfates contribuaient aux propriétés de barrière des jonctions adhérentes, en promouvant la localisation des VE-cadhérines et des  $\beta$ -caténines au sein de ces jonctions adhérentes (Steiner *et al.*, 2014). Par ailleurs, les VE-cadhérines interagissent avec des protéines de signalisation spécifiques aux cellules endothéliales, telles que le récepteur 2 au VEGF ou les protéines de la voie de signalisation des phosphatidylinositol-3-kinases (Bazzoni and Dejana, 2004; Ronaldson and Davis, 2015).

Bien que les VE-cadhérines soient les cadhérines dominantes des jonctions adhérentes, ce ne sont pas les seules exprimées par les cellules endothéliales cérébrales. En effet, les N-cadhérines sont regroupées sur la partie basale des cellules endothéliales, qui est en contact avec les astrocytes et les péricytes. Par ailleurs, Williams et al. ont identifié une région du domaine extracellulaire des N-cadhérines qui était responsable de l'activation des récepteurs au FGF (fibroblast growth factor). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules endothéliales et sont capables d'induire la croissance cellulaire, ce qui suggère que ces N-cadhérines pourraient moduler l'angiogénèse (Williams *et al.*, 2001).

En conclusion, les jonctions adhérentes présentes au sein des cellules endothéliales cérébrales sont des structures clés dans le maintien des propriétés spécifiques de ces cellules, notamment pour la perméabilité aux molécules inflammatoires.

Cependant bien qu'une rupture, au sein de ces jonctions adhérentes, peut amener à une augmentation de la perméabilité de la BHE, ce sont principalement les jonctions serrées qui confèrent une imperméabilité paracellulaire et une forte résistance électrique transendothéliale

(TEER) à la BHE (Bazzoni and Dejana, 2004; Hawkins and Davis, 2005). Ces complexes multiprotéiques sont maintenus, de surcroît, par les astrocytes (Ronaldson and Davis, 2015).

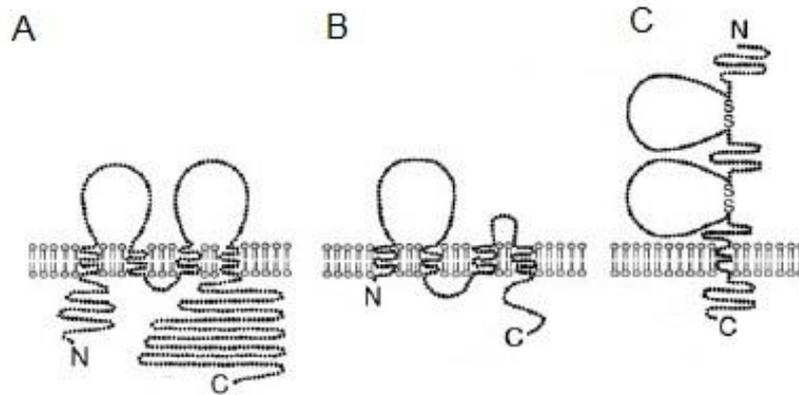
### **2.2.3. Les jonctions serrées**

Les jonctions serrées, des cellules endothéliales cérébrales, servent d'intermédiaire dans l'adhésion et la communication entre des cellules avoisinantes. Plus spécifiquement ces jonctions serrées régulent la perméabilité cellulaire et maintiennent la polarité des cellules, en distribuant de façon asymétrique les constituants membranaires (Bazzoni and Dejana, 2004; Hawkins and Davis, 2005). Physiologiquement, ces jonctions serrées permettent un contact intime entre les cellules formant ainsi une barrière continue. Ce contact favorise la régulation de l'homéostasie du SNC, en restreignant les voies de diffusion paracellulaire entre les cellules endothéliales et les substances présentes dans la circulation sanguine et/ou les cellules environnantes, à l'exception des petites molécules ou celles de nature lipidique qui sont solubles dans la membrane plasmique des cellules (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). Par ailleurs, ces jonctions serrées empêchent la diffusion libre des ions, définissant ainsi une résistance électrique transendothéliale (TEER) élevée au sein de la BHE. Cette TEER est considérée comme le marqueur le plus sensible de l'étanchéité des jonctions serrées (Wilhelm and Krizbai, 2014; Ronaldson and Davis, 2015). Enfin, ces jonctions serrées sont formées par un réseau dynamique, de protéines interactives, situé sur la surface apicale des cellules endothéliales cérébrales (Dyrna *et al.*, 2013). En effet, elles sont constituées principalement par trois types de protéines transmembranaires spécifiques (occludines, claudines, JAMs), qui sont liées aux filaments de cytosquelette par l'interaction avec des protéines cytoplasmiques (zonula occludens, ZO) (Ronaldson and Davis, 2015).

#### **2.2.3.1. Les occludines**

Les occludines sont des phosphoprotéines, monomériques, de 60 à 65 kDa. Ce sont les premières protéines des jonctions serrées à avoir été décrites (Dyrna *et al.*, 2013). Elles sont fortement exprimées par les cellules endothéliales des vaisseaux du SNC. Les occludines possèdent quatre domaines transmembranaires, trois domaines cytoplasmiques, deux

extrémités N- et C-terminales intracellulaires et deux boucles extracellulaires (**Figure 6A**). Leur domaine C-cytoplasmique est impliqué dans l'association des occludines avec le cytosquelette grâce aux domaines Guanyl kinase (GK) de certaines protéines cytoplasmiques (ZO) (Hawkins and Davis, 2005). Par ailleurs, les occludines possèdent de nombreux sites de phosphorylation. Leur état de phosphorylation semble être impliqué dans l'association à la membrane de la cellule, mais également dans la perméabilité des jonctions serrées. En raison de ces nombreux sites de phosphorylation, les occludines ont davantage une fonction de contrôle que de développement au sein des jonctions serrées (Dyrna *et al.*, 2013). Cependant la phosphorylation des résidus sérine/thréonine semble nécessaire à la mise en place des jonctions serrées (Sakakibara *et al.*, 1997). Ensuite, les occludines s'assemblent pour former des dimères ou des oligomères afin de restreindre la perméabilité paracellulaire, de maintenir la TEER de la BHE et de contrôler la formation de pores aqueux. Une altération de l'expression des occludines est associée à un dysfonctionnement de la BHE. En effet, une surexpression des occludines conduit à une diminution de la perméabilité paracellulaire et à une forte TEER (Persidsky *et al.*, 1997). Enfin des études de knockout, et de knockdown, ont indiqué que les occludines n'étaient pas essentielles à la formation des jonctions serrées, malgré le fait qu'une diminution de l'expression de cette protéine soit associée à une altération de la BHE dans de nombreux états pathologiques (Bolton *et al.*, 1998; Huber *et al.*, 2002; Brown and Davis, 2005). Ceci a été confirmé par l'étude de Saitou et al. Néanmoins, ces auteurs ont également montré que ces souris déficientes en occludine, présentaient des calcifications au niveau du SNC, ce qui pourrait suggérer que les occludines réguleraient spécifiquement le flux de calcium à travers la BHE (Saitou *et al.*, 2000).



**Figure 6 : structure des occludines, claudines et JAMs d'après Schneeberger et al. (Schneeberger and Lynch, 2004).** (A) Les occludines possèdent quatre domaines transmembranaires, trois domaines cytoplasmiques, deux extrémités N- et C-terminales intracellulaires et deux boucles extracellulaires. (B) Les claudines sont composées de quatre domaines transmembranaires, deux queues N- et C-terminales intracellulaires et deux boucles extracellulaires. (C) Les JAMs sont composées d'un unique domaine transmembranaire, deux boucles extracellulaires et d'une queue intracellulaire

### 2.2.3.2. Les claudines

Les claudines sont des phosphoprotéines, de 20 à 27 kDa, ayant une topographie membranaire similaire à celle des occludines. En effet, elles sont composées de quatre domaines transmembranaires, de deux queues N- et C-terminales intracellulaires et de deux boucles extracellulaires qui permettent de lier les claudines entre elles, afin de former des dimères (**Figure 6B**) (Bazzoni and Dejana, 2004; Dyrna *et al.*, 2013; Ronaldson and Davis, 2015). Contrairement aux occludines, les claudines sont essentielles à la formation des jonctions serrées. Les auteurs font l'hypothèse que les claudines seraient la structure vitale des jonctions serrées, tandis que les occludines apparaîtraient plus comme des structures de support (Hawkins and Davis, 2005). En effet, les claudines forment des interactions entre les cellules endothéliales adjacentes, afin de contribuer à la « fermeture » physiologique de ces jonctions serrées (Ronaldson and Davis, 2015). A ce jour, quatre claudines ont été identifiées au sein de la BHE : la claudine-1, la claudine-3, la claudine-5 et la claudine-12. Cependant la claudine-5 reste celle qui est la plus fortement exprimée par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Bernacki *et al.*, 2008; Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). Une augmentation de l'expression de claudine-5, par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de rat *in vitro*, diminue la perméabilité de ces cellules (Ohtsuki and Terasaki, 2007). A l'inverse, Nitta et al. ont observé

une augmentation de la perméabilité, pour les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 800 Da, chez des souris knockout pour la claudine-5. Ceci suggère que les claudines-5 sont bien impliquées dans l'étanchéité des jonctions serrées, et la mise en place d'une barrière paracellulaire (Nitta *et al.*, 2003; Dyrna *et al.*, 2013; Wilhelm and Krizbai, 2014).

### **2.2.3.3. Les protéines JAMs**

Les protéines JAMs (Junctional adhesion molecules) : sont des glycoprotéines, de poids moléculaires avoisinant les 40 kDa, qui appartiennent à la famille des immunoglobulines (Ig). Cette famille est composée d'un unique domaine transmembranaire, de deux boucles extracellulaires et d'une queue intracellulaire (**Figure 6C**) (Hawkins and Davis, 2005; Dyrna *et al.*, 2013; Wilhelm and Krizbai, 2014). Au sein de la BHE, il existe trois isoformes de protéines JAMs : JAM-A, JAM-B et JAM-C (anciennement appelées JAM-1,-2 et -3). Ces protéines JAMs sont localisées au niveau des régions de contact des cellules, réduisent les flux paracellulaires en favorisant l'adhésion intercellulaire, et permettent la migration transendothéliale des leucocytes à travers la BHE (Bazzoni and Dejana, 2004; Hawkins and Davis, 2005; Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). La protéine la plus étudiée est JAM-A, qui au sein des cellules endothéliales cérébrales, participe à la formation des jonctions serrées et intervient dans la perméabilité paracellulaire (Wilhelm and Krizbai, 2014). Une perte d'expression de la protéine JAM-A, est directement corrélée à une rupture de la BHE. En effet des études, sur la lignée immortalisée de cellules endothéliales cérébrales humaines (hCMEC/d3), ont montré qu'une stimulation inflammatoire conduisait à une augmentation de la diffusion paracellulaire, qui était corrélée à une dissociation de la protéine JAM-A des jonctions serrées (Haarmann *et al.*, 2010). Ces résultats ont permis de conclure sur le rôle des protéines JAMs, et plus particulièrement la protéine JAM-A, dans le maintien de l'intégrité de la BHE.

Pour le bon fonctionnement physiologique de la BHE, la restriction du transport paracellulaire des solutés, nécessite l'association des protéines JAMs, occludines et claudines, avec des protéines présentes dans le cytoplasme des cellules endothéliales cérébrales. Ces protéines cytoplasmiques incluent les protéines zonula occludens, les cingulines, les protéines AF-6 et les protéines 7H6.

#### **2.2.3.4. Les protéines cytoplasmiques**

**Les protéines zonula occludens (ZO)** : appartiennent à la famille des protéines MAGUK (membrane-associated guanylate kinase-like) qui sont impliquées dans le regroupement des complexes protéiques des jonctions serrées, à la membrane des cellules. Ces protéines sont composées de trois domaines PDZ (post synaptic density protein, Drosophila disc large tumor suppressor, ZO-1 protein), d'un domaine GK (Guanyl Kinase-like) et d'un domaine SH3 (SRC Homology 3) (Bernacki *et al.*, 2008). Ce dernier domaine est important pour les signaux de transduction (Dyrna *et al.*, 2013). Au niveau des complexes protéiques des cellules endothéliales, trois protéines MAGUK ont été identifiées : ZO-1, ZO-2 et ZO-3. La protéine **ZO-1** est une phosphoprotéine cytoplasmique, de 220 kDa fortement exprimée par les cellules endothéliales de la BHE, qui interagit avec les protéines transmembranaires des jonctions serrées, afin de les lier à l'actine du cytosquelette. En effet, l'interaction de la protéine ZO-1 avec les claudines se fait par l'intermédiaire de son domaine PDZ-1, qui se lie directement à l'extrémité C-terminale des claudines. Les occludines interagissent avec le domaine GK de ZO-1. Enfin les protéines JAMs s'associent à ZO-1 au niveau des domaines PDZ-2 et PDZ-3 (Dyrna *et al.*, 2013). La connexion au cytosquelette se fait ensuite grâce à l'interaction des terminaisons C-terminales de ZO-1 avec l'actine (Bernacki *et al.*, 2008). Cette association avec le cytosquelette est nécessaire pour la stabilité et la fonction des jonctions serrées. En effet une dissociation de la protéine ZO-1, du complexe protéique des jonctions serrées, est souvent associée à une augmentation de la perméabilité membranaire (Abbruscato and Davis, 1999). Par ailleurs, la protéine ZO-1 jouerait également un rôle de messenger, afin de communiquer l'état des jonctions serrées à l'intérieur de la cellule, et réciproquement (Hawkins and Davis, 2005). De plus plusieurs pathologies du SNC, associées à un stress oxydatif, sont corrélées à une altération de l'expression de la protéine ZO-1 au sein du complexe jonctionnel, amenant à une rupture de la BHE (Jiao *et al.*, 2011). Enfin, en plus de son association avec les jonctions serrées, la protéine ZO-1 interagit avec les jonctions adhérentes et les jonctions communicantes (Hawkins and Davis, 2005). La protéine **ZO-2** est une phosphoprotéine cytoplasmique, de 160 kDa, qui possède une forte homologie avec la protéine ZO-1. Elle est également exprimée par les cellules endothéliales de la BHE, mais sa fonction est bien moins connue que celle de la protéine ZO-1. Cependant elle interviendrait comme constituant des jonctions serrées, en interagissant avec l'actine, mais elle serait également impliquée dans la signalisation de facteurs

de transcription (Dyrna *et al.*, 2013). La dernière protéine MAGUK exprimée par les cellules endothéliales est la protéine **ZO-3**. C'est une phosphoprotéine, de 130 kDa, mais son rôle au sein de la BHE n'est pas encore bien décrit (Inoko *et al.*, 2003).

**Les protéines cingulines** sont des phosphoprotéines, de 140 à 160 kDa, localisées dans le cytoplasme. Elles sont associées aux protéines ZO-1, aux myosines et aux protéines AF-6. Cette interaction amplifie le caractère d'échafaudage entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette, par l'intermédiaire de forces de transduction (Bernacki *et al.*, 2008).

**Les protéines AF-6** sont des protéines cytoplasmiques, de 180 kDa, qui sont associées aux protéines ZO-1. Cette interaction est inhibée par l'activation d'une voie de signalisation, qui est la voie des Ras-kinases (Hawkins and Davis, 2005).

**Les protéines 7H6** sont des phosphoprotéines cytoplasmiques de 155 kDa. Elles sont corrélées à l'imperméabilité des jonctions serrées aux ions et aux grosses molécules. Sa fonction est encore mal décrite. Cependant, la protéine 7H6 se détache des jonctions serrées lorsque le niveau d'ATP chute, entraînant ainsi une augmentation de la perméabilité paracellulaire (Bernacki *et al.*, 2008).

En conclusion les cellules endothéliales cérébrales sont équipées de complexes jonctionnels qui permettent la régulation de la perméabilité cellulaire. Le réseau des jonctions permet de faire de la BHE, une structure dynamique capable de répondre aux stimuli de l'environnement. Cependant la restriction du passage des composés du sang au compartiment cérébral, rend difficile l'approvisionnement en nutriments, vitaux, pour le cerveau. Ces apports vont être assurés par des transporteurs, le plus souvent spécifiques, à travers la BHE.

## 2.3. Une barrière physiologique

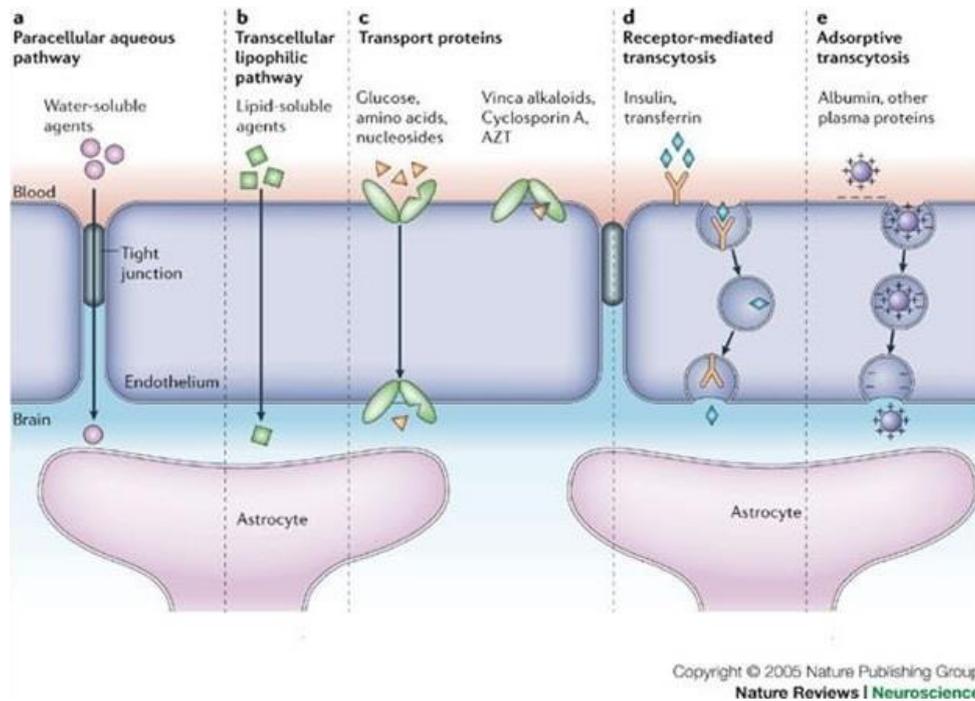
La fonction principale de la BHE est de maintenir l'homéostasie cérébrale grâce à des mécanismes spécifiques par lesquels les solutés se déplacent à travers les membranes. Ceux-ci vont traverser la BHE soit par voie paracellulaire entre deux cellules adjacentes, soit par voie transcellulaire à travers la cellule (Bernacki *et al.*, 2008). Cependant, la majorité des solutés (nutriments, ions, hormones...) franchissent cette barrière par la voie transcellulaire selon des phénomènes de diffusion et de transcytose.

### 2.3.1. Le transport paracellulaire au sein de la BHE

Le transport paracellulaire est un processus passif reposant sur des gradients électrochimiques, hydrostatiques et osmotiques. Cette voie paracellulaire est caractérisée par une conductance élevée et une faible sélectivité. Ceci est dû aux protéines des jonctions serrées, qui restreignent le mouvement des petits ions, comme les ions sodium et chlore, et en limitant le passage des grosses molécules et des protéines (Abbott *et al.*, 2010). Cependant, cette voie paracellulaire permet le passage des molécules d'eau et des petits solutés hydrophiles, grâce à l'ouverture et/ou le réarrangement de ces jonctions serrées (Abbott, 2013).

### 2.3.2. Le transport transcellulaire

En raison de la forte restriction de la voie paracellulaire, par les jonctions serrées des cellules endothéliales, les solutés traversent la BHE en empruntant le passage transcellulaire. Certaines molécules peuvent diffuser librement à travers cette barrière selon un processus de diffusion passive. Cependant, la plupart des molécules vont utiliser des protéines de transport, plus ou moins spécifiques, ou des mécanismes de transport vésiculaire (transcytose). Ces différentes voies de transport vont permettre les échanges, qui sont nécessaires, entre les compartiments sanguin et cérébral (**Figure 7**).



**Figure 7 : Schéma illustrant les différents mécanismes de transport présents au sein de la barrière hémato-encéphalique (Abbott *et al.*, 2006).** Les jonctions serrées limitant fortement la voie paracellulaire, les molécules vont emprunter le passage transcellulaire. Si elles ne peuvent pas traverser librement par diffusion passive, ces molécules vont avoir recours à des protéines de transport ou à des transports vésiculaires.

### 2.3.2.1. La diffusion passive

La diffusion passive est un processus qui permet à une molécule de traverser librement une membrane cellulaire, selon son gradient de concentration, c'est-à-dire de la zone où elle est le plus concentrée vers celle où elle est le moins concentrée. Ce mécanisme se déroule sans apport d'énergie (sous forme d'ATP) ou sans l'intervention de transporteurs. Seules des molécules lipophiles (solubles dans les lipides), ainsi que les molécules gazeuses comme le dioxygène ou le dioxyde de carbone, peuvent diffuser librement à travers la BHE (Abbott *et al.*, 2010). Leur passage se fait alors uniquement selon leur gradient de concentration entre le sang et le compartiment cérébral. Par exemple, le dioxygène va entrer dans le cerveau pour répondre à ses besoins, tandis que le dioxyde de carbone est relâché dans la circulation sanguine. Cependant certaines molécules lipophiles, en raison de leurs propriétés, interviennent comme substrats des pompes d'efflux (qui seront décrites ultérieurement) et sont donc effluées vers le sang.

### **2.3.2.2. Le transport de nutriments par diffusion facilitée**

La diffusion facilitée est un mécanisme qui permet le transport de solutés à travers la BHE, selon leur gradient de concentration et sans apport d'énergie. Contrairement à la diffusion passive, ce type de diffusion fait intervenir des protéines, appelées transporteurs, qui vont faciliter le passage des solutés. Ce mécanisme passif est saturable lorsque les concentrations en solutés excèdent la capacité de fixation du transporteur. Au sein de la BHE, une variété de transporteurs facilite le passage des nutriments nécessaire au métabolisme tels que le glucose ou les acides aminés (Daneman and Prat, 2015).

**Le transport du glucose** est essentiel au cerveau, puisque ce dernier représente sa principale source d'énergie. Cet hexose passe du sang au cerveau par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques indépendant au sodium, appartenant à la famille des transporteurs GLUTs. Les cellules de la BHE expriment fortement le transporteur GLUT-1, protéine de 45 kDa (Bernacki *et al.*, 2008). Ce dernier facilite le passage du D-glucose, mais également celui d'autres hexoses comme le D-galactose. Le transporteur GLUT-1 est localisé sur les deux surfaces (luminale et abluminale) de la BHE, mais de façon asymétrique. En effet, 44% des transporteurs GLUT-1 sont exprimés sur la surface abluminale (côté cerveau) contre seulement 11% sur la partie luminale (côté sang) (Simpson *et al.*, 2007). Ces transporteurs de glucose sont vitaux au fonctionnement cérébral. En effet, une déficience en transporteur GLUT-1 entraîne une diminution d'entrée du glucose dans le cerveau, une réduction du flux sanguin cérébral et une augmentation de la perméabilité de la BHE. Par conséquent, une perte de ces transporteurs GLUT-1 impacte l'intégrité de la BHE et peut conduire à des troubles neurodégénératifs (Keaney and Campbell, 2015).

**Le transport des acides aminés** est vital au fonctionnement du SNC puisque ceux-ci sont essentiels à la synthèse des protéines cérébrales et à la production des neurotransmetteurs. Bien que le glutamate et l'aspartate soient synthétisés par le cerveau, la majorité des acides aminés nécessaires au SNC n'est pas produite de façon autonome par ce dernier. Par conséquent l'apport des acides aminés essentiels aux besoins métaboliques se fait par la circulation sanguine. Ces acides aminés vont entrer dans le cerveau grâce à des transporteurs. Ils sont classés en deux groupes et sont localisés à la surface des membranes des cellules endothéliales

cérébrales. Le premier groupe est un système de transport facilité indépendant des ions sodium, situé sur les membranes luminale et abluminale des cellules. Le second groupe est caractérisé par sa dépendance aux ions sodium et les transporteurs sont localisés exclusivement sur la membrane abluminale des cellules endothéliales de la BHE (O’Kane *et al.*, 2006).

**Le transport des acides monocarboxyliques** se fait par l’intermédiaire des transporteurs MCT-1 (monocarboxylate transporter-1). Ces transporteurs sont exprimés à la surface des deux membranes des cellules endothéliales. Ils participent notamment au transport du lactate et des corps cétoniques. Ces substrats constituent une source d’énergie supplémentaire pour le cerveau notamment lors des périodes de jeûne (Simpson *et al.*, 2007; Bernacki *et al.*, 2008).

### **2.3.2.3. La transcytose**

Les peptides, les protéines ou les molécules ayant un fort poids moléculaire (macromolécules) ne peuvent pas entrer dans le cerveau en raison des jonctions serrées, présentes dans la BHE, qui freinent leur passage. Leur entrée se fait par l’intermédiaire d’un processus de transport vésiculaire. Deux types de transcytose sont décrits : la transcytose par absorption et la transcytose spécifique dépendant de récepteurs.

**La transcytose par adsorption** : ce processus nécessite que la molécule, à transporter, présente un excès de charges positives, ce qui la rend cationique. Cette caractéristique va permettre l’interaction, électrostatique, avec la surface membranaire des cellules endothéliales, qui est chargée négativement. Ceci va entraîner une endocytose qui sera ensuite suivie d’une transcytose jusqu’à la membrane cellulaire opposée (Brightman and Reese, 1969; Abbott *et al.*, 2010). C’est un transport qui est non spécifique (**Figure 7e**).

**La transcytose dépendante de récepteurs** : la macromolécule va se lier spécifiquement à son récepteur, qui est présent sur la membrane des cellules endothéliales. Les complexes récepteur/ligand se concentrent sur une zone de la membrane plasmique. Celle-ci va

s'invaginer pour former des vésicules (les calvéoles). Ces vésicules sont internalisées et traversent le cytoplasme de la cellule endothéliale. Puis elles vont fusionner avec la membrane plasmique opposée (**Figure 7d**). Cette fusion entraîne la libération du ligand dans le milieu extracellulaire (Abbott *et al.*, 2010). Ce type de transcytose utilise des récepteurs ce qui en fait un transport très spécifique.

Dans les deux types de transcytose, pour que le processus soit efficace, c'est-à-dire que le ligand soit intact lors de sa libération, le cheminement vésiculaire doit contourner les lysosomes afin d'empêcher la dégradation de la macromolécule. Cette voie de contournement semble être une propriété des cellules endothéliales de la BHE (Abbott *et al.*, 2010).

La microscopie électronique a révélé un faible taux de vésicules endocytiques au niveau du cytoplasme des cellules endothéliales de la BHE. Par conséquent le transport des macromolécules par transcytose serait réduit au sein de la BHE. Cependant le nombre de vésicules endocytiques augmenteraient lors d'évènement hypoxique (Keller, 2013) ou lors de blessures cérébrales (Daneman and Prat, 2015).

Enfin, la BHE possède un dernier système de protection, qui va restreindre l'entrée de composés dans le cerveau, outre les complexes jonctionnels décrits précédemment. Ce système est présent au sein des cellules endothéliales, et assure des propriétés métaboliques.

## **2.4. Une barrière métabolique**

La BHE peut également être considérée comme une barrière métabolique en raison de la présence de plusieurs enzymes spécifiques et de pompes d'efflux (Bernacki *et al.*, 2008). Les cellules endothéliales et les astrocytes possèdent des enzymes intra et extracellulaires qui permettent de métaboliser et d'éliminer des xénobiotiques (substances présentes dans l'organisme mais qui lui est étranger). Par ailleurs, le transport de ces composés, en dehors de la cellule, est assuré par des systèmes de pompes d'efflux tels que la protéine P-glycoprotéine

(Pgp), la famille des protéines « multidrug resistance-associated protein » (MRP) ainsi que la protéine « breast cancer resistance protein » (BCRP).

### 2.4.1. Les enzymes

Plusieurs enzymes métaboliques sont exprimées au sein des cellules endothéliales cérébrales. Les enzymes qui participent principalement aux propriétés de barrière métabolique sont l'enzyme phosphatase alcaline (ALP), l'enzyme monoamine oxydase (MAO) et l'enzyme  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT) (Wilhelm *et al.*, 2011).

**L'enzyme phosphatase alcaline** est présente dans beaucoup de tissus et est responsable de l'hydrolyse de métabolites phosphorylés. Elle contrôle également le transport d'esters de phosphate ainsi que des ions phosphatés. L'enzyme phosphatase alcaline est fortement exprimée par les cellules endothéliales cérébrales (Meyer *et al.*, 1990).

**Les enzymes monoamines oxydases** sont issues des mitochondries et sont présentes au sein des tissus cérébraux. Elles sont responsables de la dégradation de neurotransmetteurs de type monoaminergiques tels que la dopamine, la sérotonine, l'adrénaline et la noradrénaline, libérés par les neurones. Par ailleurs, elles limitent le passage transcellulaire de leurs précurseurs du sang au cerveau (Lai *et al.*, 1975).

**L'enzyme  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT)** est caractéristique de la BHE. Elle assure la catalyse du transfert de résidus  $\gamma$ -glutamyl d'un peptide donneur, le plus souvent le glutathion, à un peptide receveur (Orlowski *et al.*, 1974). Elle intervient également dans le transport de certains acides aminés à travers la BHE. Cependant l'enzyme  $\gamma$ -GT n'est pas spécifique des cellules endothéliales cérébrales puisqu'elle est également localisée au niveau des péricytes (Frey *et al.*, 1991). Enfin l'enzyme  $\gamma$ -GT semble avoir des propriétés neuroprotectrices car son activité empêche l'invasion des leucotriènes C4 dans le cerveau (Black *et al.*, 1994).

Il existe d'autres enzymes qui participent à la fonction de détoxification de la BHE. Elles incluent les hémoprotéines cytochrome P450, les cytochromes P450 monooxygénases, les NADPH-cytochrome P450 réductases, les glutathion peroxydases (GSH) et les époxydes hydrolases. Ces enzymes sont surtout exprimées au niveau du plexus choroïde mais elles sont responsables, au sein de la BHE, de la dégradation de certains xénobiotiques (Lee *et al.*, 2001).

L'endothélium de la BHE, en plus de ces enzymes, possède une protection supplémentaire vis-à-vis de l'environnement cérébral, grâce à l'expression de pompes d'efflux membranaires. Les enzymes et les pompes d'efflux vont agir, de façon complémentaire, pour limiter le passage de nombreux composés (Lee *et al.*, 2001).

#### **2.4.2. Les pompes d'efflux**

Les pompes d'efflux sont des protéines membranaires qui utilisent l'hydrolyse de l'ATP pour transporter des molécules endogènes et exogènes. Ces pompes sont fortement exprimées à la surface luminale des cellules endothéliales de la BHE. Elles assurent la protection ainsi que la détoxification du SNC, en facilitant l'efflux des molécules pouvant être potentiellement toxiques pour le cerveau (Daneman and Prat, 2015). Il existe plusieurs familles et sous-familles de ces pompes d'efflux. La famille des transporteurs ATP-binding cassette (ABC) est la plus importante, et est représentée par les protéines « multidrug resistance proteins » (MDRs), la protéine « breast cancer resistance protein » (BCRP) et les protéines « multidrug resistance associated proteins » (MRPs) qui appartiennent à une sous-famille des protéines MDRs, au sein de la BHE. Par ailleurs, leurs activités réduisent considérablement le passage de nombreux médicaments dans le cerveau (Ronaldson and Davis, 2015).

##### **2.4.2.1. Les pompes d'efflux de la famille ABC**

Chez l'homme, les transporteurs ABC sont codés par quarante huit gènes. Cette famille est classée en sept sous-familles (Ronaldson and Davis, 2015). Ces pompes d'efflux permettent le passage des composés à travers la membrane de leurs cellules contre leur gradient

de concentration, en utilisant l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP. La majorité de ces transporteurs sont des protéines transmembranaires composées de quatre domaines essentiels :

- deux domaines cytosoliques appelés « nucleotide binding domains » (NBDs). C'est au niveau de ces domaines que se déroule l'hydrolyse de l'ATP nécessaire au transport du composé.

- deux domaines transmembranaires appelés « transmembrane proteins » (TMDs). Chacun de ces domaines est constitué de six hélices  $\alpha$ . Ces TMDs forment un pore par lequel le composé va pouvoir traverser. Ce sont également des domaines qui vont conférer une spécificité aux transporteurs pour les composés qui sont appelés substrats (Dean *et al.*, 2001; Vasiliou *et al.*, 2009).

Le transport par ces pompes d'efflux repose sur la fixation du substrat sur les domaines TMDs. Cette liaison va stimuler les sites d'ATP, présents au sein des domaines NBDs, permettant ainsi le passage du substrat, soit à l'intérieur soit à l'extérieur, de la cellule (Linton and Higgins, 2007).

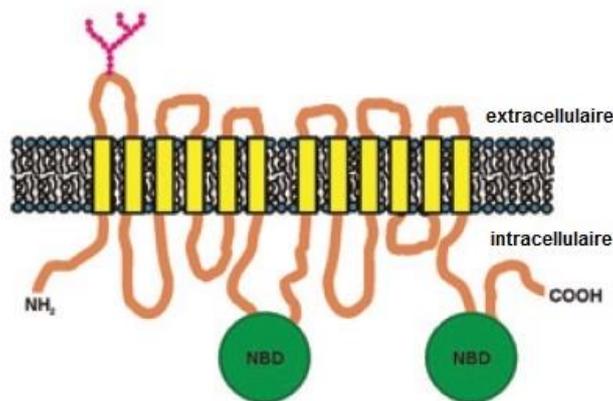
Au sein du cerveau, les cellules expriment majoritairement la protéine « multidrug resistance protein-1 » (ou P-glycoprotéine), les protéines « multidrug resistance-associated proteins » et la protéine « breast cancer resistance protein » (BCRP) (Bernacki *et al.*, 2008).

#### 2.4.2.1.1. La protéine « multidrug resistance protein-1 » ou P-glycoprotéine:

En 1976, des chercheurs canadiens ont associé le phénotype de tumeurs multi-résistantes aux médicaments, à une protéine qu'ils ont appelé la protéine P-glycoprotéine (Pgp) (Juliano and Ling, 1976). Cette protéine Pgp est une glycoprotéine phosphorylée transmembranaire de 170 kDa. Il existe deux types de protéine Pgp chez l'Homme. Tout d'abord, la protéine Pgp de type I (protéine Pgp exprimée au sein de la BHE) est codée par le gène MDR1, elle est responsable du caractère de résistance aux médicaments et des mécanismes d'efflux des composés au sein de la BHE. Ensuite la deuxième protéine Pgp, dites de type II, est codée par le gène MDR2 et est exprimée exclusivement par les hépatocytes ; elle agit comme

une translocase de phosphatidylcholine. Chez les rongeurs, la protéine Pgp de type I est codée par deux gènes : *mdr1a* et *mdr1b*, qui sont exprimés respectivement au niveau des capillaires cérébraux et du parenchyme cérébral (Bernacki *et al.*, 2008).

La microscopie électronique a permis de montrer que la protéine Pgp est un polypeptide simple, de 1280 acides aminés (Jagodinsky and Akgun, 2015), composé de douze domaines TMHs (Transmembrane helices) associés étroitement à deux domaines NBDs (Figure 8).



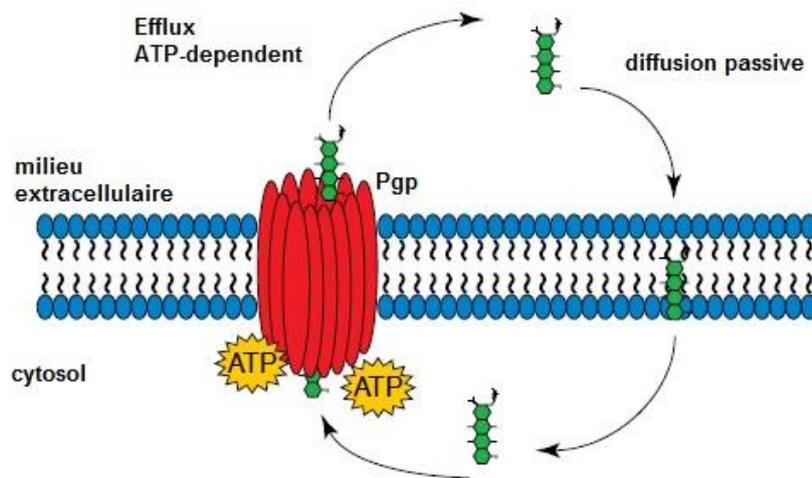
**Figure 8 : structure de la protéine Pgp d'après Sharom et al. (Sharom, 2011).** La protéine Pgp est formée de douze domaines TMHs (6 du côté extracellulaire et 6 du côté cytoplasmique)

Les domaines NBDs sont caractérisés par deux motifs structuraux : Walker A et B. Au niveau du motif Walker A, un résidu cystéine est directement impliqué dans la liaison du bêta phosphate de l'ATP tandis qu'au sein du motif Walker B, un résidu aspartate va permettre la liaison des ions magnésium nécessaires à l'utilisation de l'ATP (Jagodinsky and Akgun, 2015).

La protéine Pgp est exprimée dans de nombreux tissus sains tels que les intestins, les reins ou le placenta (Sharom, 2011). De plus cette glycoprotéine est la première pompe d'efflux, de la famille des transporteurs ABC, à avoir été localisée à la surface des cellules endothéliales de la BHE humaine (Cordon-Cardo *et al.*, 1989). En effet, au sein de cette barrière, la protéine Pgp est principalement exprimée sur les membranes lumineales (apicales) des cellules

endothéliales microvasculaires cérébrales. Cette localisation apicale va permettre de limiter la diffusion des molécules du sang vers le cytoplasme des cellules endothéliales, et *a fortiori*, vers le tissu cérébral. Ceci a pour conséquences de limiter la pénétration des substrats dans le cerveau et ainsi moduler leur efficacité et leur toxicité vis-à-vis du SNC (Fang *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014). De plus, la protéine Pgp serait également responsable de l'expulsion de substances endogènes hors du cerveau telles que les opioïdes (Felix and Barrand, 2002). Cependant des chercheurs ont montré que les membranes des cellules endothéliales (Bendayan *et al.*, 2006) ainsi que les pieds astrocytaires de la BHE (Golden and Pardridge, 1999), exprimaient également cette protéine Pgp.

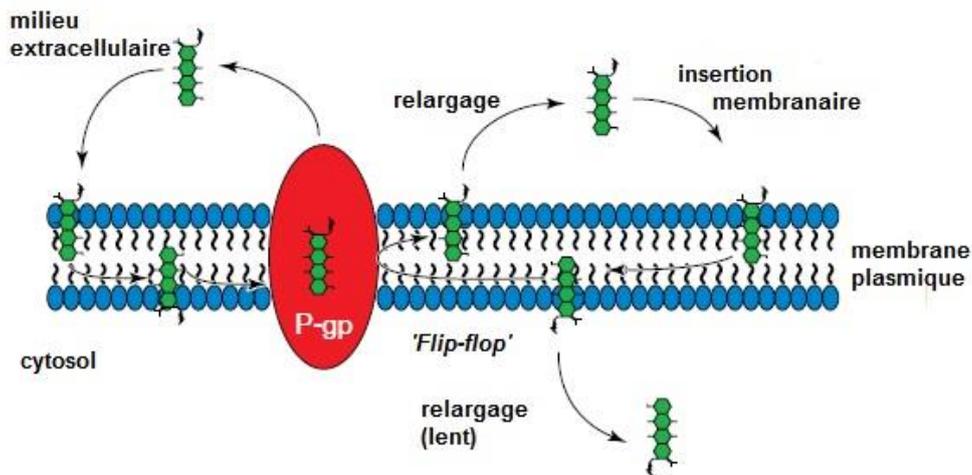
La protéine Pgp possède deux modes d'action pour transporter ses substrats : un mécanisme de pompe d'efflux par translocase et un mécanisme d'efflux par flippase (Jagodinsky and Akgun, 2015). Tout d'abord, le mécanisme de pompe d'efflux par translocase, transport principal de la protéine Pgp et employé au sein de la BHE, fait intervenir deux conformations de la protéine Pgp : une conformation avec le site de fixation du substrat tourné vers l'intérieur de la cellule, et une conformation avec le site de fixation tourné du côté extracellulaire. Les substrats, étant pour la plupart de nature hydrophobe, vont entrer dans la cellule par diffusion passive, en raison de leur meilleure solubilité dans la bicouche phospholipidique de la membrane plasmique. Ensuite, le changement de conformation de la protéine Pgp, permettant le passage d'une configuration à l'autre, est induit à la fois par la fixation du substrat et l'hydrolyse de l'ATP, et conduit à relâcher le substrat dans le milieu extracellulaire (**Figure 9**).



**Figure 9 : Mécanisme d'action par translocase pour l'expulsion des substrats par la protéine Pgp (Johnstone *et al.*, 2000).** Les substrats de la pompe d'efflux Pgp (en vert) vont diffuser à travers la membrane plasmique puis sont relargués hors de la cellule par un mécanisme ATP-dépendant.

Les hélices transmembranaires (TMHs) sont riches en composés aromatiques, qui vont intervenir dans la fixation et le transport des médicaments. Par ailleurs, ces TMHs semblent assurer la flexibilité conformationnelle nécessaire à l'adaptation de la protéine Pgp à de nombreux substrats, de nature hydrophobe, de tailles et de structures différentes (Sharom, 2011).

De plus, la protéine Pgp peut également transporter ses substrats par une flippase, en les faisant passer d'une face à l'autre de la membrane par un mouvement de flip-flop (Johnstone *et al.*, 2000) (**Figure 10**). En effet, les substrats présents de chaque côté de la membrane plasmique sont en équilibre dans le milieu aqueux, et vont générer ainsi un gradient de concentration à travers cette membrane.



**Figure 10 : mécanisme d'action de flippase par la protéine Pgp pour transporter ses substrats (Johnstone *et al.*, 2000).** Les substrats (en vert) interagissent d'abord avec la membrane plasmique, puis sont pris en charge par la protéine Pgp et transportés à l'extérieur de la cellule. Les substrats, qui sont intercalés dans la bicouche phospholipidique, sont relargués dans le milieu extracellulaire par un mouvement de flip-flop. Il faut noter que le transport des substrats entre les faces de la membrane est relativement rapide, tandis que leur passage, de l'extérieur au cytosol, est un processus beaucoup plus lent.

La protéine Pgp peut être stimulée par une large gamme de substrats, qui diffèrent par leur nature, leur structure ou leur action pharmacologique. Depuis l'identification de la protéine Pgp, plus d'une centaine de substrats ont été répertoriés. En effet, ces substrats peuvent être des composés naturels, des médicaments chimiothérapeutiques, des hormones stéroïdes, des sondes fluorescentes ou des ionophores. La **table 1** résume, de façon non exhaustive, les différentes catégories de substrats de Pgp.

Catégories	Composés
Médicaments anti-cancéreux	Anthracyclines : doxorubicine, daunorubicine Camptothécines : topotécane Epipodophyllotoxines : étoposides, téniposides Taxanes : docetaxel, paclitaxel
Inhibiteurs de tyrosine kinase	Imatinib mesylate Gefitinib
Produits naturels	Flavonoïdes Curcuminoïdes Colchicine Actinomycine D
Sondes fluorescentes	Rhodamine 123 Hoechst 33342 Calcéine acetoxymethylester
Hormones stéroïdes	Aldostérone Corticostérone Dexaméthasone
Pesticides	Methylparathion Endosulfan
Anti-épileptiques	Topiramate

**Tableau 1 : Substrats de la protéine Pgp d'après Sharom et al. (Sharom, 2011).**

Ces substrats sont des composés neutres ou cationiques (Ronaldson and Davis, 2015). En effet, Pgp transporte des substrats de nature amphiphile ou hydrophobe qui comportent souvent des cycles aromatiques et un atome d'azote chargé positivement (Sharom, 2011).

Il existe un second groupe de composés, qui interagissent avec la protéine Pgp, ce sont les inhibiteurs. Ces molécules sont capables d'annuler l'action de la protéine Pgp, de différentes façons en influant sur la capacité de celle-ci à expulser les composés. Ces inhibiteurs, comme les substrats, possèdent des structures différentes. La **table 2** résume de façon assez brève les diverses catégories d'inhibiteurs.

Catégories	Composés
1ère génération	Verapamil
	Cyclosporin A
	Tamoxifen
2nde génération	PSC-833 (Valspodar)
	VX-710 (Bircodar)
3ème génération	LY335979 (Zosuquidar)
	OC144-093 (Ontogen)
	XR9576 (Taraquidar)
	GF120918 (Elacridar)
Autres	Curcuminoïdes
	Flavonoïdes
	Disulfirame
	Cremaphore EL
	Nonidet P40
	Alcool benzylé

**Tableau 2 : Inhibiteurs de la protéine Pgp d'après Sharom et al. (Sharom, 2011).**

Certains de ces inhibiteurs vont être transportés et induire une inhibition compétitive, comme la cyclosporine A, tandis que d'autres vont se lier au site de fixation du substrat pendant une certaine période sans être transporter. Dans certains cas, les inhibiteurs vont interagir avec les domaines NBDs, interférant ainsi avec l'hydrolyse de l'ATP (hormones stéroïdes, par exemple) (Sharom, 2011).

Les inhibiteurs peuvent être utiles afin d'augmenter la capacité d'administration de médicaments thérapeutiques, notamment dans le cerveau, ce qui est souhaitable lors des traitements des cancers, des maladies d'Alzheimer et de Parkinson... Cependant la nature poly-spécifique des sites de liaison, présents au sein de la protéine Pgp, ainsi que leur capacité à fixer plusieurs substrats en même temps, rend la conception d'inhibiteurs à haute affinité très difficile (Sharom, 2011).

Enfin, une étude sur des souris déficientes en protéine Pgp, a révélé que la pénétration de ses substrats, dans le cerveau, pouvait être augmentée de dix à cent fois. Cette pénétration accrue peut entraîner, dans certains cas, des conséquences dramatiques du fait de leur toxicité. Ces résultats démontrent ainsi le rôle majeur de cette pompe d'efflux dans la protection du SNC (Schinkel and Jonker, 2003). Cependant, la protéine P-glycoprotéine est altérée dans de nombreuses pathologies. En effet, l'augmentation de l'expression et/ou de l'activité de la protéine Pgp a été observée dans les microvaisseaux de l'hippocampe, isolés chez des rats hypertendus sujet à des AVC (Ueno *et al.*, 2009) et dans les microvaisseaux cérébraux prélevés chez des rats Sprague-Dawley sujets à des douleurs inflammatoires (McCaffrey *et al.*, 2012). Par ailleurs l'hypoxie serait un facteur de surexpression de la protéine P-glycoprotéine (Xiao-Dong *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2013).

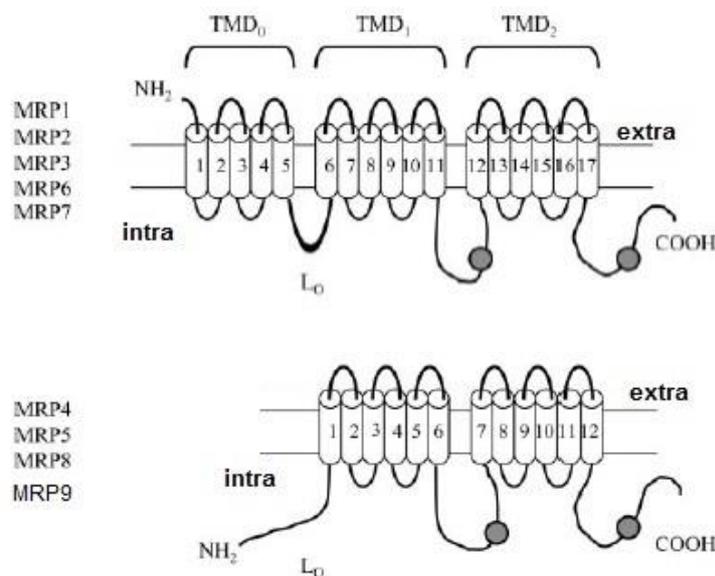
#### 2.4.2.1.2. Les protéines « multidrug resistance-associated proteins » ou MRPs

Les protéines « multidrug resistance-associated proteins » (ou la sous-famille ABCC), sont constituées de treize membres dont un canal ionique, deux récepteurs présents à la surface des cellules et d'une protéine tronquée qui n'intervient pas dans le transport (Haimeur *et al.*, 2004). Ces quatre protéines ne possèdent pas la capacité d'effluer des substances et par

conséquent elles ne seront pas décrites dans ce paragraphe. Par ailleurs, cette sous-famille possède neuf membres (MRP1 à MRP9) qui jouent le rôle de pompes d'efflux. Ces neuf protéines MRPs peuvent être classées en deux groupes selon leur topologie membranaire (Kruh and Belinsky, 2003) (**Figure 11**) :

- les protéines MRPs dits "longs" (MRP-1, MRP-3, MRP-6 et MRP-7), ces protéines possèdent trois domaines transmembranaires (TMD0, TMD1, TMD2), deux domaines NBDs (NBD1 et NBD2) dont le premier est situé entre TMD1 et TMD2 tandis que le deuxième est localisé entre TMD2 et l'extrémité C-terminale. Leur structure se distingue de celle de la protéine Pgp par la présence d'une boucle intracytoplasmique (L<sub>0</sub>), située à l'extrémité amino-terminale, qui est essentielle pour le fonctionnement des protéines (Bakos *et al.*, 1998).

- les protéines MRPs dits "courts" (MRP-4, MRP-5, MRP-8 et MRP-9) : ces protéines possèdent la même structure que les MRPs décrits précédemment, à l'exception du domaine transmembranaire TMD0 qui n'est pas présent.



**Figure 11 : Topologie membranaire des protéines MRPs d'après Dallas et al. (Dallas *et al.*, 2006).** MRP-1, MRP-2, MRP-3, MRP-6 et MRP-7 sont composées de trois domaines transmembranaires (TMD0, TMD1 et TMD2) et de deux domaines NBDs (représentés par les cercles gris). TMD0 et TMD1 sont reliés par une boucle intracytoplasmique (L<sub>0</sub>). MRP-4, MRP-5, MRP-8 et MRP9 sont constituées seulement par les domaines TMD1 et TMD2, reliés par L<sub>0</sub>, ainsi que des deux domaines NBDs.

Ces protéines MRPs transportent des anions organiques ainsi que des métabolites sulfatés, des glucuronidés ou des conjugués du glutathion (Ronaldson and Davis, 2015), mais

peuvent également prendre en charge des médicaments organiques neutres (Haimeur *et al.*, 2004). Cette sous-famille possède des substrats qui diffèrent de ceux de la protéine Pgp. Toutefois, il existe des substrats qui sont pris en charge à la fois par les protéines MRPs et par la protéine Pgp (Seelig *et al.*, 2000). A l'instar de la protéine Pgp, les protéines MRPs sont localisées dans de nombreux tissus sains tels que la BHE ou la barrière hémato-méningée (Borst *et al.*, 2000). Certaines protéines MRPs, sont exprimées à la surface apicale des membranes cellulaires des tissus, ce qui reste la localisation adéquate pour le rôle cytoprotecteur des pompes d'efflux, tandis que d'autres protéines MRPs, sont situées à la surface basale des membranes cellulaires (Schinkel and Jonker, 2003). Les analyses de l'ARNm ont montré un fort taux de protéine MRP-1 au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux humains, et un faible taux des protéines MRP-2,-3-5 (Dombrowski *et al.*, 2001). Or, la microscopie à fluorescence a révélé un fort taux d'expression des protéines MRP-1, -4 et -5, aucun signal n'a pu être détecté pour les protéines MRP-2, -3 et -6 (Nies *et al.*, 2004). Pris ensemble ces résultats suggèrent, selon que l'expression soit étudiée au niveau de l'ARNm ou de la protéine, que six protéines MRPs seraient exprimées au sein de la BHE. Cependant l'influence des protéines MRPs sur la BHE, et notamment sur sa perméabilité, dépendrait de leur localisation sur les membranes des cellules endothéliales cérébrales. En effet, seules les protéines MRPs situées sur la surface apicale, de la membrane plasmique, restreindraient l'accès des substrats au cerveau. La microscopie confocale a permis de mettre en évidence trois protéines MRPs sur les membranes lumineales des cellules endothéliales cérébrales, qui sont les MRP-1, -4 et -5.

**La protéine MRP-1** : a été le premier membre découvert, en 1992, dans des cellules cancéreuses (Cole *et al.*, 1992). Les cellules qui expriment la protéine MRP-1 possèdent des propriétés de résistance contre des produits naturels ou des molécules anticancéreuses telles que les vinca alcaloïdes, les anthracyclines ou les epipodophyllotoxines (Cole *et al.*, 1994; Breuninger *et al.*, 1995). A l'inverse de la protéine Pgp, la protéine MRP-1 serait plus spécifique aux transports de composés anioniques tels que le glutathion (GSH), la glucuronide ou les conjugués sulfatés (Jedlitschky *et al.*, 1997), ou de composés metalloïdes comme l'arsenic, les pesticides acetanalides, les bioflavonoïdes (Leslie *et al.*, 2005). Par ailleurs, la protéine MRP-1 est capable de transporter des composés cationiques, quand ceux-ci sont conjugués au GSH (Rappa *et al.*, 1997; Loe *et al.*, 1998). L'expression de la protéine MRP-1 et de l'enzyme de synthèse de GSH ( $\gamma$ -glutamyl cysteine synthetase) serait régulée, de façon coordonnée, par le

stress oxydatif ou les métaux lourds (Ishikawa *et al.*, 1996; Yamane *et al.*, 1998). Le glutathion étant responsable du maintien de l'équilibre oxydo-réduction cellulaire, ainsi que de la défense anti-oxydante du cerveau, une surexpression de la protéine MRP-1 par un stress oxydatif, va entraîner une augmentation d'efflux cellulaire du glutathion ; ce qui suggère que la protéine MRP-1 est impliqué dans la détoxification et l'élimination des métabolites endogènes toxiques (Leslie *et al.*, 2001; Ronaldson and Davis, 2015). De plus, la protéine MRP-1 est également un transporteur du leukotriène C4 (LTC4), médiateur inflammatoire, suggérant une implication dans les réponses immunitaires (Haimeur *et al.*, 2004; Bernacki *et al.*, 2008).

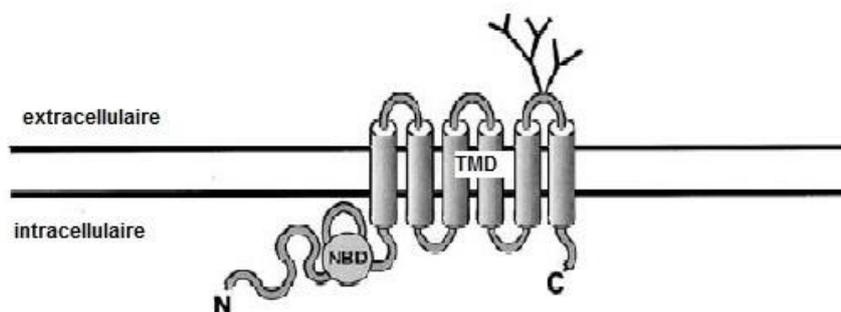
**La protéine MRP-4** : a la capacité de transporter et de conférer une résistance envers une variété de composés phosphorylés. En effet la protéine MRP-4 peut prendre en charge des nucléotides cycliques tels que l'AMPc, la GMPc ou des nucléotides analogues comme la 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine (PMEA), l'azidothymidine monophosphate et des analogues à la purine (6-mercaptopurine, 6-thioguanine) (Schuetz *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2001). Cependant la gamme de substrats de cette protéine serait plus large que celle décrite précédemment. En effet, Reid *et al.* (Reid *et al.*, 2003b) ont démontré que les cellules transfectées par la protéine MRP-4, étaient capables de transporter des prostaglandines E1 et E2 mais également des methotrexates (Chen *et al.*, 2002; van Aubel *et al.*, 2002).

**La protéine MRP-5** : le gène codant pour la protéine MRP-5 est exprimé, de façon ubiquitaire, à un fort niveau d'expression au sein des cellules du muscle squelettique et du cerveau (Belinsky *et al.*, 1998). La protéine MRP-5 appartient à la même sous-famille que la protéine MRP-4, seulement le spectre des substrats est plus restreint que celui de la protéine MRP-4. La protéine MRP-5 prend en charge les substrats monophosphorylés tel que PMEa (Reid *et al.*, 2003a; Wielinga *et al.*, 2003). La protéine MRP-5 se distingue, surtout, de MRP-4 par sa sensibilité aux inhibiteurs MRPs. En effet, la concentration de probénicid pour la protéine MRP-5 est dix fois moins élevée que pour MRP-4, afin d'inhiber le transport de PMEa. A l'inverse, l'inhibiteur MK571 doit être quatre fois plus concentré pour la protéine MRP-5, que MRP-4, afin de bloquer le transport du substrat. Enfin, le substrat stavudine monophosphate semble être pris en charge par la protéine MRP-5 mais pas par MRP-4 (Reid *et al.*, 2003a).

A ce jour, il a été décrit différents inhibiteurs pour cette famille de protéines MRPs tels que le probénicid, le sulfinpyrazone, le S-décyglutathion ou le benzbromarone. Le MK-571 est également un inhibiteur de cette sous-famille de transporteur ABC, puisqu'il est un antagoniste des ligands des récepteurs à leukotriène (Schinkel and Jonker, 2003).

#### 2.4.2.1.3. La protéine « breast cancer resistance protein » (BCRP)

La protéine BCRP a été identifiée pour la première fois, en 1998, dans une lignée tumorale mammaire (MCF7) (Doyle *et al.*, 1998). Cette protéine, ayant été découverte dans une lignée cancéreuse, a été nommée « breast cancer resistance protein », malgré le fait qu'elle n'intervient pas exclusivement dans les cellules tumorales. La protéine BCRP est une glycoprotéine membranaire de 655 acides aminés, composée d'un seul NBD (domaine de liaison de l'ATP) et d'un seul TMD (**Figure 12**).



**Figure 12 : Structure de la protéine BCRP d'après Schinkel et al (Schinkel and Jonker, 2003).** La protéine BCRP est constituée d'un seul domaine NBD, localisé sur l'extrémité N-terminale, et d'un seul domaine TMD, composé de six domaines transmembranaires.

A l'instar de la protéine Pgp et des protéines MRPs, la protéine BCRP est une pompe d'efflux ATP dépendante, permettant l'efflux de substrats et induisant une résistance à certains médicaments comme la doxorubicine, la mitoxantrone ou la topotecane (Allen *et al.*, 1999). Par ailleurs, une surexpression de l'ADNc de la BCRP, chez les mammifères, a révélé que la pompe d'efflux était fonctionnelle sous une forme homodimère (Honjo *et al.*, 2001; Kage *et al.*, 2002). De plus, elle serait présente sur la surface apicale des cellules polarisées (Jonker *et al.*, 2000) telles que les cellules épithéliales intestinales, les cellules mammaires, les cellules endothéliales

des capillaires ou des veines (Schinkel and Jonker, 2003). Au sein de la BHE, la protéine BCRP est également localisée sur la surface luminale des cellules endothéliales cérébrales (Hori *et al.*, 2004b; Lee *et al.*, 2005). La distribution de la protéine BCRP, étant voisine de celle de la protéine Pgp, semble indiquer que les deux protéines agissent de concert pour effluer les xénobiotiques circulants, hors du cerveau, et protéger ainsi le SNC (Schinkel and Jonker, 2003). Cependant la fonctionnalité de la protéine BCRP, au sein de la BHE, est un sujet à débat. En effet, certaines études ont suggéré que cette protéine n'était pas fonctionnelle au niveau de cette barrière (van Herwaarden *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007), d'autres ont minimisé son rôle dans l'efflux des xénobiotiques hors du cerveau (Zhao *et al.*, 2009), et certains ont apporté des analyses plus détaillées qui confirment que la protéine BCRP est un élément crucial dans la pénétration de drogues à travers la BHE (Kodaira *et al.*, 2010; Agarwal *et al.*, 2011).

Par ailleurs, cette protéine BCRP semble posséder des substrats et des inhibiteurs communs à la protéine Pgp (Schinkel and Jonker, 2003). Certains substrats sont également propres à cette pompe, comme la prazosine ou la mitoxantrone (Cisternino *et al.*, 2004). L'inhibiteur, le plus connu pour cette protéine, est le GF120918, dont l'action permet d'augmenter la pénétration de certains flavanoïdes dans le cerveau (Youdim *et al.*, 2004).

Enfin, du fait de son association étroite avec la protéine Pgp, la protéine BCRP a suscité de nombreuses études. En effet, des analyses protéomiques et transcriptionnelles ont révélé que cette protéine BCRP serait la pompe d'efflux la plus exprimée au sein de la BHE, devant la protéine MRP-1 et la protéine Pgp (Bernacki *et al.*, 2008; Uchida *et al.*, 2011).

#### **2.4.2.2. Les autres pompes d'efflux**

Outre les transporteurs de type ABC, des études de transports menées *in vitro* et *in vivo*, ont révélé que certains membres de la famille des « solutes carriers » (SLCs) intervenaient dans les mécanismes d'efflux de molécules au sein des barrières cérébrales, et particulièrement la BHE (Hagenbuch and Meier, 2004). Les représentants principaux des transporteurs SLCs sont les protéines OATPs (« organic anion transporting polipetides ») et les protéines OATs (« organic anion transporters »). A l'inverse des transporteurs ABC, les protéines OATs et OATPs ne permettent pas le passage des molécules contre leur gradient de concentration, puisque ces dernières n'hydrolysent pas d'ATP. En effet, ces familles de transporteurs sont en réalité des échangeurs, c'est-à-dire qu'ils font passer une molécule en contre partie d'une autre,

ou d'un ion (Löscher and Potschka, 2002). Le transport est, néanmoins, induit par un gradient de concentration ou un gradient ionique, et est réversible. Toutefois, et contrairement à la protéine Pgp ou aux protéines MRPs, la localisation exacte, de la plupart de ces protéines OATPs ou OATs, reste à déterminer (Fricker and Miller, 2004).

#### 2.4.2.2.1. Les protéines OATPs

Les protéines OATPs sont exprimées dans de nombreux tissus, comme le plexus choroïde, les poumons, le cœur, les intestins, les reins, le placenta, les testicules et la BHE. Elles interviennent principalement dans l'efflux de nombreux solutés anioniques organiques amphiphiles tels que les sondes organiques, les conjugués stéroïdes, les hormones thyroïdiennes T3 et T4, les peptides neuroactifs... Cette sous-famille est constituée de quatorze membres. Seuls trois membres sont exprimés au sein de la BHE : Oatp2, Oatp3 et Oatp14. Plusieurs études ont démontré que la protéine Oatp2 était fortement exprimée dans le cerveau (Noé *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 1999) et était localisée sur les deux surfaces des membranes (apicale et basale) des cellules (Gao *et al.*, 1999). Par ailleurs, la protéine OATP-A est une protéine Oatp spécifique de l'Homme. Elle est exprimée par différents tissus comme les poumons, le foie, les reins, les testicules et plus particulièrement au sein de la BHE où elle est fortement exprimée (Abe *et al.*, 1999). En effet, des études d'immunofluorescence ont révélé que la protéine OATP-A était exprimée par les cellules endothéliales cérébrales (Ganapathy *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2000). Ses substrats incluent les anions organiques amphiphiles, les cations organiques de type II et les peptides. Par ailleurs, il semblerait que les protéines Oatp2 et OATP-A soient également impliquées dans le transport d'autres stéroïdes (estrone-3-sulfate), des hormones stéroïdes (T3 et T4), de médicaments (fexofenadine), des composés cationiques (rocuronium) et des peptides exerçant une neuro-activité ([D-penicillamine 2,5]-enkephalin) (Dagenais *et al.*, 2001; Hagenbuch *et al.*, 2002). A partir de ces observations, Hagenbuch et al. ont émis l'hypothèse que les protéines Oatp2 et OATP-A travaillaient à la fois comme pompes d'efflux, pour les substrats synthétisés par le cerveau ainsi que pour les déchets produits nécessitant d'être efflués, et comme pompes d'influx, pour les composés neuroactifs tels que les peptides opioïdes (Hagenbuch *et al.*, 2002).

#### 2.4.2.2.2. Les protéines OATs

Les protéines OATs interviennent dans l'efflux de composés anioniques organiques tels que la benzylpenicilline par exemple, mais également de composés cationiques organiques comme la cimétidine (Kusuhara *et al.*, 1999; Nagata *et al.*, 2004). Parmi ces protéines OATs, la protéine Oat3 a été détectée au niveau des membranes apicale et basale des cellules endothéliales cérébrales, avec néanmoins une prédominance sur les membranes basales des cellules (Löscher and Potschka, 2002). Cette protéine Oat3 aurait un poids moléculaire plus élevé, que son homologue la protéine Oat1 présent au sein du foie, des reins, des yeux et du cerveau, en raison de son état de glycosylation (Kusuhara *et al.*, 1999). De plus la protéine Oat3 est un échangeur dont l'activité serait induite par un gradient de concentration extracellulaire de dicarboxylate (Sweet *et al.*, 2003). Par ailleurs le transporteur RST, transporteur apparenté aux protéines OATs, serait un transporteur facilité capable de réguler et de coordonner le transport des anions organiques par la protéine Oat3 au sein de la BHE (Bernacki *et al.*, 2008).

Enfin, la protéine RLIP76 confère une résistance aux médicaments, mais n'appartient pas à la famille des transporteurs ABC et des transporteurs SLCs. Cependant cette protéine est un transporteur, multi-spécifique, de composés chimiothérapeutiques amphiphiles tels que la doxorubicine et les conjugués électrophiles du glutathion, et interviendrait au sein de la BHE (Löscher and Potschka, 2002). En effet, Bennani-Baiti et al. ont montré, pour la première fois, que l'expression de la protéine RLIP76 est induite par la cytokine inflammatoire TNF- $\alpha$ , suivi d'une induction cinétique de marqueurs de l'inflammation, révélant ainsi que l'inflammation peut influencer l'expression de cette protéine au sein de la BHE (Bennani-Baiti *et al.*, 2015).

Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales constituent le siège anatomique de la BHE, de par ses propriétés physique, physiologique et métabolique. Toutefois, ces propriétés sont induites et régulées par les autres éléments qui constituent la BHE.

### **3. Une barrière dynamique**

Les paragraphes précédents ont mis en évidence le fait que les propriétés clés de la BHE étaient assurées par les cellules endothéliales. Cependant des études de transplantations, ont révélé que le maintien d'une BHE fonctionnelle était permis et régulé par les différents types cellulaires, composant la micro-niche de l'UNV (Stewart and Wiley, 1981; Janzer and Raff, 1987). En effet, la BHE étant une structure complexe et essentielle au maintien de l'environnement optimal neuronal, il n'est pas surprenant que les propriétés de barrières (biologique, physique et métabolique) soient induites et régulées par plusieurs types cellulaires. La régulation de ces propriétés est permise, principalement, par les astrocytes et les péricytes.

#### **3.1. Les astrocytes**

Les astrocytes montrent des morphologies différentes selon leur localisation et leur association avec les autres types cellulaires. Les études sur cultures cellulaires ont apporté des preuves évidentes sur l'implication des astrocytes dans la régulation des phénotypes de barrières de la BHE. Cette régulation concerne les jonctions serrées (phénotype de barrière physique), l'expression et la polarisation des transporteurs tels que la protéine Pgp et le transporteur GLUT-1 (phénotypes de barrières de transport et métabolique) et l'expression d'enzymes spécifiques (phénotype de barrière métabolique) (Dehouck *et al.*, 1990; Rubin *et al.*, 1991; Hayashi *et al.*, 1997; Sobue *et al.*, 1999; McAllister *et al.*, 2001; Haseloff *et al.*, 2005). L'interaction des astrocytes avec les cellules endothéliales cérébrales est connue pour réguler la morphologie de ces dernières, le phénotype de barrière ainsi que l'angiogénèse, que ce soit en conditions physiologique ou pathologique (Prat *et al.*, 2001).

Les astrocytes modulent le fonctionnement endothélial, en activant des voies de signalisation et en sécrétant des facteurs.

### 3.1.1. Les voies de signalisation

L'une d'elle est celle de Hedgehog (Hh) qui est impliquée dans la morphogénèse embryonique, l'orientation neuronale et l'angiogénèse. Toutefois, des études sur la TEER et la perméabilité ont permis de déterminer qu'une activation de la voie Hh induisait l'expression des protéines de jonctions, améliorant ainsi le phénotype de barrière de la BHE (Alvarez *et al.*, 2011). De plus il a été observé sur des souris, knock down pour le gène Smoothed (Smo), une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales de la BHE, qui est corrélée avec une diminution de l'expression des protéines jonctionnelles (Alvarez *et al.*, 2013). Le facteur Smo intervenant dans la voie de signalisation Hh, ces résultats tendent à conclure que cette voie de signalisation a une influence significative sur la fonction de la BHE. Par ailleurs il a été montré, sur une culture primaire de cellules endothéliales cérébrales, que la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine régulait également les propriétés de la BHE (Liebner *et al.*, 2008). Dans ce modèle cellulaire, la protéine  $\beta$ -caténine est stabilisée soit par un traitement de Wnt3a soit en tronquant son extrémité N-terminale. Cette stabilisation induit une augmentation de l'expression de la protéine claudine-3, ainsi qu'une augmentation de la formation de complexes jonctionnelles. Inversement, un manque de protéine  $\beta$ -caténine entraîne une rupture de la BHE (Liebner *et al.*, 2008). En continuité avec ces résultats, Daneman et al. ont mis l'accent sur l'impact de cette voie de signalisation sur l'angiogénèse du SNC ainsi que sur les transporteurs de la BHE. En effet, ils ont démontré que cette voie influençait certains transporteurs spécifiques de la BHE, tel que le transporteur GLUT-1, ainsi que leur rôle dans la formation de la BHE (Daneman *et al.*, 2009).

### 3.1.2. Les facteurs sécrétés

Les facteurs sécrétés par les astrocytes vont promouvoir la croissance vasculaire et l'induction des propriétés de la BHE.

**Le facteur de croissance de l'endothélium (VEGF)** dont l'action principale est de stimulée l'angiogénèse. Toutefois lors de conditions inflammatoires ce facteur diminue la

stabilité de la BHE (Argaw *et al.*, 2009, 2012), suggérant ainsi son implication au sein de la BHE lors d'états pathologiques.

**Les protéines angiopoïétines** sont également sécrétées par les astrocytes et vont intervenir dans la régulation de la BHE. L'angiopoïétine-1 intervient, comme son nom l'indique, dans le processus d'angiogénèse. Néanmoins elle est capable d'induire, de façon temporaire, une diminution de la perméabilité de la BHE en se fixant sur son récepteur endothélial TIE2. Cette diminution de perméabilité serait liée à une surexpression des protéines de jonctions (Prat *et al.*, 2001). En effet il a été démontré, *in vitro*, que cette liaison ligand/récepteur augmentait la TEER de la BHE (Igarashi *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003). Inversement le facteur endothélial LIF (endothelial-derived factor) permettait d'induire la différenciation des astrocytes (Mi *et al.*, 2001). L'angiopoïétine-2, quant à elle, participerait aux premières étapes de rupture de la BHE lors de pathologies, mais son mécanisme est peu connu (Nourhaghi *et al.*, 2003).

**Le facteur de croissance TGF- $\beta$**  sécrété par les astrocytes, est une cytokine impliquée dans la croissance cellulaire, la différenciation, la morphogénèse, l'apoptose et l'immunomodulation. Dans le SNC, ce TGF- $\beta$  a une action neuroprotectrice, puisque des études *in vitro* ont montré que ce facteur avait la capacité d'induire l'activité de la protéine Pgp et de réduire la perméabilité de la BHE (Dohgu *et al.*, 2005), empêchant ainsi aux composés neurotoxiques de traverser la BHE. De plus, le facteur TGF- $\beta$  permettrait de restreindre la migration des leucocytes à travers l'endothélium neurovasculaire (Daneman and Prat, 2015).

**L'acide rétinolique (RA)** est un dérivé de la vitamine A. D'après de récentes études, il serait également sécrété par les astrocytes. L'activation de son récepteur RAR- $\beta$  augmenterait la TEER qui serait corrélée avec une augmentation de l'expression des protéines Pgp, ZO-1 et de la VE-cadhérine (Daneman and Prat, 2015). Enfin l'acide rétinolique est connu pour réguler les voies de signalisation Hh et Wnt, ce qui suggère que ce dérivé pourrait être un modulateur de la BHE (Halilagic *et al.*, 2007; Paschaki *et al.*, 2012).

Lors de la découverte de la BHE, les chercheurs ont attribué l'induction et la régulation des propriétés de la BHE aux astrocytes, puisque leurs études ont montré que la TEER était significativement augmentée en présence d'astrocytes (Stewart and Wiley, 1981; Arthur *et al.*, 1987; Janzer and Raff, 1987). Cependant, une dizaine d'années plus tard, des études ont révélé que l'établissement des complexes des jonctions serrées de la BHE, qui sont responsables majoritairement du caractère imperméable de la BHE, pouvait s'effectuer en l'absence d'astrocytes (Felts and Smith, 1996; Jaeger and Blight, 1997). De nos jours, les péricytes sont étudiés comme modulateurs clés de la BHE et de l'UNV.

### **3.2. Les péricytes**

Les études récentes tendent à montrer l'implication majeure des péricytes dans la modulation de la BHE. Ce concept a été émis suite à des études *in vitro*, qui ont observé une augmentation de la TEER de cellules endothéliales en culture après ajout de péricytes (Dente *et al.*, 2001). Récemment Daneman et al. ont démontré le rôle des péricytes dans la formation de la BHE lors du développement, et cela bien avant que le contact avec les astrocytes soient établis. En effet, les péricytes contrôleraient la formation des jonctions serrées et du trafic vésiculaire transendothélial (Daneman *et al.*, 2010). Armulik et al. ont montré qu'un manque de péricytes entraînait une augmentation du taux de transcytose ainsi que des molécules d'adhésion leucocytaire, conduisant à une infiltration des cellules immunitaires dans le SNC. En effet, des souris mutées (peu de péricytes) ont permis de déterminer que ces péricytes étaient nécessaires à la régulation de l'homéostasie de la BHE et plus particulièrement sur l'inhibition de la transcytose (Armulik *et al.*, 2010). Une comparaison des analyses transcriptionnelles de ces souris mutées versus souris sauvages ont suggéré que l'expression des gènes impliqués dans les propriétés spécifiques de la BHE était peu altérée (jonctions, transporteurs). Cependant les gènes impliqués dans les propriétés spécifiques des cellules endothéliales de la BHE (faible transcytose et adhésion leucocytaire) étaient augmentés (Daneman *et al.*, 2010). Ces résultats permettent de conclure sur le rôle des péricytes dans la régulation des propriétés de la BHE. En effet, ceux-ci interviendraient sur les propriétés d'inhibition de la BHE : manque de transcytose et de filtration des cellules immunitaire.

Enfin, au cours du vieillissement, le cerveau subirait une perte de péricytes qui serait corrélée à une réduction progressive des protéines des jonctions serrées comme l'occludine, la

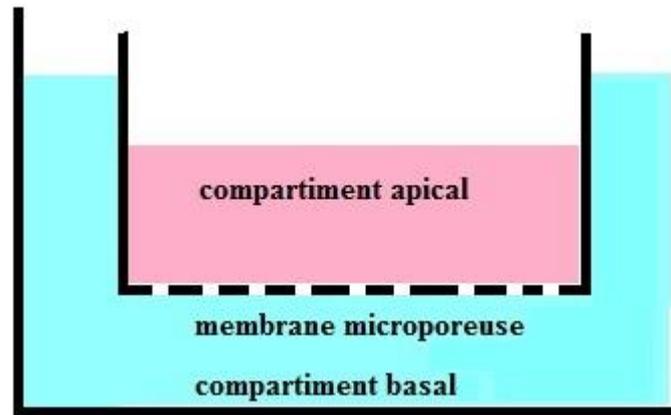
claudine-5 ou ZO-1 (Bell *et al.*, 2010). Cette diminution de protéines des jonctions serrées va entraîner une augmentation du passage paracellulaire ce qui va contribuer à l'entrée de molécules neurotoxiques dans l'espace périvasculaire ou dans l'endothélium vasculaire cérébral, pouvant entraîner à long terme une neurodégénération (Bell *et al.*, 2010; Winkler *et al.*, 2011).

**L'endothélium, qui tapisse la surface des capillaires cérébraux, possède donc des propriétés qui le différencient des autres endothélia. En effet, la différence entre eux provient de la présence de complexes jonctionnels qui vont sceller l'espace intercellulaire, associés à des enzymes et des pompes d'efflux restreignant le passage de nombreux substrats, mais aussi du manque de transport vésiculaire. Toutes ces caractéristiques permettent à la BHE d'assurer une protection vis-à-vis du cerveau contre tous composés potentiellement toxiques, présents dans le sang. Toutefois la BHE autorise le transport de certaines molécules essentielles au bon fonctionnement cérébral. Cette caractéristique physiologique est assurée par des transporteurs, hautement spécifiques, permettant principalement l'approvisionnement du cerveau en nutriments. La formation et les propriétés liées au fonctionnement de la BHE sont sous la responsabilité d'autres types cellulaires, qui forment également la BHE (astrocytes et péricytes).**

La BHE, étant une structure complexe et ayant un rôle essentiel dans le bon fonctionnement du cerveau, a fait l'objet de nombreuses études. Pour étudier son fonctionnement dans des conditions pathologiques, comme l'hypoxie, différentes possibilités s'offrent aux scientifiques : les modèles *in vivo*, *in vitro* en passant par les modèles *in silico*. La prochaine partie va développer les modèles d'étude de la BHE en se centrant sur les modèles *in vitro* qui sont les plus utilisés dans la littérature.

## Chapitre 2 : Modèles d'étude *in vitro* de la BHE

Les modèles *in vitro* ont fortement contribué aux recherches menées sur la BHE. En effet la BHE étant la première ligne de défense du cerveau, elle est impliquée dans de nombreuses pathologies du SNC. Pour comprendre et traiter le plus efficacement possible ces pathologies, il est nécessaire d'avoir de meilleures connaissances sur la fonction et la régulation de cette barrière. La BHE étant composée de différents types cellulaires (cf Chapitre 1), qui individuellement contribue au maintien et à la fonction de cette dernière, l'identification ainsi que le ciblage des mécanismes cellulaires semblent indispensables. Cependant le cerveau étant un organe complexe, l'interprétation des résultats obtenus chez l'animal reste difficile. Les modèles *in vitro* présentent, alors, un fort intérêt afin de pallier aux difficultés rencontrées lors d'études menées *in vivo* (Wilhelm and Krizbai, 2014). En effet, ces modèles *in vitro* permettent d'étudier, de façon plus précise, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le fonctionnement de la BHE, tout en mimant le plus fidèlement possible les conditions *in vivo* (Cecchelli *et al.*, 2007). Par ailleurs, les conditions expérimentales sont plus facilement contrôlables *in vitro* qu'*in vivo*, et sont plus acceptables d'un point de vue éthique puisqu'elles permettent de réduire de façon drastique le nombre d'animaux utilisés. Durant ces quarante dernières années, ces modèles *in vitro* ont permis d'améliorer nos connaissances sur le contrôle du passage et de l'efflux des substances endogènes. De plus, ils ont apporté des éléments de réponses sur la fonction des différents types cellulaires de la BHE dans la régulation de cette dernière lors de processus physiologique ou pathologique (Ogunshola, 2011). Enfin la mise en place, plus ou moins facile, de ces modèles cellulaires ainsi que leur faible coût, a conduit au développement de différents modèles qui seront décrits dans ce chapitre. Un modèle de BHE doit pouvoir proposer deux compartiments afin de mimer la circulation sanguine et le compartiment cérébral. En effet, bien que la culture de cellules endothéliales sur des boîtes de pétri permettent différentes études telles que des études de cytotoxicité ou de signalisation intracellulaire induite par des médicaments, elle ne peut être considérée comme un modèle de BHE en raison de ce manque de compartimentation (Wilhelm and Krizbai, 2014). Le développement de modèle *in vitro* de BHE a été possible grâce au système d'inserts (**Figure 13**). Le principe de ces inserts repose sur une membrane microporeuse, dont le diamètre des pores peut varier, et qui permet les échanges, entre l'insert et le puits, de petites molécules et de facteurs de croissance sécrétés par les cellules. Enfin cette membrane microporeuse empêche la migration de cellules entre les deux compartiments.



**Figure 13 : Schéma représentant les systèmes de culture sur insert (transwell).** Les cellules (pour la BHE ce sont les cellules endothéliales) sontensemencées sur la membrane microporeuse (côté apical). Ces systèmes d'inserts, commercialisés sous différents formats, permettent de cultiver les cellules endothéliales avec plusieurs types cellulaires (astrocytes, neurones, péricytes). Ces derniers sont alorsensemencés sous la membrane microporeuse (côté basal) ou au fond du puits.

L'apparition de ces systèmes d'inserts a permis de mettre en place des modèles *in vitro* de BHE dont les études ont permis d'accroître nos connaissances sur cette barrière. Cependant ces modèles *in vitro* doivent posséder certains critères afin de pouvoir être considéré comme un modèle adéquat voire idéal à la recherche.

## 1. Critères attendus pour un modèle *in vitro* de BHE

Un modèle *in vitro* de BHE doit posséder différents critères pour être considéré comme un modèle fonctionnel et adéquat à la recherche. Ces critères font notamment intervenir la reproductibilité du modèle, la perméabilité à différents composés, la présence des complexes des jonctions serrées, l'expression de transporteurs (Cecchelli *et al.*, 2007).

L'une des caractéristiques les plus attendues d'un modèle *in vitro* de BHE est la forte étanchéité des jonctions inter-endothéliales (Naik and Cucullo, 2012). Cette étanchéité peut être estimée selon deux méthodes :

- **La TEER** (résistance électrique transendothéliale) permet d'apporter des informations sur la perméabilité aux ions. Plus cette TEER est élevée plus le modèle aura une étanchéité importante. En effet, cette résistance électrique est d'autant plus élevée que

la perméabilité est faible. Il est estimé qu'un modèle *in vitro* de BHE doit avoir une TEER supérieure à cent ou tout du moins avoisinant les cent ohm.cm<sup>2</sup> (Naik and Cucullo, 2012). Toutefois cette mesure de TEER peut varier d'une étude à l'autre sur un même modèle. Cette différence peut s'expliquer notamment par les techniques de mesure utilisées (électrodes, mesure d'impédance, un transistor électrochimique organique (Jimison *et al.*, 2012), mesures en temps réel), par la température ou par la manipulation des cellules durant les mesures (Helms *et al.*, 2016). De plus la mesure de TEER ne permet pas, à elle seule, de définir totalement l'étanchéité d'un modèle puisque cette dernière dépend à la fois de la composition des complexes des jonctions serrées ainsi que de la taille des composés d'intérêt. Afin de valider complètement l'étanchéité du modèle il est nécessaire d'effectuer une étude de la perméabilité membranaire.

- **La perméabilité membranaire** est menée avec des marqueurs d'intégrité, c'est-à-dire une molécule pouvant traverser difficilement la membrane des cellules. Ce sont souvent des molécules hydrophiles tels que le lucifer Yellow (444 Da), le sodium fluorescéine (376 Da), le sucrose (342 Da) (Wilhelm and Krizbai, 2014) ou le mannitol (180 Da) (Helms *et al.*, 2016). Toutefois ce marqueur ne doit pas être un substrat d'un transporteur, d'une enzyme ou d'un récepteur. Cette perméabilité doit se rapprocher de celle observée *in vivo* soit de l'ordre de 10<sup>-6</sup> cm.s<sup>-1</sup> (Bickel, 2005; Wilhelm and Krizbai, 2014). La détermination de ce coefficient de perméabilité, appelée « Pe » sera expliquée dans la partie expérimentale de ce manuscrit.

La TEER est corrélée avec la perméabilité membranaire, donnée par ses petites molécules hydrophiles. Toutefois cette corrélation dépend fortement de la taille de la molécule ainsi que du design de l'étude, c'est-à-dire la présence ou non d'une agitation, un changement du milieu, la durée de l'étude... Une caractérisation optimale de l'étanchéité d'un modèle *in vitro* de BHE doit prendre en compte à la fois des mesures de TEER mais aussi des mesures de perméabilité membranaire.

La deuxième caractéristique, qui découle de la première, est l'expression de protéines des jonctions serrées, localisées, à la surface des cellules endothéliales cérébrales du modèle de

BHE. Les trois protéines, les plus couramment étudiées, sont l'occludine, ZO-1 et la claudin-5 (Naik and Cucullo, 2012). En effet, cette dernière serait fortement exprimée au sein des cellules endothéliales composant la BHE. Une perte de protéine claudine-5 entrainerait le passage de petites molécules à travers cette barrière et donc favoriserait l'accès au compartiment cérébral (Nitta *et al.*, 2003). Ces protéines des jonctions serrées peuvent être étudiées par les techniques de cell-ELISA, de western blot, de qPCR ou encore par microscopie confocale. Toutes ces techniques permettent de donner des informations sur l'expression et la localisation de ces différentes protéines des jonctions serrées, au sein du modèle *in vitro* mis en place.

Enfin une des dernières caractéristiques qui doit être validée concerne les transporteurs de type ABC (la protéine Pgp par exemple) ou SLC (le transporteur GLUT-1 par exemple) (décrit dans le chapitre 1). La validation doit comprendre trois points : la localisation, l'expression et la fonctionnalité de ces transporteurs.

- **La localisation** : les transporteurs et notamment les pompes d'efflux (les protéines Pgp, MRP-1) doivent présenter une distribution asymétrique. En effet, il a été montré que les transporteurs d'efflux seraient présents en majorité sur la surface apicale des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (Naik and Cucullo, 2012). A l'inverse le transporteur spécifique au glucose (transporteur GLUT-1) est majoritairement localisé sur la surface basale des cellules endothéliales de la BHE (côté compartiment cérébral) (Simpson *et al.*, 2007). Cette localisation sur la membrane basale des cellules endothéliales cérébrales s'explique par la forte demande du cerveau en glucose pour son bon fonctionnement et notamment celui des neurones. En effet, ces derniers sont de grands consommateurs de glucose.
- **L'expression** peut être caractérisée soit au niveau de l'ARNm soit au niveau de la protéine (Helms *et al.*, 2016). L'étude de l'expression va permettre de confirmer la distribution de ces transporteurs.
- **La fonctionnalité** des transporteurs : cette validation est très importante dans la caractérisation du modèle *in vitro* mis en place notamment pour les études sur la perméabilité du modèle de BHE, des études de toxicité ou de développement de médicaments (Helms *et al.*, 2016). Cette fonctionnalité peut être étudiée par des études

d'accumulation de substrats (fluorescents ou radioactifs) ou par des études de transports bidirectionnels d'un substrat. Ces études de perméabilité bidirectionnelles (du côté apical vers le côté basal et inversement) permettent de déterminer un ratio sur la quantité de substrat relâché, ou la quantité qui est passée dans la cellule. Si ce ratio est supérieur à 1,5-2 (dans le cas où l'éjection du substrat est observée) ou inférieur à 0,5 (dans le cas où l'entrée du substrat est observée) le transport est considéré comme actif. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques, à un type de transporteur, permet d'affiner l'étude en apportant des informations sur le type de transporteur responsable du passage ou de l'efflux de la substance (Wilhelm and Krizbai, 2014; Helms *et al.*, 2016).

Ces trois caractéristiques permettent de valider un modèle *in vitro* de BHE. Ces dernières années ont révélé de nombreuses études mettant en place une diversité de modèles *in vitro* de BHE. Cette diversité repose, notamment, sur le choix de l'espèce, du type de cellules utilisées ou du type de modèle.

## **2. Les types cellulaires**

Dans la littérature, les modèles cellulaires de BHE développés utilisent le plus souvent des cellules provenant de mammifères, tels que des cellules de souris, de rat, de porc, de bovins, et plus récemment des cellules humaines. Depuis la dernière décennie, deux types de cultures cellulaires ont été utilisés pour développer des modèles *in vitro* de BHE : la culture de **cellules primaires** ou l'utilisation de **lignées cellulaires dites immortalisées**.

### **2.1. Les cellules primaires**

#### **2.1.1. Origine des cellules**

Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, isolées pour la culture primaire, proviennent d'un large spectre d'espèces appartenant aux mammifères essentiellement chez la souris, le rat, le porc ou le bovin (Deli *et al.*, 2005). Les modèles murins sont les plus souvent

utilisés. Ceci s'explique par le fait que ces espèces sont les mieux caractérisées, mais également par le nombre important d'anticorps ou de gènes disponibles. Néanmoins, en raison de leurs petites tailles le nombre de cellules endothéliales isolées restent faibles (Wilhelm *et al.*, 2011).

Les modèles porcins ou bovins apportent un grand nombre de cellules endothéliales cérébrales, ainsi qu'une perméabilité satisfaisante (Patabendige *et al.*, 2013). Toutefois, l'accès à ces espèces est restreint et d'un point de vue moléculaire et biochimique ces espèces sont moins bien caractérisées (Abbott, 2013). Enfin, l'utilisation de cellules endothéliales cérébrales humaines est restreinte. En effet, ces cellules proviennent d'un tissu cérébral issu d'une intervention chirurgicale (autopsies ou biopsies) (Persidsky *et al.*, 1997; Bernas *et al.*, 2010). Par conséquent il ne peut être considéré comme provenant d'un tissu sain.

### **2.1.2. Avantages et limites des cellules primaires**

Ces cellules primaires de cellules endothéliales cérébrales ont permis l'identification de mécanismes et de signaux biomécaniques intervenant dans la régulation des fonctions de la BHE (Naik and Cucullo, 2012), mais sont aussi souvent utilisées dans les études de perméabilité aux médicaments (Wilhelm and Krizbai, 2014). L'avantage principal de ces cellules est de reproduire les caractéristiques cellulaires et structurelles, ainsi que les propriétés d'une BHE *in vivo* (Cecchelli *et al.*, 2007; Naik and Cucullo, 2012). Ceci s'explique par la production d'une barrière étanche illustrée notamment par une forte TEER. En effet, des cellules endothéliales cérébrales isolées chez le porc atteignent, en mono-culture, une TEER avoisinant les 700-800  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Franke *et al.*, 2000; Patabendige *et al.*, 2013). Les modèles murins ou bovins en co-culture peuvent également atteindre des TEER élevées variant de 200 à 400  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  et pouvant aller jusqu'à 600-700  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (Boveri *et al.*, 2005; Coisne *et al.*, 2005; Nakagawa *et al.*, 2009; Wilhelm *et al.*, 2011; Abbott, 2013).

Cependant, ces cellules primaires présentent certains inconvénients qui peuvent limiter leurs utilisations. Tout d'abord, les techniques d'isolement des cellules sont difficiles et intenses, et malgré l'avancée des méthodes de purification la présence d'autres types cellulaires n'est pas négligeable (Naik and Cucullo, 2012). De plus, ces cellules perdent rapidement leurs propriétés de BHE au cours de la culture cellulaire, même en présence d'astrocytes, péricytes ou neurones. Ceci peut donc limiter la durée des études menées sur ces cellules.

Malgré le fait que les cellules primaires se rapprochent le plus des conditions *in vivo* d'une BHE, les difficultés d'isolement et de culture ainsi que le coût assez élevé de cette méthode ne permettent pas d'envisager des études sur une longue durée. Toutefois il existe des lignées cellulaires qui permettent d'obtenir une BHE *in vitro*.

## 2.2. Les lignées cellulaires

### 2.2.1. Origine des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires immortalisées sont généralement des cellules primaires qui ont été modifiées génétiquement pour prolonger leur temps de culture, d'où le terme « immortalisées » (Rahman *et al.*, 2016). Les modifications génétiques sont souvent faites par introduction de rétrovirus dans ces cellules. Ces lignées cellulaires immortalisées sont disponibles pour plusieurs espèces animales, ou chez l'Homme (Naik and Cucullo, 2012), bien que le plus souvent les modèles utilisent des lignées provenant du rat ou de la souris (Cardoso *et al.*, 2010). Elles sont fournies principalement par des banques cellulaires telles que l'American Type Culture Collection (ATCC), l'European Collection of Animal Cell Culture ou le Leibniz-Institut-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Rahman *et al.*, 2016).

La lignée cellulaire de cellules endothéliales cérébrales, la plus caractérisée, est la lignée RBE4 obtenue chez le rat après transfection avec un plasmide contenant le gène de l'adénovirus E1A. Cette lignée possède de nombreuses caractéristiques d'une BHE comme une forte activité de l'alkaline phosphatase ou la gamma-glutamyl transpeptidase (Roux *et al.*, 1994). La lignée RBE4 a été souvent utilisée, notamment pour des études de signalisation (Krizbai *et al.*, 1995; Fábíán *et al.*, 1998; Smith and Drewes, 2006; Zhang *et al.*, 2011) de migration cellulaire (Barakat *et al.*, 2008) et de perméabilités (Pan *et al.*, 2005). L'équipe de Risau a généré les premières lignées cellulaires de cellules endothéliales cérébrales chez la souris : bEnd.3 et bEnd.5. Ces lignées ont été obtenues après transfection avec l'antigène Polyoma middle T (Wagner and Risau, 1994). Toutefois il existe peu de lignées immortalisées provenant de l'Homme: la lignée HMEC-1 (Ades *et al.*, 1992), la lignée HCMEC/D3 (Cucullo *et al.*, 2008;

Vu *et al.*, 2009), et la lignée TY08 (Sano *et al.*, 2010), par exemple. Enfin certains modèles de BHE utilisent des lignées cellulaires provenant du porc ou de bovin. Cependant ces dernières sont bien moins caractérisées (Wilhelm and Krizbai, 2014).

### 2.2.2. Avantages et limites de ces lignées cellulaires immortalisées

L'utilisation de ces lignées cellulaires immortalisées reste très avantageuse par rapport à la culture primaire, notamment par la simplicité des techniques de culture ainsi que la réduction du coût (Zhang *et al.*, 2011). En effet, ce sont des lignées fiables car elles proviennent de sources de confiance, accessibles avec une longue durée de vie (Helms *et al.*, 2016). De plus, il existe un nombre important de lignées cellulaires endothéliales cérébrales qui ont été reportées dans la revue de Helms et al. en 2016 (Helms *et al.*, 2016).

Toutefois, les manipulations génétiques par rétrovirus afin d'immortaliser les cellules, peuvent affecter des fonctions cellulaires notamment altérer les réponses physiologiques à des stimuli endogènes ou exogènes (Naik and Cucullo, 2012). Enfin certaines lignées cellulaires immortalisées utilisées pour développer des modèles de BHE *in vitro* n'atteignent qu'une faible TEER (Cardoso *et al.*, 2010). Malgré ces derniers points, ces lignées immortalisées restent des méthodes adéquates pour reproduire une BHE *in vitro* dans le but de l'étudier dans des conditions physiologique et pathologique.

## 3. Les différents types de modèles *in vitro* de BHE

Les quarante dernières années ont révélé de nombreux modèles *in vitro* de BHE. Ces modèles ont été classés en deux grandes catégories : les modèles **dynamiques** qui prennent en compte le shear stress généré par le flux sanguin ; les modèles **statiques** qui s'en affranchissent.

## 3.1. Les modèles statiques

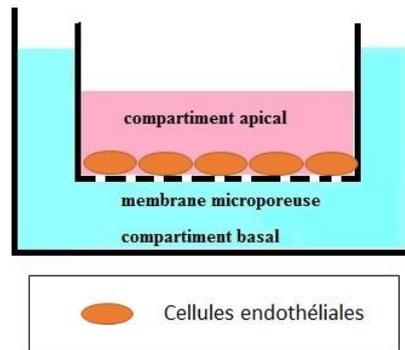
Ces modèles reposent sur la culture sur inserts décrite en introduction de chapitre. Cette technique d'insert a permis le développement de nombreux modèles *in vitro* de BHE. La variété des modèles repose en particulier sur le nombre de types cellulaires impliqués dans le modèle. A ce jour, trois types de modèles statiques se distinguent : les modèles mono-culture (un seul type cellulaire impliqué), les modèles co-culture (deux types cellulaires) et les modèles tri-culture (trois types cellulaires).

### 3.1.1. Modèles mono-culture

C'est le modèle le plus simplifié qui est développé dans la littérature.

#### 3.1.1.1. Principe

Ce modèle repose sur l'utilisation d'insert qui permet une diffusion verticale à travers la membrane microporeuse semi-perméable qui sépare les deux compartiments. L'insert mime le compartiment sanguin (côté apical) tandis que le puits où repose l'insert mime le compartiment parenchymateux (coté basal) (He *et al.*, 2014). Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sont cultivées jusqu'à confluence sur la surface de la membrane de l'insert dans leur milieu de culture qui leur est spécifique (**Figure 14**). Les micropores de la membrane de l'insert (de diamètre variable) permettent les échanges en nutriments entre les compartiments ainsi que les substances endogènes (Naik and Cucullo, 2012).



**Figure 14 : schéma d'un modèle mono-culture.** Cela représente un modèle très simplifié d'une BHE *in vitro*. Seules les cellules endothéliales cérébrales (d'espèces différentes selon les modèles) sontensemencées sur la membrane de l'insert côté apical.

### 3.1.1.2. Modèles utilisés dans la littérature

L'équipe de Bowman met en place le premier modèle *in vitro* de BHE en se basant sur un système de mono-culture (Bowman *et al.*, 1983). Leur modèle repose sur des cellules endothéliales cérébrales bovines. Cependant, le manque d'informations sur la BHE *in vivo* bovine, rend les comparaisons difficiles (Abbott *et al.*, 1992). Par la suite, plusieurs modèles de BHE en mono-culture ont été mis en place en utilisant des cellules endothéliales cérébrales d'espèces différentes, telles que le rat, la souris, le porc ou plus récemment des cellules humaines. Par exemple, l'équipe de Franke a développé un modèle *in vitro* de BHE, reposant sur une mono-culture de cellules endothéliales cérébrales porcines, qu'ils ont cultivées en présence d'hydrocortisone (Franke *et al.*, 2000). Ainsi, ils ont obtenu un modèle possédant une forte TEER associée à une faible perméabilité vis-à-vis du saccharose. L'hydrocortisone a également été utilisée dans d'autres modèles cellulaires de BHE, notamment des modèles utilisant des cellules endothéliales de rat (Rubin *et al.*, 1991; Boveri *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2011). En effet, des cellules endothéliales cérébrales primaires de rat, cultivées avec de l'hydrocortisone et de l'AMPc, ont atteint une TEER avoisinant  $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Wilhelm *et al.*, 2011).

L'équipe de Brown a mis en place un modèle *in vitro* de BHE en mono-culture, utilisant la lignée cellulaire murine bEnd.3. Ils ont ainsi obtenu une faible TEER avoisinant  $90 \Omega \cdot \text{cm}^2$  et une forte perméabilité pour le sucrose autour de  $8 \cdot 10^{-4} \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$  (Brown *et al.*, 2007).

Récemment, certaines études utilisent la lignée humaine HCMEC/D3, pour développer un modèle mono-culture de BHE (Weksler *et al.*, 2005; Paolinelli *et al.*, 2013). Ce modèle exprime

des protéines de jonctions serrées, néanmoins en plus petites quantités qu'au sein des microvaisseaux, ce qui est illustré par une TEER avoisinant 30-50  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  et une perméabilité autour de 20-90.10<sup>-6</sup>  $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$  pour le sucrose, le mannitol ou le sodium fluoresceine.

Enfin, il existe d'autres modèles *in vitro* de BHE basés sur un système de mono-culture, utilisant d'autres cellules endothéliales qui proviennent d'espèces différentes (pour revue voir Helms et al. (Helms *et al.*, 2016)). En Effet, récemment des modèles *in vitro* de BHE ont été développés à partir de cellules endothéliales humaines, provenant de cellules souches (Cecchelli *et al.*, 2014; Lippmann *et al.*, 2014). Toutefois ces modèles sont à ce jour peu caractérisés mais permettraient des études de perméabilité aux médicaments et des études mécanistiques (Helms *et al.*, 2016).

### **3.1.1.3. Avantages et limites du système mono-culture**

Du fait de sa simplicité, ces modèles permettent des études de screening à faibles coûts, telles que des tests de perméabilité aux médicaments, des mesures d'affinité de liaison ligand/récepteur ou encore des études de transport (Berezowski *et al.*, 2004).

Cependant, ces systèmes ne sont pas adéquats pour des études sur l'intégrité de la BHE. En effet, de part cette simplicité, certaines caractéristiques de la BHE sont absentes notamment au niveau des propriétés de barrière paracellulaire illustrées par une faible TEER (Wilhelm and Krizbai, 2014).

Malgré le fait que les cellules endothéliales cérébrales soient le siège de la BHE, d'autres types cellulaires induisent et/ou modulent les propriétés structurelles et fonctionnelles de cette barrière. Ceci a conduit au développement de nouvelles configurations de modèle *in vitro* de BHE, incluant d'autres types cellulaires de la BHE, comme les astrocytes, les péricytes ou les neurones.

### **3.1.2. Modèles co-culture**

Afin de mimer le plus fidèlement possible la structure *in vivo* de la BHE, les cellules endothéliales cérébrales sont cultivées avec d'autres types cellulaires qui contribuent directement aux propriétés de barrière de la BHE. La plupart des modèles de co-culture de la littérature utilisent des astrocytes ou des péricytes.

### **3.1.2.1. Co-culture cellules endothéliales/astrocytes ou apports astrocytaires**

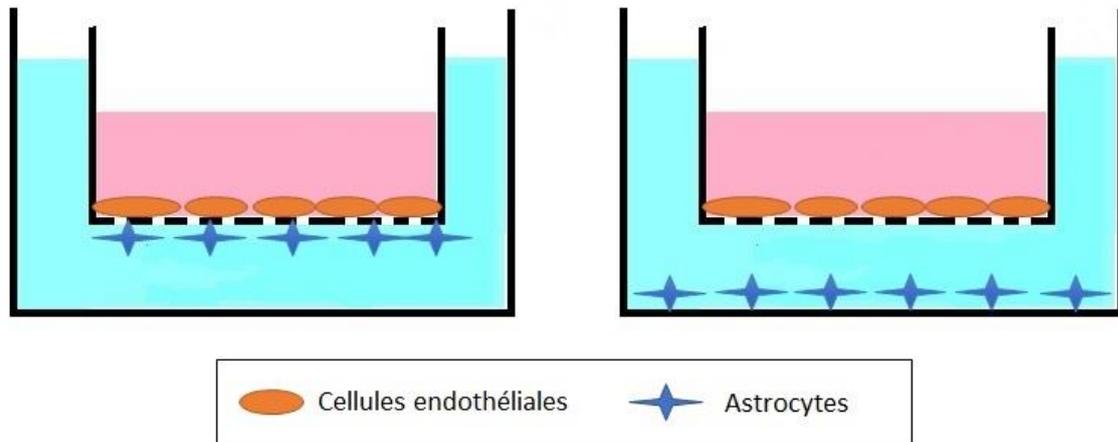
Les astrocytes ont permis l'établissement du plus grand nombre de modèle co-culture de BHE (Deli *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2011), en raison de leur forte implication dans les propriétés de la BHE, telles que sa fonction, son étanchéité ou l'expression de certaines protéines (DeBault and Cancilla, 1980; Beck *et al.*, 1984; Naik and Cucullo, 2012). Ces modèles associent les différents types de culture de cellules endothéliales décrits précédemment avec des cellules gliales.

Les cellules gliales utilisées peuvent provenir soit de cultures primaires ou de lignées, notamment la lignée C6 (cellules de gliomes de rat) qui est une des plus utilisées (Hu *et al.*, 2010). Certains modèles sont dits « syngéniques », c'est-à-dire que les cellules endothéliales cérébrales et les cellules gliales proviennent de la même espèce telle que chez le rat (Veszeka *et al.*, 2007; Hutamekalin *et al.*, 2008), chez la souris (Coisne *et al.*, 2005; Stamatovic *et al.*, 2005). D'autres modèles vont intégrer des cultures cellulaires d'origines différentes. C'est le cas, par exemple, du modèle développé par Dehouck *et al.* Ce modèle associe des cellules endothéliales cérébrales bovines et des cellules gliales de rat (Dehouck *et al.*, 1990).

Différentes configurations sont possibles lors de la mise en place d'un modèle co-culture de BHE. L'une d'elles consiste à ensemercer les cellules endothéliales cérébrales sur la face apicale de la membrane microporeuse de l'insert, tandis que les cellules gliales sont cultivées sur la surface basale de cette membrane (**Figure 15**). Cette configuration permet un contact direct entre les astrocytes et les cellules endothéliales cérébrales. C'est le cas du modèle développé par Li *et al.* (Li *et al.*, 2014). Ils ont ainsi pu observer une augmentation de la TEER de 170% par rapport à un modèle de mono-culture.

La deuxième configuration consiste à ensemercer les cellules endothéliales cérébrales au niveau de la membrane de l'insert sur le versant apical mais, cette fois-ci, les cellules gliales

sont cultivées au fond du puits (**Figure 15**). Dans ce cas, ce sont les facteurs solubles sécrétés par les cellules gliales qui vont induire les propriétés (Wilhelm and Krizbai, 2014). C'est le cas du modèle développé par Santaguida et al. (Santaguida *et al.*, 2006). Ils ont ainsi pu montrer une importante amélioration de la TEER et une faible perméabilité pour le sucrose et au [<sup>14</sup>C] phénytoin.



**Figure 15 : Schéma des différentes configurations de co-culture cellules endothéliales/astrocytes.**

Soit les cellules endothéliales cérébrales sontensemencées sur la surface apicale de l'insert et les cellules gliales sur la surface basale de l'insert. Soit les cellules endothéliales cérébrales sontensemencées sur la surface apicale de l'insert tandis que les cellules gliales sont cultivées au fond du puits.

Dans les deux cas, ces configurations apportent une amélioration de la TEER et de l'étanchéité (pour revue se référer à He et al., (He *et al.*, 2014)). Par exemple, Coisne et al. ont montré que leur modèle de co-culture présentait des caractéristiques propres à une BHE, que ce soit d'un point de vue protéique avec une forte expression d'occludine, de claudines -3 et -5 ainsi que la protéine P-glycoprotéine (Pgp), ou d'un point de vue perméabilité avec une TEER avoisinant les 800  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  et une perméabilité au sucrose autour de  $4,5 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$  (Coisne *et al.*, 2005). Toutefois l'équipe de Cohen-Kashi Malina a démontré que le contact direct entre astrocytes et cellules endothéliales cérébrales était nécessaire pour avoir une bonne étanchéité (Cohen-Kashi Malina *et al.*, 2009).

Enfin la dernière configuration est une intermédiaire entre le modèle mono-culture et le modèle co-culture. Dans ce cas, les cellules endothéliales cérébrales sontensemencées sur la surface apicale de l'insert et sont cultivées avec du milieu conditionné de cellules gliales afin de mimer l'influence de ces dernières (Rubin *et al.*, 1991; Wolburg *et al.*, 1994; Siddharthan *et*

*al.*, 2007). Toutefois ce milieu conditionné n'est pas suffisant pour induire les propriétés restrictives de la BHE *in vitro* (Wilhelm and Krizbai, 2014).

L'étroite proximité des cellules endothéliales et des péricytes *in vivo* ainsi que le rôle émergent de ces derniers dans la formation de la BHE, a conduit au développement de modèles co-culture qui associent ces deux types cellulaires.

### **3.1.2.2. Co-culture cellules endothéliales/péricytes**

Bien que les péricytes soient en contact très étroit avec les cellules endothéliales cérébrales *in vivo*, leur rôle au sein de la BHE est bien moins caractérisé que celui des astrocytes. Ces modèles de co-culture permettent d'étudier, en particulier, l'influence des péricytes sur la BHE.

Le principe de la mise en place du modèle de co-culture avec les péricytes est identique à celui décrit avec les astrocytes (**Figure 15**).

Des études sur des modèles murins ont montré que les péricytes étaient capables d'augmenter la TEER au sein des cellules endothéliales cérébrales en co-culture (Hayashi *et al.*, 2004; Santaguida *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2009), mais aussi de diminuer la perméabilité paracellulaire de ces cellules endothéliales (Hayashi *et al.*, 2004; Dohgu *et al.*, 2005). De plus, un milieu conditionné de péricytes induirait l'expression d'une protéine de jonctions serrées : l'occludine, au sein des cellules endothéliales (Hori *et al.*, 2004a). Ces données tendent à démontrer que les péricytes pourraient améliorer les propriétés de la BHE, notamment au niveau de la perméabilité et de l'expression des protéines de jonctions serrées.

Toutefois, des modèles de co-culture mis en place avec des cellules d'origines bovine ou porcine, ont donné des résultats différents. En effet, le modèle de co-culture bovin, développé par l'équipe de Ruchoux, a obtenu une faible TEER et une augmentation de la perméabilité avec les péricytes en comparaison à la monocouche de cellules endothéliales

cérébrales (Ruchoux *et al.*, 2002). Des résultats similaires ont été obtenus avec des modèles de co-culture d'origine porcine (Thanabalasundaram *et al.*, 2010).

Par conséquent il est difficile, au vu de ces expériences, d'affirmer que les péricytes cérébraux influent, de manière directe, le phénotype de la BHE. Certaines études se sont alors intéressées à l'influence des autres types cellulaires de la BHE.

### **3.1.2.3. Autres modèles de co-culture**

Des études ont démontré que les neurones induisaient la production, au sein des cellules endothéliales, d'enzymes nécessaires à la BHE (Tontsch and Bauer, 1991). Par ailleurs, un modèle de co-culture associant les cellules RBE4 et des neurones corticaux, a permis de mettre en évidence qu'un contact direct entre les deux types cellulaires n'était pas nécessaire pour induire l'expression de l'occludine (Cestelli *et al.*, 2001). De plus, des progéniteurs neuronaux en co-culture avec des cellules endothéliales cérébrales seraient capables d'induire une augmentation de la TEER ainsi qu'une diminution de la perméabilité à la sodium fluorescéine (Weidenfeller *et al.*, 2007).

Enfin, un modèle mettant en co-culture des cellules endothéliales cérébrales bovines et des macrophages, a été développé par l'équipe de Zenker. Leur modèle permettait d'augmenter la TEER de 50% (Zenker *et al.*, 2003).

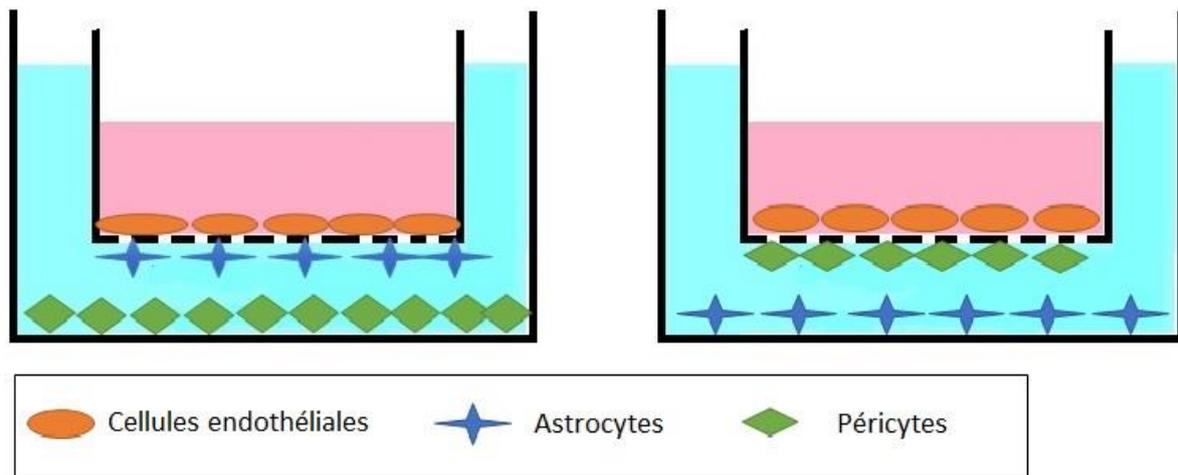
Ces modèles co-culture de BHE génèrent une barrière très étanche, et sont très adéquats pour des études de perméabilité, sur les interactions entre les cellules, ainsi que pour l'identification et le développement de médicaments. Néanmoins, la BHE étant une unité complexe, certains modèles *in vitro* de BHE associent trois types cellulaires (cellules endothéliales, astrocytes et péricytes ou neurones). Ces modèles de tri-culture sont plus complexes mais permettent de se rapprocher davantage d'une BHE *in vivo*.

### 3.1.3. Les modèles tri-culture

Quelques modèles de tri-culture ont été développés. Ces modèles ont en commun deux types cellulaires : les cellules endothéliales cérébrales et les astrocytes, puis selon les modèles le troisième type peut être soit des péricytes, soit des neurones.

#### 3.1.3.1. Modèles tri-culture cellules endothéliales/astrocytes/péricytes

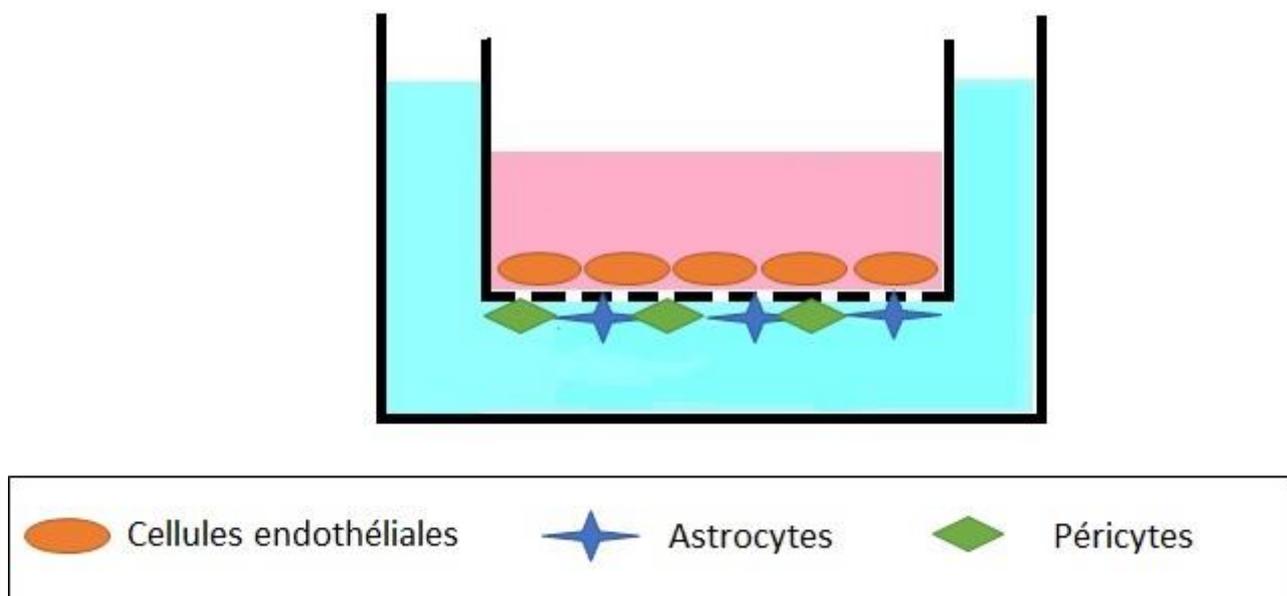
Parmi les tri-cultures existantes, celle de l'équipe de Nakagawa associe des cellules endothéliales cérébrales, des astrocytes et des péricytes cérébraux de rat (Nakagawa *et al.*, 2007), selon deux configurations (**Figure 16**). Les deux configurations, ainsi formées, ont été ensuite caractérisées avec des mesures de TEER et de perméabilité au sodium fluorescéine. La configuration, qui a présenté la plus forte étanchéité, est celle où les péricytes sont ensemencés sous la membrane microporeuse (côté basal) et les cellules gliales au fond du puits. Cette configuration a, ensuite, fait l'objet d'une caractérisation en termes d'expressions protéiques (Nakagawa *et al.*, 2009). Cette étude a démontré que ce modèle de tri-culture exprimait à la fois des marqueurs de péricytes et d'astrocytes mais également des protéines de jonctions serrées et des transporteurs.



**Figure 16 : Schémas représentant les deux configurations du modèle tri-culture développé par Nakagawa et al. (Nakagawa *et al.*, 2007).**

Par ailleurs, Al Ahmad et al. ont également développé un modèle de tri-culture réunissant ces trois types cellulaires. Néanmoins la configuration diffère de celles décrites précédemment (Al Ahmad *et al.*, 2009). En effet, les astrocytes et les péricytes sont cultivés ensemble sur la membrane basale de l'insert (**Figure 17**). Dans ce modèle, ils ont montré que les propriétés restrictives de la BHE étaient renforcées, illustrées par une augmentation de la TEER et une diminution de la perméabilité paracellulaire.

Par la suite, Al Ahmad et al. ont repris ces trois types cellulaires afin de constituer un nouveau système, composé d'une matrice (et non de part et d'autre d'un insert) dans laquelle les cellules pouvaient former des structures tridimensionnelles (Al Ahmad *et al.*, 2011). Ce système leur a permis ainsi d'étudier les interactions entre les cellules en condition physiologique, mais également en condition hypoxique.

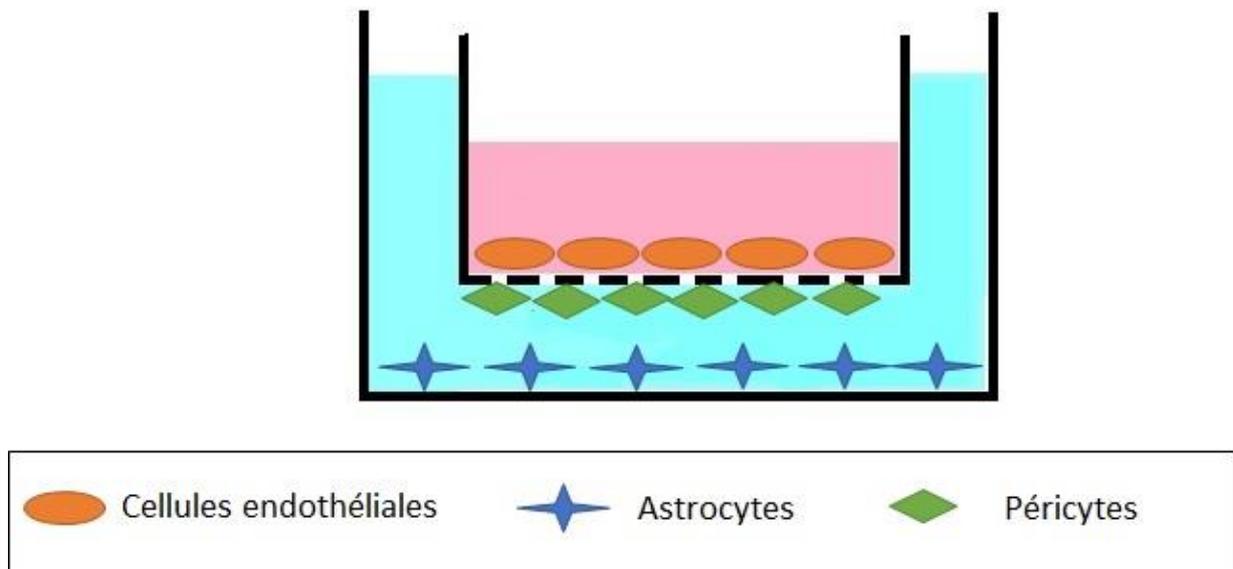


**Figure 17 : Schéma du modèle développé par Al Ahmad et al. (Al Ahmad *et al.*, 2011).**

Le modèle développé par Wilhelm et al. confirme le rôle des péricytes dans le renforcement des propriétés de la BHE (Wilhelm *et al.*, 2011). En effet, dans leur modèle tri-culture de rat, les péricytes sont cultivés sous la membrane de l'insert et les astrocytes au fond du puits. Ce modèle a obtenu une TEER élevée, une faible perméabilité paracellulaire mais exprimait également des transporteurs.

Toutefois, l'équipe d'Hatherell a développé un modèle de tri-culture humaine, qui a obtenu des résultats différents de ceux décrits précédemment (Hatherell *et al.*, 2011). En effet, l'ajout de péricytes au modèle de co-culture cellules endothéliales/astrocytes, n'a pas induit d'augmentation de TEER supplémentaire, mais au contraire une diminution de ce paramètre a été observée. Ce qui va à l'encontre des résultats obtenus, notamment par Nakagawa et al., puisque le modèle d'Hatherell et al. suggère plutôt un effet négatif des péricytes sur la résistance des jonctions serrées.

Enfin, plus récemment, l'équipe de Thomsen a développé un modèle de tri-culture porcine, dont la configuration est schématisée sur la **Figure 18**. Leur modèle a ainsi obtenu une très forte TEER (supérieure à  $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ), une faible perméabilité et exprimait des protéines de jonctions serrées ainsi que des transporteurs.

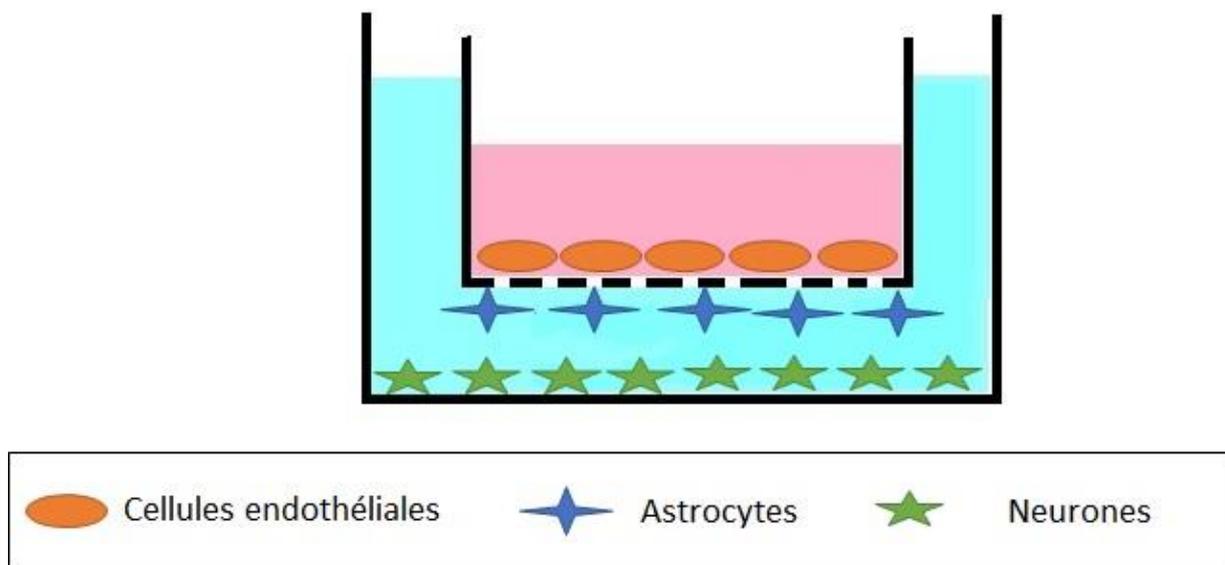


**Figure 18** : Schéma représentant le modèle tri-culture développé par Thomsen et al. (Thomsen *et al.*, 2015).

La connaissance des péricytes cérébraux, ainsi que leurs effets sur la BHE, reste à approfondir puisque les résultats obtenus sont contradictoires d'un modèle à l'autre, et d'une espèce à l'autre. D'autres études se sont, alors, intéressées à l'influence d'autres types cellulaires et particulièrement celle des neurones.

### **3.1.3.2. Modèles tri-cultures cellules endothéliales/astrocytes/neurones**

Il existe peu de modèles tri-culture utilisant les neurones, puisque ces derniers appartiennent à l'unité neurovasculaire, mais leur rôle au sein de la BHE est encore controversé. Néanmoins Schiera et al. ont décrit un nouveau modèle de tri-culture associant la lignée endothéliale RBE4, des astrocytes et des neurones de rat (Schiera *et al.*, 2005) dont la configuration est schématisée par la **Figure 19**. Ils ont caractérisé leur modèle par des mesures de perméabilité et par l'expression de la protéine occludine. Cependant la TEER du modèle n'a pas été réalisée. Ils ont ainsi obtenu une diminution de la perméabilité et une expression de la protéine occludine.



**Figure 19 : Schéma d'un modèle tri-culture associant cellules endothéliales cérébrales, astrocytes et neurones.**

Plus récemment, l'équipe de Xue a également développé un modèle tri-culture de rat utilisant des neurones, qui adopte la même configuration illustrée en **Figure 19**. Toutefois, les cellules utilisées proviennent toutes de cultures primaires. Ils ont ainsi obtenu une augmentation de la TEER avoisinant  $250\text{-}300 \Omega\cdot\text{cm}^2$ , une diminution de la perméabilité à la sodium fluorescéine, une augmentation de l'activité de la gamma-glutamyl transpeptidase et une expression des protéines de jonctions serrées ainsi que des transporteurs (Xue *et al.*, 2013).

Ces modèles tri-culture, utilisant les neurones, permettent d'étudier l'unité neurovasculaire dans sa globalité. Ainsi il est possible de comprendre les processus physiologiques et plus particulièrement pathologiques liés à cette unité tels que les maladies cérébrovasculaires, la maladie d'Alzheimer, l'hypertension ou l'épilepsie.

### **3.1.3.3. Avantages et limites des modèles *in vitro* statiques**

Ces modèles *in vitro* statiques, notamment les plus complexes (co- et tri-cultures), permettent d'étudier la physiologie, la physiopathologie de la BHE mais également de développer des thérapeutiques liées au dysfonctionnement du SNC (Helms *et al.*, 2016). Ces études sont possibles car ces modèles se rapprochent de l'anatomie d'une BHE *in vivo*, et qu'ils génèrent une barrière très étanche. Ceci est notamment essentiel pour les études de

perméabilités, des interactions entre les cellules, ainsi que pour le développement de médicaments (He *et al.*, 2014). Cependant, malgré la complexité de ces systèmes, ils ne tiennent pas compte des forces de cisaillement, appelées « shear stress », qui jouent un rôle essentiel dans l'induction et le maintien du phénotype de la BHE (Naik and Cucullo, 2012; Prabhakarandian *et al.*, 2013).

Afin de pallier à cette absence, des modèles dynamiques ont été développés. Ces systèmes prennent en compte ces forces de cisaillement.

### **3.2. Modèles *in vitro* dynamiques de BHE**

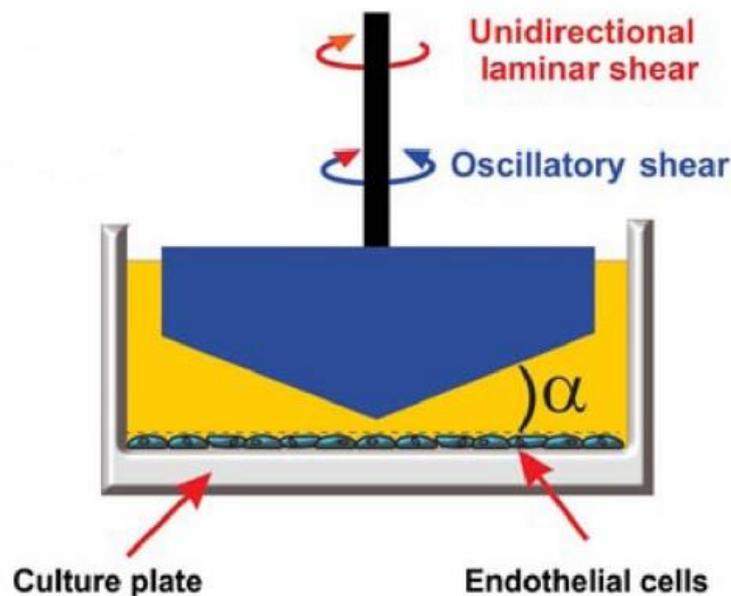
Les forces de cisaillement sont générées par le flux sanguin. Il a été démontré que ce flux affectait la fonction des cellules endothéliales de la BHE, notamment au niveau de l'expression des transporteurs et des protéines de jonctions serrées (Tarbell, 2010). En effet, le fait d'inclure un flux au système augmenterait l'expression de ZO-1 et diminuerait la perméabilité de cellules endothéliales cérébrales humaines (Siddharthan *et al.*, 2007). Ceci a conduit au développement de nouveaux systèmes *in vitro* dynamiques de BHE. Il existe deux principaux modèles : le modèle dynamique et le modèle microfluide. La principale différence de ces modèles, par rapport à ceux décrits précédemment, est l'inclusion d'un flux créant des forces de cisaillement à la surface des cellules (Wilhelm *et al.*, 2011).

#### **3.2.1. Le modèle dynamique**

Il existe deux types de modèles dynamiques : le système « cone-plate » et le modèle DIV (« Dynamic In Vitro »).

##### **3.2.1.1. Le système « cone-plate »**

L'équipe de Bussolari est la première à tenter de mimer un modèle de BHE dynamique, en développant un modèle composé d'un cône et d'un viscosimètre (Bussolari *et al.*, 1982), qui est illustrée par la **Figure 20**. Ce système leur permet d'exposer les cellules à un « shear stress » laminaire et pulsatile. En effet, la vitesse angulaire et l'angle du cône vont générer ce flux. Cependant, ce dernier n'est pas distribué de façon équivalente sur la surface de la plaque. Par conséquent, les cellules endothéliales reçoivent un « shear stress » différent selon leur localisation sur la plaque, ce qui ne reproduit pas les conditions *in vivo*. Par ailleurs, ce système ne peut pas inclure d'autres types cellulaires, tels que les astrocytes et/ou les péricytes, ce qui limite les applications de ce modèle.

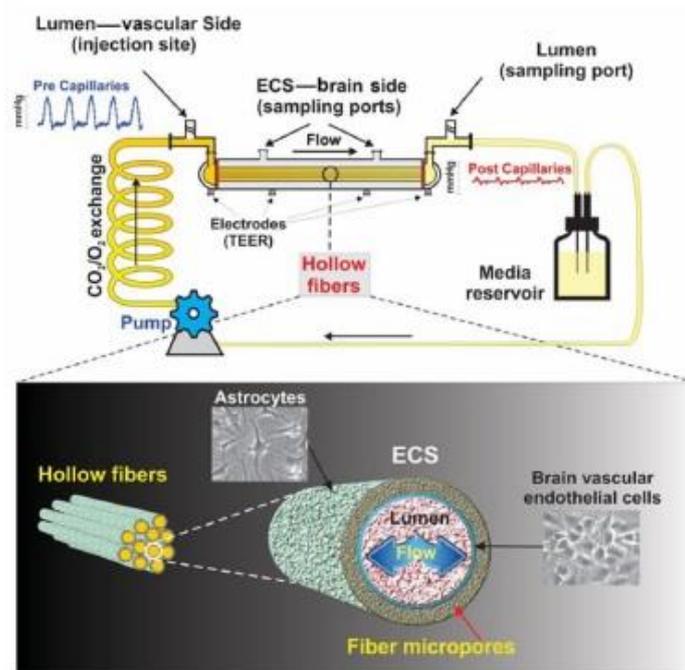


**Figure 20 : représentation schématique du système « cone-plate » extrait de Naik et al. (Naik and Cucullo, 2012).** La monocouche de cellules endothéliales est exposée à un « shear stress ». L'angle du cône ainsi que la vitesse angulaire génèrent ce « shear stress ».

Afin d'inclure à la fois un « shear stress » et d'autres types cellulaires, des fibres creuses microporeuses ont été utilisées, et ont permis de développer le modèle DIV.

### **3.2.1.2. Le système DIV**

Ce système permet de développer un modèle de co-culture ainsi que de créer un flux intraluminal, qui traverse un support artificiel mimant un capillaire. Les fibres de ce capillaire sont microporeuses et coatées avec de la pronectine pour faciliter la co-culture. Dans ce modèle, les cellules endothéliales et les astrocytes sont placés, respectivement, à l'intérieur et à l'extérieur des fibres microporeuses. Le milieu est ensuite introduit dans le système par une pompe, qui génère un flux intraluminal, dont la vitesse pulsatile est réglée afin de produire un « shear stress » et une pression interne physiologique comparable aux conditions *in vivo*. Le flux est généralement de 5 à 23 dynes/cm<sup>2</sup>, et afin de maintenir le microenvironnement stable, des tubes perméables aux gaz sont utilisés pour permettre les échanges en O<sub>2</sub> et en CO<sub>2</sub> (Naik and Cucullo, 2012). Le dispositif est illustré en **Figure 21**.



**Figure 21** : schéma du système DIV extrait de Naik et al. (Naik and Cucullo, 2012). Dans ce système les cellules sontensemencées de part et d'autre des fibres microporeuses. Le capillaire artificiel est continué avec une source de milieu et est exposé à un flux pulsatile, généré par un mécanisme de pompe.

Ce modèle DIV a été utilisé en co-cultivant des cellules endothéliales aortiques bovines et la lignée C6 de rat. Ce modèle dynamique a généré une TEER dix fois plus importante que celle observée sur insert, ainsi qu'une perméabilité respectivement dix fois et cinq fois plus faible pour le sucrose et la phénytoïne (Santaguida *et al.*, 2006).

En 2008, l'équipe de Cucullo développe un modèle dynamique avec des cellules endothéliales cérébrales humaines. Ils ont ainsi observé une TEER avoisinant  $1200 \Omega \cdot \text{cm}^2$  et une faible perméabilité pour le sucrose et la phénytoïne (Cucullo *et al.*, 2008).

Ce modèle dynamique type DIV mime davantage une BHE *in vivo*, que les modèles statiques, puisqu'il réplique ses propriétés anatomiques et physiologiques. Ce système permet d'étudier les mécanismes impliqués dans des pathologies cérébrovasculaires systémiques telles que l'ischémie cérébrale et les œdèmes cérébraux. Plus récemment, ce système a été amélioré afin de permettre la migration cellulaire, élargissant ainsi les applications aux pathologies neuroinflammatoires telle que la maladie d'Alzheimer (Naik and Cucullo, 2012).

Toutefois, malgré de nombreux avantages (faible perméabilité, TEER élevée, physiologie comparable à celle *in vivo*), ce modèle dynamique présente des limites qu'il faut prendre en compte avant de commencer une étude. Tout d'abord, le design du dispositif ne permet pas de visualiser l'intérieur des fibres et donc d'étudier les changements morphologiques et/ou phénotypiques des cellules endothéliales (He *et al.*, 2014). Par ailleurs, contrairement aux modèles statiques, ce modèle n'est pas adéquat pour l'étude de perméabilité aux médicaments en raison de la complexité du système. Enfin, la caractérisation cellulaire est possible mais limitée puisqu'elle nécessite de récupérer les cellules à l'intérieur des fibres. Cette procédure invasive peut altérer, de façon plus ou moins sévère, les caractéristiques morphologiques et physiologiques des cellules (Naik and Cucullo, 2012).

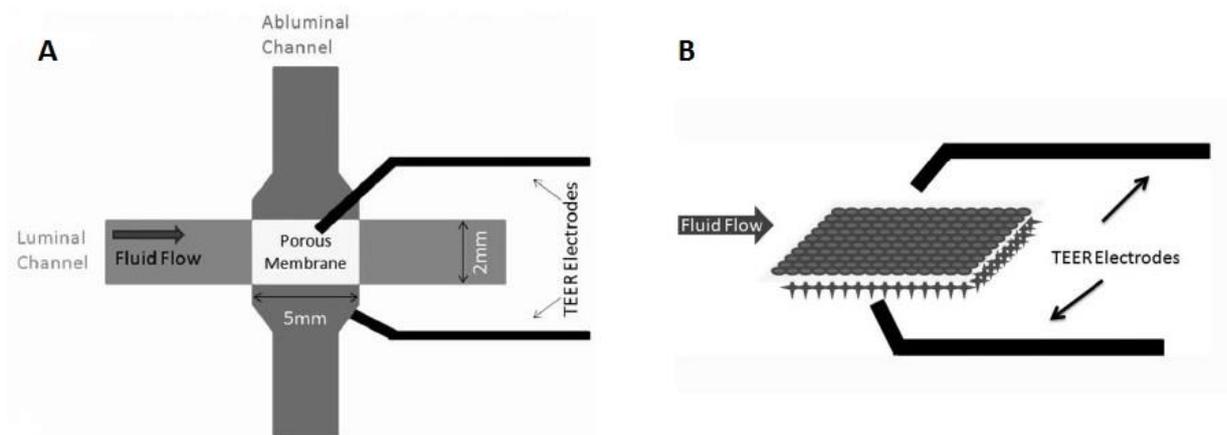
Afin de pallier à ces limites, des modèles *in vitro* de BHE reposant sur des microfluides ont été développés.

### **3.2.2. Les modèles microfluides**

Il existe deux types de modèles microfluides : le modèle  $\mu$ BBB (microfluide) et le modèle avec une microvascularisation synthétique (SyM-BBB).

#### **3.2.2.1. Le modèle $\mu$ BBB**

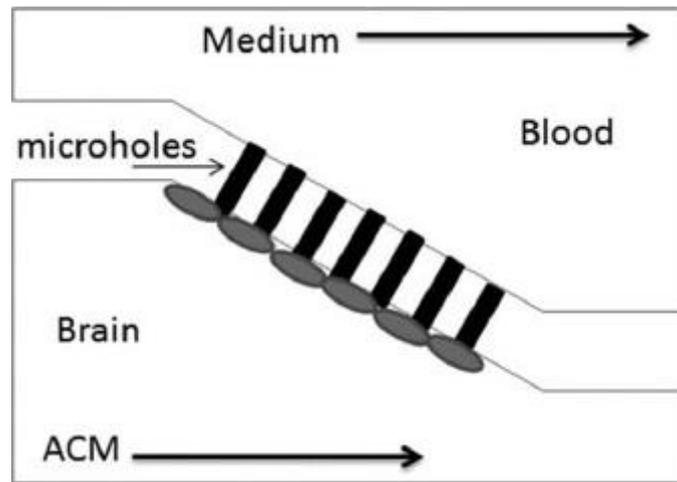
Deux types de modèle  $\mu$ BBB se distinguent dans la littérature. Le premier type est composé de deux canaux perpendiculaires, qui se croisent permettant ainsi un flux dynamique. A l'intersection de ces canaux se trouve une membrane microporeuse en polycarbonate, permettant la co-culture de cellules. De part et d'autre de cette membrane sont inclus des électrodes afin de mesurer la TEER (**Figure 22**). Enfin, une pompe et un système de tubes perméables aux gaz sont utilisés pour générer un « shear stress » et permettre les échanges en  $O_2$  et en  $CO_2$  (He *et al.*, 2014).



**Figure 22 : schéma modèle  $\mu$ BBB extrait de l'article He et al. (He *et al.*, 2014).** (A) représentation globale du système. (B) dimension 3D de la membrane microporeuse.

Dans ce modèle il a étéensemencé, respectivement, des cellules endothéliales et des astrocytes sur les surfaces apicale et basale de la membrane. Ce modèle  $\mu$ BBB améliore la TEER et peut être utilisé pour des études de perméabilité (Booth and Kim, 2012).

Le deuxième type de  $\mu$ BBB est composé de deux chambres horizontales connectées par une structure microporeuse. Les cellules endothéliales, en suspension, sont introduites dans la chambre « cérébrale » et emprisonnées dans les pores en raison du gradient de pression (**Figure 23**).

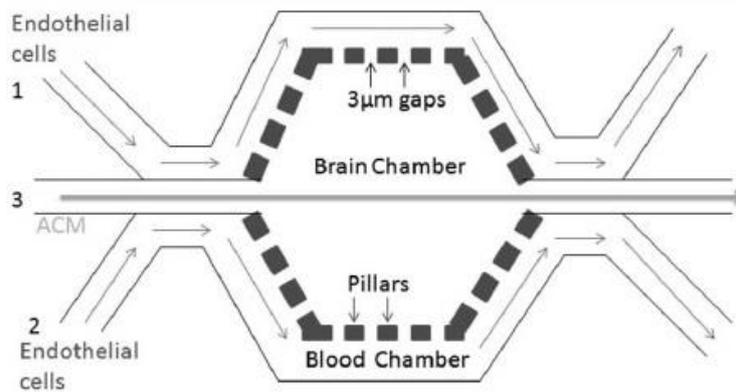


**Figure 23** : schéma du dispositif extrait de l'article He et al. (He *et al.*, 2014).

L'équipe de Yeon a utilisé ce dispositif avec des cellules endothéliales humaines cultivées dans du milieu conditionné d'astrocytes, en appliquant un « shear stress » de 0,28-8,91 dynes/cm<sup>2</sup> (Yeon *et al.*, 2012). Ils ont ainsi démontré que la perméabilité de ce système pour trois molécules était corrélée à leur taille, suggérant que ce modèle pourrait être utilisé pour les études de perméabilité de nouveaux médicaments. Cependant aucune mesure de TEER n'a été réalisée. Par ailleurs, deux limites se distinguent : (1) l'absence d'interactions entre plusieurs types cellulaires et (2) ce modèle ne reproduit pas la microvascularisation *in vivo*.

### **3.2.2.2. Le modèle SyM-BBB**

Ce modèle possède deux micro-canaux séparés par des micro-pilliers espacés de 3µm. Ces pilliers miment la membrane microporeuse du modèle µBBB. Les cellules endothéliales sont introduites dans la chambre « sanguine » par les entrées 1 et 2, tandis que le milieu conditionné ou les astrocytes sont introduits par l'entrée 3 (**Figure 24**). La vitesse du flux du milieu dans les chambres génère le « shear stress ». Le design du dispositif correspond davantage à la microcirculation *in vivo* (He *et al.*, 2014).



**Figure 24 : schéma du modèle SyM-BBB, extrait de l'article He et al. (He *et al.*, 2014).**

Prabhakarbandian et al. ont démontré que le milieu conditionné augmentait l'expression des protéines de jonctions serrées des cellules endothéliales RBE4 et diminuait la perméabilité de ce modèle. L'activité d'efflux a révélé la fonctionnalité de la pompe Pgp, suggérant que ce modèle peut être appliqué à des études de perméabilité aux médicaments (Prabhakarbandian *et al.*, 2013). Cependant, l'absence d'électrode dans le système ne permet pas d'effectuer des mesures de TEER, et le système ne peut inclure que deux types de cellules. Toutefois, le modèle SyM-BBB présente de nombreux avantages tels que l'étude de la migration cellulaire permise par les piliers d'épaisseur inférieure à 10 µm, la possibilité d'effectuer de la microscopie en raison de la transparence du matériel (He *et al.*, 2014).

Dans ce point 3, nous avons pu voir qu'il existait de nombreux modèles *in vitro* de BHE dans la littérature, qu'ils soient statiques ou dynamiques. Le choix du modèle doit être approprié et réfléchi afin de gagner du temps et limiter les coûts.

#### **4. Sélection du modèle approprié**

Quand des recherches sur la BHE sont entreprises, il est nécessaire de sélectionner le modèle *in vitro* le plus adéquat. Le choix de ce dernier doit être déterminé en fonction du but final de l'étude, afin d'avoir une interprétation précise des données.

Si l'objectif est d'étudier la perméabilité de la BHE, il est préférable de s'orienter vers des modèles de co-culture. Par ailleurs, si l'étude porte sur la migration et le trafic cellulaire,

les modèles dynamiques de type microfluide restent le meilleur choix en raison de la faible épaisseur entre les cellules endothéliales et les astrocytes, ainsi que l'inclusion du « shear stress ». Enfin, si l'objectif est d'explorer les voies de signalisation, effectuer des mesures d'affinité de liaison ou des études de cinétique de transport, les modèles mono-cultures sont plus utiles de par leur simplicité (He *et al.*, 2014).

Toutefois, les résultats obtenus doivent être validés par des modèles plus sophistiqués ou des études *in vivo*, avant de dessiner une conclusion globale. Il est également recommandé de valider les résultats avec des cellules humaines car des différences entre les espèces peuvent exister (He *et al.*, 2014).

**Malheureusement, il n'existe pas de modèle idéal, chacun des modèles décrits précédemment présente des avantages et des limites. Par conséquent, un consensus doit être fait selon l'étude entreprise. De ce point de vue, une faible perméabilité paracellulaire, des valeurs de TEER élevées autour de 100  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>, l'expression de protéines de jonctions serrées, ainsi que la fonctionnalité de transporteurs ABC et SLC, semblent être les critères les plus essentiels pour un modèle *in vitro* de BHE. Le choix du modèle dépendra donc de l'objectif poursuivi. Même si les expériences menées *in vivo* restent indispensables à l'étude du fonctionnement de la BHE dans l'organisme, elles sont confrontées à des difficultés éthiques et de mise en œuvre, voire d'interprétation des résultats du fait d'une trop grande complexité. De ce fait, les modèles *in vitro*, qui représentent une approche plus facile, trouvent de nombreuses applications, notamment au niveau de la recherche fondamentale sur les mécanismes impliqués dans des conditions pathologiques sur la BHE comme l'hypoxie. Ce point sera développé dans le chapitre suivant et au cours de ce travail de thèse.**

# Chapitre 3 : Effets des conditions hypoxiques sur la BHE

Un des principaux rôles de la barrière hémato-encéphalique est de maintenir l'homéostasie, essentielle au bon fonctionnement du cerveau. L'homéostasie désigne la capacité d'un système (ici le cerveau) à réguler son milieu intérieur, afin de le maintenir en équilibre. Les tissus, ainsi que les cellules, sont capables de s'adapter à certains stimuli qui peuvent modifier ce microenvironnement. Cependant, quand ceux-ci sont trop sévères, ils peuvent entraîner des pathologies. L'un des stimuli pouvant affecter cette homéostasie est l'hypoxie (Keller, 2013). L'hypoxie est un terme qui désigne une situation où la disponibilité en oxygène est réduite (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). Ce facteur est observé dans de nombreuses pathologies du SNC, telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, l'accident vasculaire cérébral... Cette hypoxie est souvent associée à un dysfonctionnement de la BHE. L'un des défis, dans le traitement de ces pathologies, est d'identifier et de comprendre la provenance de cette perte d'intégrité, observée au sein de la BHE. Une meilleure compréhension permettrait, *a posteriori*, de développer des thérapeutiques afin de prévenir ou de traiter le dysfonctionnement de cette barrière. Pour cela, les modèles *in vitro*, développés dans le chapitre précédent, sont souvent utilisés afin de comprendre l'impact cellulaire de cette hypoxie sur la BHE. Il existe deux types d'hypoxie qui seront détaillées dans ce chapitre.

## 1. Voie cellulaire de l'hypoxie

### 1.1. Définition de l'hypoxie

L'hypoxie est considérée comme un stimulus sévère dans de nombreux processus physiologiques, notamment lors du développement, mais elle est également responsable ou contribue à la progression de certaines maladies (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). Pour assurer la survie d'un tissu en conditions hypoxiques, les cellules doivent être capables de passer d'un métabolisme aérobie à celui anaérobie jusqu'à ce que le niveau en oxygène soit rétabli. Toutefois, la demande en oxygène et la sensibilité à la privation en oxygène, diffèrent d'un tissu ou d'un organe à l'autre, ce qui signifie que l'exposition à une hypoxie peut avoir

des conséquences différentes selon les cellules étudiées. En effet, le SNC est un système qui consomme une forte quantité d'oxygène. En condition de repos il sollicite, à lui seul, 15 à 20% du débit cardiaque total, ainsi que 20 % de l'apport en oxygène artériel (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). Une telle consommation démontre d'une forte dépendance du tissu cérébral pour l'oxygène. Par conséquent, un changement au niveau du taux d'oxygène, peut entraîner des conséquences dramatiques pour l'homéostasie du SNC et l'intégrité de la BHE.

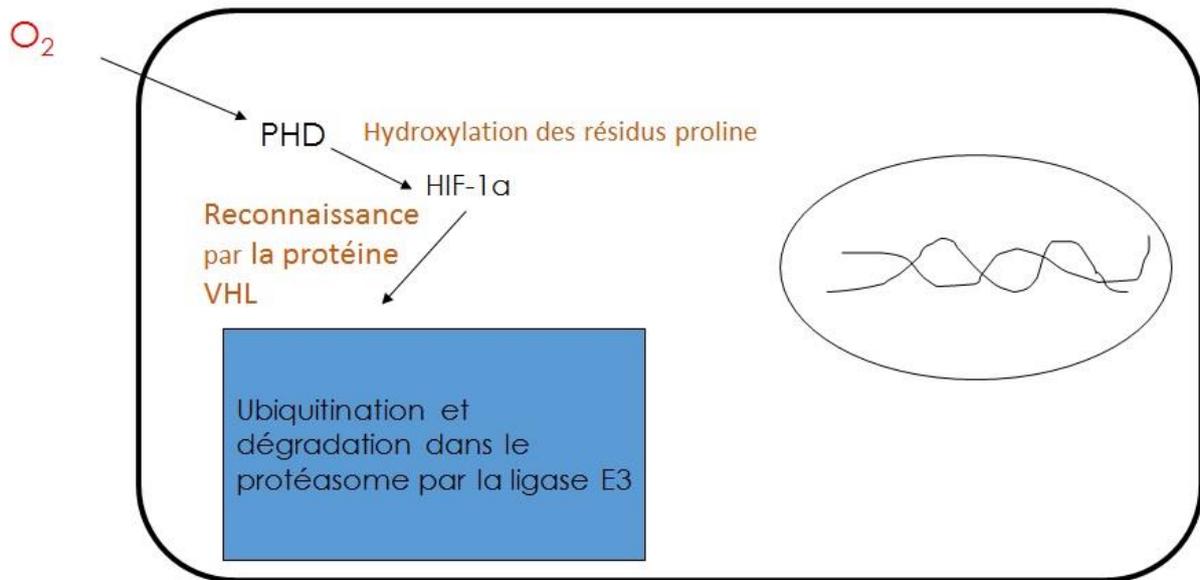
Afin de comprendre l'impact de l'hypoxie sur la BHE, il est nécessaire d'analyser les mécanismes cellulaires impliqués par de telles conditions.

## 1.2. Mécanismes cellulaires impliqués dans l'hypoxie

L'hypoxie induit diverses voies de signalisation. Néanmoins, la réponse cellulaire est principalement menée par l'activation des médiateurs HIFs (« Hypoxia Inducible Factors ») (Fandrey and Gassmann, 2009; Engelhardt *et al.*, 2014). Cette famille est composée, essentiellement, de trois membres : HIF-1, -2 et -3, dont HIF-1 est le plus caractérisé et est considéré comme le régulateur principal dans la réponse à l'hypoxie (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). En effet, HIF-1 serait impliqué dans de nombreux mécanismes endogènes induits lors d'hypoxie cérébrale, en activant des gènes spécifiques dans la restauration de la demande en oxygène.

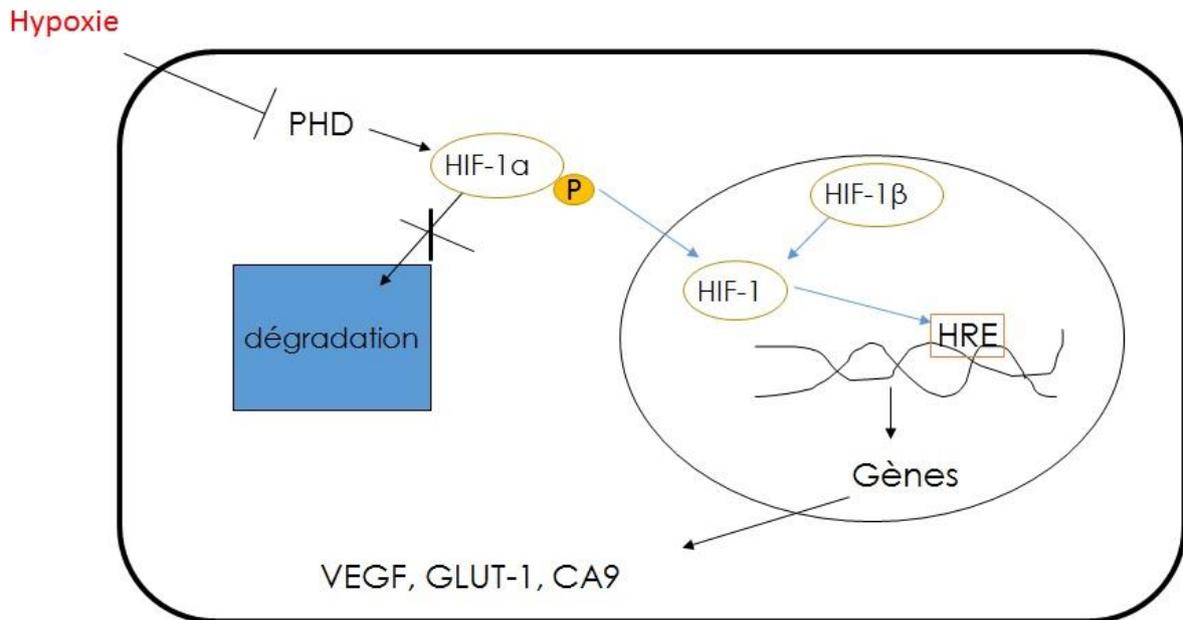
HIF-1 est un facteur de transcription hétérodimérique, constitué de deux sous-unités : la sous-unité  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) et la sous-unité  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ). HIF-1 $\alpha$  est une sous-unité sensible à l'oxygène, présente au sein du cytoplasme, tandis que la sous-unité  $\beta$  est indépendante de l'oxygène et exprimée dans le noyau, elle est aussi connue sous le nom d'ARNT (Wang and Semenza, 1993; Semenza, 2002).

En condition normoxique, c'est-à-dire en présence d'oxygène, la protéine HIF-1 $\alpha$  est continuellement dégradée par l'hydroxylation des résidus prolines par des enzymes spécifiques appelées PHDs (« Prolyl Hydroxylase Domains ») (Jaakkola *et al.*, 2001). Cette modification conduit à la reconnaissance par la protéine de Von Hippel Lindau qui va entraîner l'ubiquitination et la dégradation de HIF-1 $\alpha$  par la ligase E3 présente au sein du protéasome (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). Cette voie normoxique est illustrée sur la **Figure 25**.



**Figure 25 : Schéma illustrant la voie normoxique.** Les enzymes PHD vont hydroxyler les résidus proline présents au niveau de la protéine HIF-1 $\alpha$ . Cette modification va être reconnue par la protéine Von Hippel Lindau (VHL) qui entraîne une ubiquitination et la dégradation de la protéine dans le complexe protéasome par la ligase E3.

Lorsque la pression partielle en oxygène est réduite et entraîne une hypoxie, les enzymes PHDs sont inhibées (Engelhardt *et al.*, 2014). Par conséquent, le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  n'est plus dégradé et va s'accumuler dans le cytoplasme des cellules. Après phosphorylation de la protéine, HIF-1 $\alpha$  est transportée dans le noyau où elle se lie à sa sous-unité  $\beta$  afin de former un complexe protéique HIF-1 fonctionnel. Par la suite, ce complexe va se fixer sur le promoteur des gènes cibles au niveau de la séquence RCGTC correspondant aux éléments de réponses à l'hypoxie (HRE) (Xia and Kung, 2009). La voie cellulaire de l'hypoxie est illustrée par la **Figure 26**.



**Figure 26 : Schéma illustrant la voie hypoxique.** Dans ces conditions, les enzymes PHDs sont inhibées, HIF-1 $\alpha$  n'est plus dégradée. Elle va être phosphorylée et transportée dans le noyau où elle va se lier à sa sous-unité  $\beta$ , formant ainsi le complexe protéique HIF-1. Ce complexe va ensuite se fixer aux éléments de réponses de l'hypoxie de gènes cibles.

A ce jour, un grand nombre de gènes cibles de HIF-1 ont été identifiés (une trentaine). La plupart sont impliqués dans le passage du métabolisme en aérobie à celui de la glycolyse (GLUT-1), ainsi que dans l'angiogénèse (VEGF) ou la réparation tissulaire (Hofer *et al.*, 2002; Maxwell and Ratcliffe, 2002).

Toutefois, la demi-vie de la protéine HIF-1 $\alpha$  est autour de 4-6 minutes, ce qui rend sa mesure difficile en dehors des modèles *in vitro* (Moroz *et al.*, 2009). C'est pourquoi des méthodes d'induction d'hypoxie ont été développées *in vitro* afin d'étudier l'impact de cette dernière sur les cellules d'un tissu.

### 1.3. Méthodes *in vitro* d'induction de l'hypoxie

Ces méthodes d'induction sont récentes et permettent d'explorer les mécanismes cellulaires soulevés par des conditions hypoxiques par un ou plusieurs types cellulaires. Il existe, principalement, trois types de méthode d'induction de l'hypoxie *in vitro* : les enceintes

hermétiques, les milieux hypoxiques pré-conditionnés et les méthodes alternatives se reposant sur des agents chimiques.

### **1.3.1. Les enceintes hermétiques**

Ce type d'enceinte est le dispositif le plus utilisé, pour faire varier la pression partielle en oxygène et induire ainsi une hypoxie. En effet, ces enceintes permettent de contrôler et de réguler le taux en oxygène, ainsi que le taux en CO<sub>2</sub>, l'humidité et la température, qui sont des paramètres vitaux à la culture cellulaire. Les enceintes hypoxiques, les plus récentes, peuvent faire varier la fraction en oxygène dans le mélange gazeux de 0,1 à 23 % (In Vivo Ruskin Technologies, USA).

En 2000, Fischer et al. ont utilisé ce type de dispositif pour induire une hypoxie pendant 24 heures, sur des cellules endothéliales cérébrales porcines. Pour cela, ils ont diminué la fraction en oxygène, jusqu'à atteindre 2 % (Fischer *et al.*, 2000). Cette diminution en oxygène se fait grâce à un mélange de gaz comprenant 93 % d'azote, 2 % d'oxygène et 5 % de dioxyde de carbone.

En 2011, Al Ahmad et al. ont utilisé le même dispositif. Toutefois, ils ont fait descendre la fraction en oxygène jusqu'à 1 % pendant 48 heures ; sur un modèle de tri-culture de BHE (Al Ahmad *et al.*, 2011). En 2013, Engelhardt et al. ont utilisé le même dispositif que celui de Al Ahmad et al, mais sur des cellules endothéliales cérébrales de rat (Engelhardt *et al.*, 2014).

Par ailleurs, ces enceintes peuvent également être utilisées pour induire des hypoxies intermittentes, qui seront détaillées ultérieurement. Par exemple, l'équipe de Prabahkar a utilisé ce type d'enceinte pour obtenir des cycles courts d'hypoxie en exposant les cellules à 21 % d'oxygène pendant 3 minutes, suivi par 1 % d'oxygène pendant 15 secondes (Adhikary *et al.*, 2001). Néanmoins, pendant la période d'hypoxie, 45 secondes ont été nécessaires pour que le taux d'oxygène ambiant diminue à 1 % et 50 secondes pour remonter à 21 %.

En 2005, Gozal et al. utilisent des cycles plus longs, en exposant leurs cellules à 21 % d'oxygène pendant 25 minutes suivi de 5 % d'oxygène pendant 35 minutes (Gozal *et al.*, 2005).

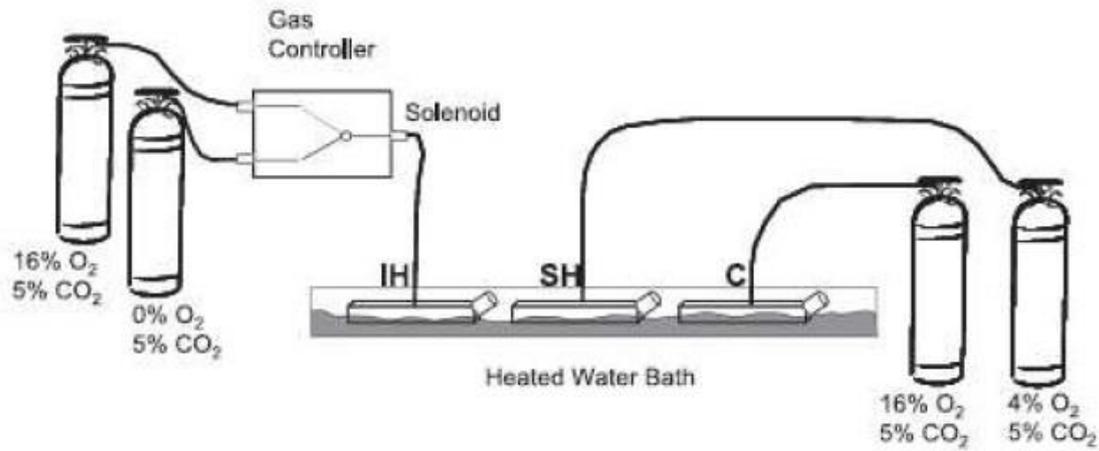
Toutefois, ces dispositifs sont coûteux et sont dépendants des contraintes liées à l'utilisation de gaz (arrivée de plusieurs gaz en salle de culture, risques de fuites, coûts des différents gaz...), mais restent la meilleure méthode pour abaisser la pression en oxygène dans le milieu des cellules. Cependant, d'autres systèmes ont été développés.

### 1.3.2. Les milieux hypoxiques pré-conditionnés

Dans ce cas, le milieu de culture est « bullé » avec un mélange gazeux, pour faire descendre le taux en oxygène.

En 2004, une équipe japonaise a induit une hypoxie, sur un modèle de co-culture de BHE, en faisant « buller » leur milieu de culture pendant 6 heures à 37 °C avec de l'azote. Ils ont ainsi mesuré au bout de 6 heures, une fraction en oxygène de 1 % (Hayashi *et al.*, 2004).

En 2010, Polotsky et al. ont cultivé des cellules en flasques T75, qu'ils ont placées dans un bain marie, permettant ainsi de maintenir la température à 37 °C. Le milieu de culture est ensuite « bullé » pendant 5 minutes avec un mélange gazeux ne comprenant pas d'oxygène suivi de 5 minutes avec un mélange contenant 14 % d'oxygène (**Figure 27**). Ils ont ainsi effectué 6 cycles/heure pendant 8 heures (Polotsky *et al.*, 2010).



**Figure 27 : Représentation schématique du modèle de Polotsky extrait de l'article de Ryan et al. (Ryan *et al.*, 2005).**

Toutefois, ce type de modèle soulève la question du maintien de la stérilité, avec la possibilité de contamination des cellules. De plus, le « bullage » du milieu peut générer du « shear stress » capable d'interférer avec les effets propres de l'hypoxie.

Enfin, des méthodes alternatives d'induction d'hypoxie ont été développées en utilisant des agents chimiques.

### **1.3.3. Les méthodes d'induction d'hypoxie utilisant des agents chimiques**

Ces méthodes peuvent être utiles pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires, induits par un stress hypoxique, en raison de la courte demi-vie de la protéine HIF-1 $\alpha$ . Ces méthodes d'induction reposent, essentiellement, sur l'utilisation d'inhibiteurs des enzymes PHDs, décrites précédemment, puisque ces inhibiteurs permettent de stabiliser la protéine HIF-1 $\alpha$ . Ainsi, ces inhibiteurs créent un environnement cellulaire hypoxique et représentent une méthode adéquate dans la compréhension des premières étapes des mécanismes impliqués par l'hypoxie.

L'inhibiteur, le plus utilisé dans la littérature, est le chlorure de cobalt (Yang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012; Engelhardt *et al.*, 2014). En 2014, Cervellati *et al.* utilisent le chlorure de cobalt (CoCl<sub>2</sub>) pour induire une hypoxie. Néanmoins, ils ont pu constater une certaine cytotoxicité de cet agent pour leurs cellules. En effet, le chlorure de cobalt activerait la caspase-3 et conduirait à l'apoptose des cellules (Cervellati *et al.*, 2014).

L'équipe d'Engelhardt a également eu recours à ces méthodes alternatives en utilisant trois inhibiteurs : le chlorure de cobalt (CoCl<sub>2</sub>), le deferoxamine (DFO) et le diméthylloxaglycine (DMOG). Ils ont ainsi démontré que la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  était plus importante avec le DFO ainsi qu'avec le CoCl<sub>2</sub>. L'induction par le DMOG est plus modeste. Par ailleurs, ils ont montré des résultats similaires avec ces inhibiteurs que ceux obtenus avec une hypoxie physique (enceinte hermétique) (Engelhardt *et al.*, 2014).

Même si ces méthodes d'induction chimique n'abaissent pas physiquement la pression en oxygène, elles restent des moyens adéquats pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués par l'hypoxie. De plus, l'induction de l'hypoxie par ces méthodes est contrôlable, reproductible, réversible et de faibles coûts. De plus, d'autres inhibiteurs émergent tels que l'hydralazine, qui sera décrite dans mes travaux personnels.

Il n'existe pas de méthode d'induction d'hypoxie parfaite. Néanmoins, les méthodes décrites précédemment, permettent d'étudier l'impact de cette hypoxie sur les cellules, et notamment sur des modèles de BHE (système qui nous intéresse dans ce travail). Dans la littérature, deux types d'hypoxie sont décrites : l'hypoxie aiguë et l'hypoxie intermittente.

## **2. Impact de l'hypoxie sur la BHE**

Une hypoxie aiguë désigne une diminution brutale de la quantité d'oxygène apportée aux organes par la circulation sanguine.

La BHE est très sensible à des conditions hypoxiques, en raison de son rôle dans le maintien de l'homéostasie du SNC. Des altérations de la BHE peuvent être observées en réponse à l'hypoxie (Petito, 1979), et entraîner ou accentuer certaines pathologies neurologiques, telles que l'accident vasculaire cérébral, la maladie d'Alzheimer, les désordres provoqués par l'hypoxie d'altitude ou encore la maladie de Parkinson (Rosenberg, 2012; Keller, 2013).

## 2.1. Pathologies du SNC liées directement à l'hypoxie aiguë

Deux pathologies cérébrales sont directement liées à une hypoxie aiguë : l'accident vasculaire cérébral et l'œdème cérébral de haute altitude.

- **L'accident vasculaire cérébral** correspond à l'obstruction ou à la rupture d'un vaisseau sanguin, qui alimente le cerveau. Cet événement va entraîner un arrêt de la circulation sanguine. Par conséquent, le cerveau n'est plus approvisionné en oxygène et en nutriments essentiels (del Zoppo and Hallenbeck, 2000; Petty and Wettstein, 2001). Le traitement a pour but de désobstruer l'artère touchée. Toutefois, selon la gravité de l'accident vasculaire cérébral, le patient peut avoir des séquelles, plus ou moins, importantes. En effet, lors d'un AVC une augmentation de la perméabilité de la BHE est observée (Kempinski, 2001).
- **L'œdème cérébral de haute altitude** appartient à la famille des maladies de hautes montagnes. Ces pathologies touchent principalement une population touristique, qui n'est pas acclimatée aux changements d'altitude (Gallagher and Hackett, 2004). Cet œdème cérébral de haute altitude est caractérisé par une altération de la concentration, pouvant évoluer vers des instants de confusion (Verges *et al.*, 2016), des comportements psychiatriques, une ataxie (c'est-à-dire un manque de coordination) voire dans le cas plus grave un coma profond pouvant entraîner le décès de la personne (Hackett and Roach, 2004). Dans ce cas de pathologie, le traitement repose sur l'oxygénothérapie, la perfusion de solutés hyperosmotiques tel que le mannitol, ou l'injection de corticoïdes à fortes doses. Si le traitement n'est pas efficace, il est vital de descendre le patient à basse altitude avant que l'état du patient ne se dégrade ou de le placer dans un caisson

de compression « ambulatoire ». La redescente a, généralement, un effet spectaculaire puisque les troubles disparaissent rapidement sans laisser de séquelles. La formation de ces œdèmes en haute altitude reste encore mal comprise. Toutefois, une des hypothèses à leur survenue serait que l'hypoxie d'altitude altère la BHE (Hackett and Roach, 2004). Néanmoins, cette hypothèse reste encore à être vérifiée.

Ces deux pathologies ont montré que l'hypoxie aigüe pouvait entraîner de graves conséquences pour le patient. De plus, dans les deux cas, une relation entre l'hypoxie et la BHE a été soulevée. C'est pourquoi de nombreuses études se sont intéressées à étudier, *in vivo* et *in vitro*, l'impact de cette hypoxie aigüe sur la BHE.

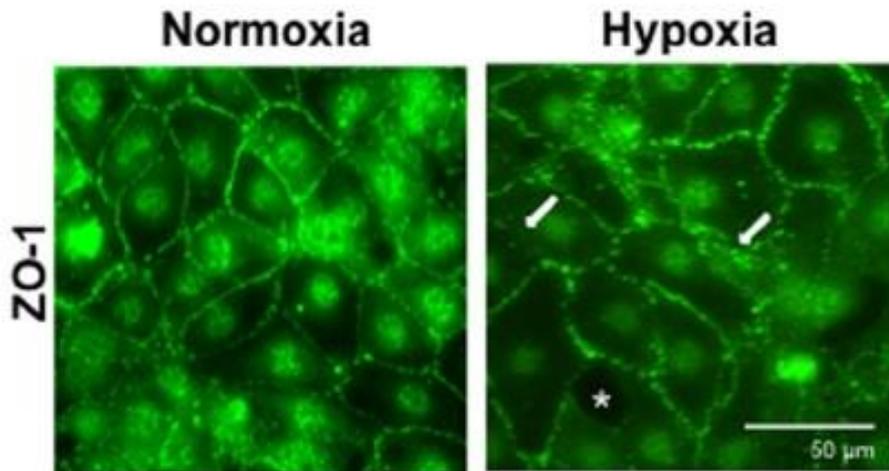
## **2.2. Effets de l'hypoxie aigüe sur la BHE**

De nombreuses études, utilisant des modèles *in vitro* de BHE, indiquent que l'hypoxie aigüe conduit à une augmentation de la perméabilité et/ou à une altération du complexe protéique des jonctions serrées de la BHE (Abbruscato and Davis, 1999; Fischer *et al.*, 1999; Mark and Davis, 2002). De plus, un stress hypoxique pourrait également augmenter la perméabilité de la BHE par l'intermédiaire de la voie transcellulaire (Plateel *et al.*, 1997; Cipolla *et al.*, 2004). En effet, Fang *et al.* ont démontré qu'une hypoxie augmenterait l'expression de la pompe d'efflux Pgp (Fang *et al.*, 2013).

Plus récemment, Al Ahmad *et al.* ont montré sur un modèle de tri-culture de BHE de rat (cellules endothéliales – astrocytes – péricytes), qu'une hypoxie aigüe conduisait à une altération de l'expression de deux protéines de jonctions serrées : claudin-5 et ZO-1. Malgré l'amélioration de la structure de la BHE, par l'ajout des astrocytes et des péricytes, des altérations de ces protéines sont toujours observées après un stress hypoxique aigüe (Al Ahmad *et al.*, 2011).

L'équipe d'Engelhardt a étudié l'impact d'une hypoxie aigüe sur un modèle de monoculture de BHE de rat. Ils ont ainsi démontré que l'activation de la voie HIF-1, induisait une

ouverture de la BHE, illustrée par une altération au sein des protéines de jonctions serrées (Engelhardt *et al.*, 2014). Dans leur modèle, ils ont observé que les protéines ZO-1 (**Figure 28**) et claudin-5 étaient délocalisées de la membrane plasmique des cellules, en condition hypoxique, pour se retrouver dans le cytoplasme. Toutefois l'occludine, autre protéine des jonctions serrées, ne semble pas être affectée par l'exposition à l'hypoxie.

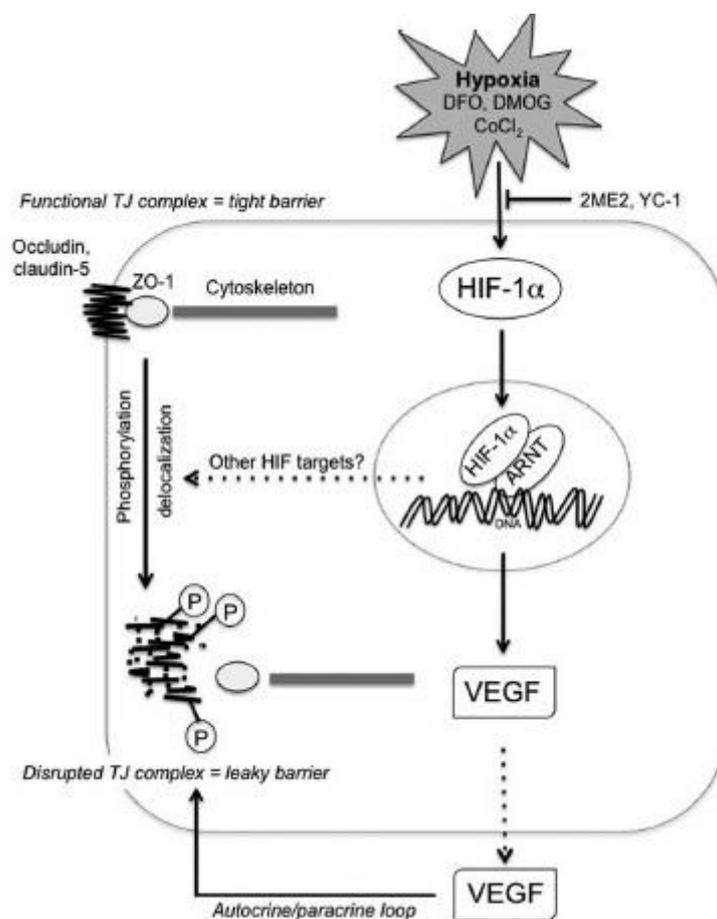


**Figure 28 : Images prises au microscope à fluorescence et extraites de l'article d'Engelhardt et al. (Engelhardt *et al.*, 2014).** Ces images correspondent à l'immunomarquage de ZO-1 de cellules endothéliales cérébrales de rat (lignée RBE4), en conditions normoxiques et hypoxiques (48 heures à 1% oxygène). Les flèches blanches indiquent l'altération de ZO-1 aux niveaux des membranes des cellules tandis que l'étoile correspond à la formation de jonctions dans le cytoplasme.

De plus, ils ont démontré, qu'en ajoutant des inhibiteurs de la voie HIF-1 (YC-1 et 2ME2), plus aucune altération au sein des jonctions serrées n'était observée. Par ailleurs, ils ont également observé une augmentation de VEGF dans les cellules, après exposition à l'hypoxie. Or VEGF est connu pour diminuer l'expression de ZO-1, et induire un réarrangement de cette protéine au sein des cellules endothéliales cérébrales (Fischer *et al.*, 2002; Yeh *et al.*, 2007).

Ainsi, ils ont proposé un mécanisme pouvant expliquer l'impact de l'hypoxie aigüe sur la BHE, qui est illustré en **Figure 29**. En effet, l'hypoxie induirait la voie de HIF-1, qui activerait le gène cible de VEGF. La sécrétion de ce VEGF participerait à l'altération des protéines de jonctions serrées, en augmentant la phosphorylation et la délocalisation de ces protéines. Toutefois, ils n'excluent pas un effet des autres gènes cibles de HIF-1 sur l'expression des protéines de jonctions serrées.

L'équipe de Zehendner propose un autre mécanisme d'action de l'hypoxie. En effet, ils ont montré dans leur modèle de BHE que l'hypoxie conduisait à la production de ROS au sein des cellules endothéliales cérébrales. La production de ces ROS entrainerait une altération au sein des jonctions serrées provoquant une ouverture de la BHE (Zehendner *et al.*, 2013).



**Figure 29 : Schéma illustrant un mécanisme d'action de l'hypoxie aiguë sur la BHE, et particulièrement sur les protéines de jonctions serrées, proposé par Engelhardt et al. (Engelhardt *et al.*, 2014).**

Cependant, certaines études rapportent que les cellules endothéliales de la BHE sont moins affectées par l'hypoxie, lorsqu'elles sont en contact avec un autre type cellulaire. En effet, Fischer et al. démontrent que l'ajout d'astrocytes au modèle de BHE, diminuerait l'expression de VEGF induit par l'hypoxie. Ceci conduirait à une diminution de la perméabilité (Fischer *et al.*, 2000). Ces résultats confirment ceux obtenus par Kondo et al. (Kondo *et al.*, 1996).

L'équipe d'Hayashi montre que les péricytes auraient également un effet protecteur contre l'hypoxie au niveau de la BHE. En effet, ils observent une diminution de la perméabilité après un stress hypoxique, sur un modèle de co-culture cellules endothéliales cérébrales-péricytes (Hayashi *et al.*, 2004).

Enfin, une étude menée sur des rats a montré qu'une hypoxie similaire à celle observée en haute altitude, altérerait la BHE (Natah *et al.*, 2009). En effet, ils ont observé une augmentation de la perméabilité à la sodium fluorescéine. Cependant cette altération serait réversible ce qui pourrait expliquer que lorsque les patients redescendent à une altitude plus basse, leurs symptômes disparaissent.

Toutes ces études tendent à montrer que l'hypoxie aiguë n'est pas sans conséquence sur la BHE. En effet, elle entraînerait une altération de cette dernière, par diminution de l'expression des protéines de jonctions ainsi que par leur réarrangement au sein des cellules endothéliales. Or cette BHE maintient l'homéostasie du SNC et protège le cerveau. Par conséquent, si celle-ci est altérée cela expliquerait les pathologies décrites précédemment. Toutefois, certaines pathologies ne sont pas associées à une hypoxie aiguë, mais à une hypoxie intermittente. Dans ce cas, la question qui se pose est l'implication de ce type d'hypoxie sur la BHE.

### **3. Hypoxie intermittente et BHE**

L'hypoxie intermittente désigne une situation où l'organisme est exposé à des épisodes répétés d'hypoxie, plutôt courts, suivis de réoxygénation. Même si ce type d'hypoxie est moins décrit dans la littérature, certaines pathologies correspondent à ce type de stress. Il est donc nécessaire de comprendre les effets que peuvent engendrer cette hypoxie intermittente, afin de traiter ou de prévenir les conséquences cellulaires de ces pathologies. Nous nous intéresserons, par la suite, uniquement aux pathologies associées au SNC.

### 3.1. Pathologies neurologiques liées à l'hypoxie intermittente

Trois pathologies associées à une hypoxie intermittente, entraînant une atteinte du SNC, se distinguent dans la littérature : l'épilepsie, la rétinopathie de l'enfant prématuré et le syndrome d'apnées du sommeil (SAS).

- **L'épilepsie** englobe un groupe hétérogène de conditions qui sont caractérisées par des crises récurrentes dues à un fonctionnement anormal de certains neurones. En effet, ces derniers sont hyperexcitables et vont synchronisés, de façon anormale, leur activité. Ceci va entraîner une décharge excessive dans les réseaux neuronaux connectés. Les raisons d'une telle oscillation synchrone et pathologique, sont encore inconnues (Daneman, 2012). Néanmoins, il a été décrit que l'épileptogénèse est souvent associée à des épisodes répétés d'hypoxie-réoxygénation (Xiao-Dong *et al.*, 2008).

A ce jour, l'épilepsie est traitée par des médicaments anti-épileptiques : les AEDs. Toutefois, beaucoup de patients sont résistants à ces médicaments. Une des hypothèses est que le passage de ces AEDs, à travers la barrière hémato-encéphalique, serait altéré chez ces patients (Löscher and Potschka, 2002). En effet, le dysfonctionnement de cette barrière est critique dans le développement de traitement de cette pathologie (Oby and Janigro, 2006). Une déficience en transporteurs GLUT-1 au sein de la BHE, conduit par exemple à un syndrome épileptique (De Vivo *et al.*, 1991, 2002).

Cependant, il est difficile à dire si ce dysfonctionnement est une cause, ou une conséquence, des épisodes épileptiques (Daneman, 2012).

- **La rétinopathie du prématuré** est une pathologie qui touche la rétine du nouveau-né prématuré. Selon la sévérité de cette rétinopathie, le développement neurologique de l'enfant peut être altéré (Msall *et al.*, 2000). En effet, la rétine est appelée « la fenêtre du cerveau » en raison de sa forte connexion avec le tissu cérébral (Msall, 2006). Une des causes de rétinopathie chez l'enfant prématuré est la fluctuation du niveau d'oxygène, créant des hypoxies intermittentes (Penn *et al.*, 1995; Cunningham *et al.*, 2000; Di Fiore *et al.*, 2012). Lors de ces rétinopathies, l'unité neurovasculaire (cellules endothéliales – astrocytes – péricytes – neurones) est altérée (Chen and Smith, 2007),

et pourrait être une des causes des troubles neurologiques observés lors du développement ultérieur de l'enfant.

- **Le syndrome d'apnée du sommeil** est un trouble respiratoire, provoqué classiquement par l'obstruction répétée des voies aériennes supérieures lors du sommeil. Cette obstruction est provoquée par un affaissement du pharynx lié à un relâchement musculaire, entraînant ainsi des épisodes répétés d'hypoxie (apnées) et de réoxygénation (Saunamäki *et al.*, 2009). Ce syndrome est associé à de nombreuses pathologies, notamment cardiaque (Sin *et al.*, 1999) et cérébrale (Yaggi *et al.*, 2005). A ce jour le traitement, le plus efficace pour les patients ayant un syndrome sévère, est le port d'un appareil qui délivre de l'air en pression positive continue durant la nuit. Toutefois, ce dispositif est parfois mal toléré par le patient, malgré son efficacité, et est donc abandonné par ce dernier. Il est donc nécessaire de développer des thérapeutiques qui seront tous aussi efficaces mais mieux acceptées.

Si les conséquences cardiaques entraînées par le SAS sont bien connues et décrites dans la littérature, les complications cérébrales restent encore à déterminer. Il a été observé que des troubles cognitifs apparaissent chez les patients atteints d'apnées du sommeil. Ceux-ci seraient provoqués par l'hypoxie intermittente chronique, qui entraînerait une perte neuronale au niveau de l'hippocampe (Goldbart *et al.*, 2003; Zhu *et al.*, 2007). Une des hypothèses serait que la BHE est altérée par l'hypoxie intermittente chronique, provoquant ainsi un changement au niveau de la plasticité synaptique, et par conséquent engendrerait des troubles cognitifs. Cette hypothèse physiopathologique a fait l'objet d'une revue de littérature (Lim and Pack, 2014).

Il est évident que l'hypoxie intermittente n'est pas sans conséquence sur l'organisme chez l'Homme, et plus particulièrement pour le cerveau. Par ailleurs, beaucoup d'études soulèvent un lien entre l'hypoxie intermittente et le fonctionnement anormal du SNC. Par conséquent des études, *in vivo* et certaines *in vitro*, se sont intéressées à comprendre l'impact cérébral de cette hypoxie intermittente.

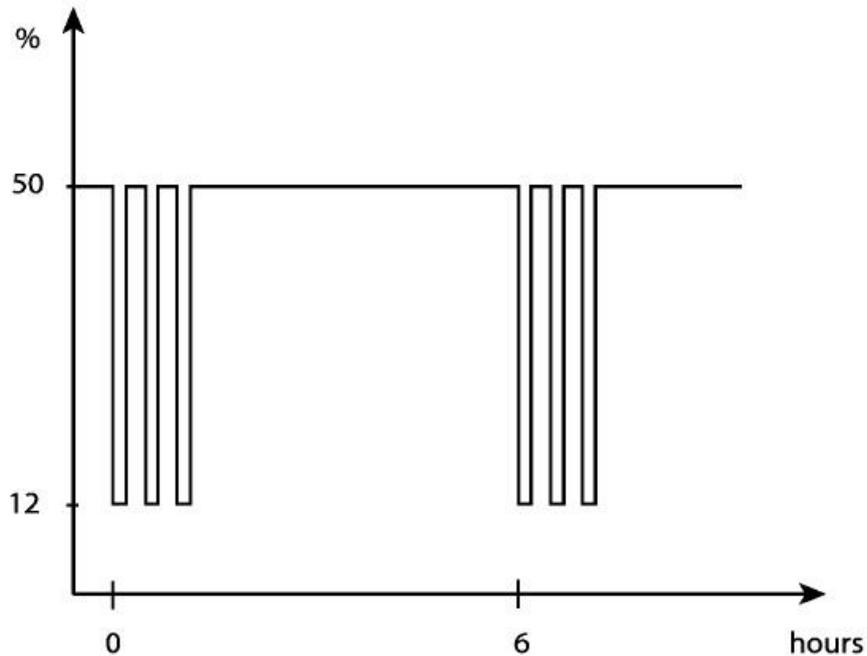
### 3.2. Effets de l'hypoxie intermittente sur la BHE

Peu d'études sont menées *in vitro*, en raison de la complexité d'induire une hypoxie intermittente.

Dans le cadre de la résistance aux médicaments anti-épileptiques, l'équipe de Xia-Dong s'est intéressée à l'effet d'une hypoxie répétée dans le temps sur des cellules endothéliales cérébrales de rat en culture (Xiao-Dong *et al.*, 2008). Ils ont ainsi induit une hypoxie intermittente, pendant 8 jours, et ont observé une augmentation de l'expression de la protéine Pgp, qui est une pompe d'efflux. Cette augmentation d'expression est associée à une diminution de l'accumulation de la rhodamine 123 (substrat spécifique de la protéine Pgp) dans les cellules endothéliales, ce qui sous-tend que le substrat est efflué dans le milieu de culture. Ils en ont ainsi conclu qu'un stress hypoxique répété dans le temps augmentait l'expression de la protéine Pgp, ce qui pourrait contribuer à la pharmaco-résistance observée dans l'épilepsie.

Cela reste la seule étude menée à ce jour *in vitro* pour déterminer l'impact de l'hypoxie intermittente sur la BHE. Toutefois, de nombreuses études *in vivo* s'intéressent à l'impact de ce type d'hypoxie sur le fonctionnement cérébral.

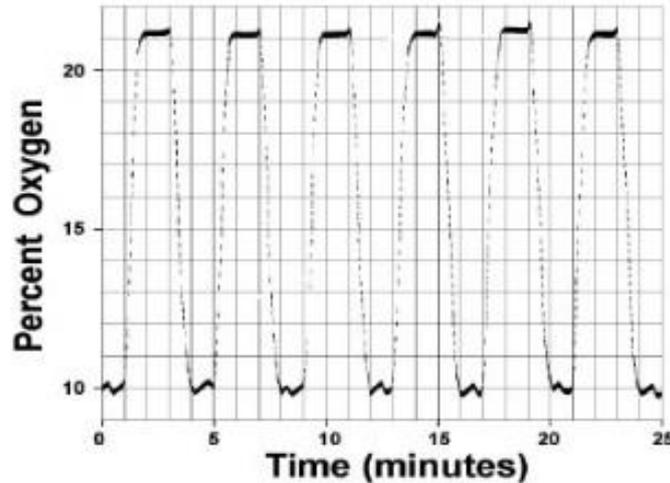
L'équipe de Morken a étudié l'effet d'une hypoxie intermittente sur le développement cérébral de rats nouveaux-nés (Morken *et al.*, 2013). Le profil de l'hypoxie intermittente exposé aux rats, est illustré en **Figure 30**. Quatorze jours après leur naissance, les rats sont exposés pendant 6 heures à 50 % d'O<sub>2</sub>, interrompues par trois épisodes consécutifs d'hypoxie (12 % O<sub>2</sub>) de 10 minutes, espacés chacun de 2 minutes. Ils ont ainsi observé un changement aux niveaux de la substance blanche, de la substance grise, ainsi qu'au niveau de la densité vasculaire. Par ailleurs, une altération au niveau de la perméabilité de la BHE semble être observée. De plus, ces changements sont plus sévères chez les animaux dont le poids est faible.



**Figure 30 : Profil expérimental d'hypoxie intermittente sur des rats nouveaux-nés, d'après Morken et al. (Morken *et al.*, 2013).**

Cependant, la plupart des études menées *in vivo* sur l'hypoxie intermittente concerne des modèles du syndrome d'apnées du sommeil.

Phillips et al. ont exposés des souris, pendant 14 jours, à une hypoxie intermittente à raison de 12 heures par jour (Phillips *et al.*, 2004). Le profil de l'hypoxie intermittente est illustré par la **Figure 31**. La fraction d'oxygène est abaissée jusqu'à atteindre 10 % et est maintenu pendant 1 minute, puis le contenu en oxygène du mélange gazeux est introduit dans les cages et réaugmente pour atteindre 21 % pendant 4 minutes. Ils ont ainsi observé une altération de la fonction endothéliale cérébrale après exposition à l'hypoxie intermittente. Néanmoins, les mécanismes induits par l'hypoxie intermittente, entraînant cette altération, restent encore inconnus.



**Figure 31 : Profil d'exposition à l'hypoxie intermittente de Philipps et al. (Phillips *et al.*, 2004).**

Dans la revue de Lim & Pack., ces derniers expliquent que les troubles cognitifs, observés chez les patients atteints d'apnées du sommeil, seraient provoqués par un changement au niveau de la BHE suite à une exposition à l'hypoxie intermittente, puisqu'une hypoxie aigüe induit une altération de la BHE (Schoch *et al.*, 2002). Cependant, les conséquences d'une hypoxie intermittente sur la BHE ne sont pas encore très décrites dans la littérature. Dans leur revue, il propose plusieurs mécanismes, induits par l'hypoxie intermittente, qui pourraient altérer cette BHE (Lim and Pack, 2014). L'un de ces mécanismes repose sur la voie HIF-1 qui activerait des gènes cibles pouvant altérer à la fois la voie paracellulaire (protéines des jonctions serrées), et la voie transcellulaire (transporteurs). Cependant, cela reste des hypothèses qui nécessitent d'être approfondies et démontrées.

Récemment, l'équipe de Kim a étudié, *in vivo*, les mécanismes impliqués dans les troubles cognitifs des patients atteints de SAS. Pour cela, ils émettent l'hypothèse que l'hypoxie intermittente conduit à un dysfonctionnement de la myélinisation axonale, de la performance cognitive, ainsi qu'à un changement du taux de l'endothélin-1 et de la perméabilité de la BHE (Kim *et al.*, 2015). L'endothélin-1 est une protéine souvent surexprimée dans le plasma des patients apnéiques (Ip *et al.*, 2004).

Cette étude est la première à étudier l'impact de l'hypoxie intermittente sur la perméabilité de la BHE, dans le cadre du SAS. Cependant un lien entre l'augmentation de l'endothélin-1 et une ouverture de la BHE n'a pas été observé, malgré le fait que cette protéine

augmente la perméabilité de la BHE dans des modèles animaux d'AVC ischémique (Leung *et al.*, 2009). Une des explications possibles, est qu'une régulation négative des récepteurs à l'endothélin-1 peut se produire au niveau des parois des vaisseaux sanguins durant des expositions d'hypoxie intermittente (Allahdadi *et al.*, 2005), réduisant ainsi la sensibilité vasculaire de cette protéine. De plus, ils ont fait une évaluation globale de l'intégrité de la BHE avec un colorant, le Bleu Evans, ce qui peut sous-estimer l'impact local de l'hypoxie intermittente sur la perméabilité de la BHE. Des modèles *in vitro* pourraient apporter des informations complémentaires très précises.

**A la vue de ce chapitre, il est évident que l'hypoxie est sans doute un facteur clé dans l'altération de la BHE, dans de nombreuses pathologies cérébrovasculaires. Toutefois, même si les conséquences d'une hypoxie aigüe sur cette barrière sont très bien décrites dans la littérature, les mécanismes cellulaires et moléculaires induits, par une hypoxie intermittente, restent encore peu connus et donc à déterminer. Les modèles cellulaires de BHE pourraient être utiles pour comprendre ces mécanismes, de par leur simplicité, et grâce aux méthodes d'induction d'hypoxie décrites dans ce chapitre.**

# Conclusion de l'Etude Bibliographique

L'endothélium des capillaires cérébraux se distingue des autres endothélia par des caractéristiques qui lui sont spécifiques, telles que la présence de jonctions serrées, l'absence de fenestration et le faible transport vésiculaire. Il exprime, également, des transporteurs d'efflux et des enzymes de dégradation, essentiels à son fonctionnement. Ces différentes propriétés font de cet endothélium le siège de la barrière hémato-encéphalique, qui est responsable du maintien de l'homéostasie ainsi que de la protection du cerveau. Ce maintien est permis par les interactions cellulaires et moléculaires présentes au sein cette BHE, et faisant intervenir les astrocytes, les péricytes et les neurones. Toutefois, ces interactions sont difficiles à étudier *in vivo*, en raison de la complexité du tissu cérébral. C'est pourquoi, les dernières décennies ont vu se développer de nombreux modèles *in vitro* de BHE, qui facilitent l'étude de son fonctionnement ainsi que les interactions cellulaires en son sein. Cependant, ces modèles doivent reproduire le plus fidèlement possible les propriétés *in vivo* de la BHE, ce qui peut conduire à des modèles assez complexes (modèles tri-culture, modèles dynamiques). De ce fait une faible perméabilité, des valeurs de TEER élevées, ainsi que l'expression de protéines de jonctions serrées et de transporteurs de type ABC, semblent être les critères les plus essentiels pour un modèle *in vitro* de BHE. Toutefois, le choix du modèle dépend essentiellement de l'objectif poursuivi.

Beaucoup de ces modèles sont utilisés pour étudier les mécanismes impliqués dans les pathologies cérébrovasculaires, telles que l'accident vasculaire cérébral, les troubles cognitifs, la maladie d'Alzheimer. L'un des facteurs communs associés à ces pathologies est l'hypoxie. L'hypoxie est un stimulus externe entraînant une diminution de la teneur en oxygène délivré par la circulation sanguine. Le cerveau, étant un grand consommateur d'oxygène, il est particulièrement sensible à ces fluctuations en taux d'oxygène. Cette hypoxie est souvent associée à une altération au niveau de la BHE. L'un des défis, dans le traitement de ces pathologies, est de comprendre et d'identifier la provenance du dysfonctionnement observé au sein de cette BHE. En effet, une meilleure compréhension permettrait de développer des stratégies thérapeutiques adéquates afin de prévenir et/ou de traiter ces pathologies. Néanmoins, si les conséquences d'une hypoxie aiguë sur la BHE sont très bien décrites dans la littérature, les mécanismes cellulaires et moléculaires provoqués par une hypoxie intermittente, restent encore à déterminer.

Dans ce travail de thèse, nous avons souhaité d'une part, mettre en place un modèle original *in vitro* de BHE, et d'autre part, mettre en place une méthode d'induction d'hypoxie intermittente reproductible afin d'étudier les conséquences de ce stimulus sur l'intégrité de la BHE.

# **Deuxième partie :**

# **Travaux Personnels**

# Chapitre 1 : Mise en place d'un modèle *in vitro* de BHE en co-culture contact

L'objectif de ce travail de thèse étant d'étudier l'impact d'un phénomène pathologique (hypoxie) sur la BHE, il a été nécessaire de mettre en place un modèle cellulaire de BHE, qui se rapproche le plus physiologiquement possible d'une BHE *in vivo*. De plus, ce modèle doit être reproductible et stable dans le temps afin de pouvoir étudier l'impact d'un ou plusieurs stress hypoxiques sur son intégrité. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser des lignées cellulaires immortalisées, qui ont l'avantage d'être stables dans le temps et faciles à cultiver. En effet, les cellules primaires sont complexes à obtenir, en raison des difficultés liées à leur isolement, leur culture et leur courte durée de vie. Dans la littérature, les modèles *in vitro* de BHE utilisent, le plus souvent, des cellules endothéliales associées à des astrocytes (Deli *et al.*, 2005; Wilhelm *et al.*, 2011). En effet, les astrocytes sont des éléments clés au sein de la BHE, et permettent d'obtenir des modèles *in vitro* plus imperméables : critère essentiel au bon fonctionnement de cette barrière. Par conséquent, nous avons décidé d'utiliser des cellules endothéliales ainsi que des astrocytes, provenant de lignées cellulaires, pour mettre en place notre modèle *in vitro* de BHE

Lors de la mise en place de ce modèle, les objectifs ont été les suivants :

- tester les différentes configurations afin de déterminer celle qui mime le plus fidèlement possible une BHE *in vivo*, et qui répond aux critères attendus pour un tel modèle (*cf chapitre 2 partie I*)
- caractériser la configuration choisie en termes de perméabilité, de protéines de jonctions serrées et de transporteurs d'efflux

## **1. Choix des lignées cellulaires**

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons développé un modèle cellulaire murin de BHE afin de pouvoir faire le lien avec des études qui seront menées prochainement chez le petit animal (souris), au laboratoire. Par conséquent nous avons fait le choix d'utiliser une lignée immortalisée de souris pour les cellules endothéliales : la lignée bEnd.3. Cette lignée est souvent utilisée dans la littérature et semble être un bon outil pour l'étude du fonctionnement de la BHE

(Wuest and Lee, 2012), notamment d'un point de vue paracellulaire (Watanabe *et al.*, 2013). Ces cellules ont été obtenues par l'ATCC (ATCC® CRL-2299™). Puis elles ont été cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), complémenté avec 10% SVF (serum de veau foetal et 5%), d'antibiotiques (amphotéricine B, penicilline et streptomycine), et dans des conditions standards de culture, soit à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

Les cellules astrocytaires, utilisées pour développer le modèle, proviennent du rat : la lignée C6. Le changement d'espèce s'explique par le fait qu'il n'existe pas de lignée cellulaire d'astrocytes chez la souris. En effet, les astrocytes murins utilisés dans la littérature, proviennent toujours de culture primaire (Wuest *et al.*, 2013). Par ailleurs, la lignée C6 est l'une des lignées immortalisées les plus utilisées dans la littérature pour la mise en place de modèles *in vitro* de BHE (Fischer *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2010; Cioni *et al.*, 2012). Cette lignée a été fournie par l'ATCC (ATCC® CCL-107™). Ces cellules sont cultivées dans du milieu F-12K, complémenté avec 2,5% de SVF, 15% de sérum de cheval et 5% d'antibiotiques, à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Cependant, il a été nécessaire d'adapter progressivement la lignée C6 au milieu DMEM afin de pouvoir, par la suite, mettre en place un modèle de co-culture de BHE où le milieu de culture doit être identique pour les deux lignées cellulaires.

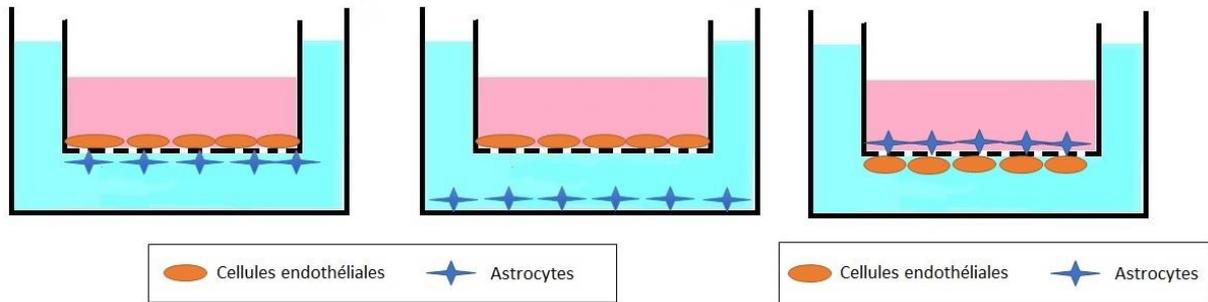
## **2. Mise en place des différentes configurations de co-culture**

Les différentes configurations de modèle *in vitro* co-culture de BHE ont été réalisées sur des inserts PET (membrane polyester) dont le diamètre des micropores est de 0,4 µm (diamètre généralement utilisé dans la littérature pour étudier le fonctionnement de la barrière) (Wilhelm *et al.*, 2011; Wuest and Lee, 2012).

Nous avons testé trois configurations de co-culture qui ont été comparées à un modèle de mono-culture (cellules endothéliales seules), illustrées par la **Figure 32** :

- un modèle de co-culture « non-contact » : les cellules bEnd.3 sontensemencées sur la partie lumineuse de l'insert, alors que les cellules C6 sontensemencées au fond du puits.
- un modèle de co-culture « contact » : les cellules bEnd.3 sontensemencées sur la partie lumineuse de l'insert, tandis que les cellules C6 sontensemencées sous l'insert (côté basal).

- un modèle de co-culture « inversé » : les cellules C6 sontensemencées sur la partie lumineuse de l'insert, et les cellules bEnd.3 sontensemencées sous la membrane, côté basal.



**Figure 32 : Schéma des différentes configurations de co-culture testées lors de la mise en place du modèle in vitro de BHE.** Les bEnd.3 (cellules endothéliales) sont soitensemencées sur la partie lumineuse de l'insert (les deux premières configurations) soitensemencées sous l'insert, du côté basal (dernière configuration). Les C6 (astrocytes) sontensemencées soit sous l'insert (première configuration), soit au fond du puits (deuxième configuration) ou sur la partie apicale de l'insert (dernière configuration).

Afin de déterminer la meilleure configuration de co-culture pour notre étude, nous avons réalisé des mesures de TEER et de perméabilité au sodium fluoresceine.

## 2.1. Le modèle co-culture « non-contact »

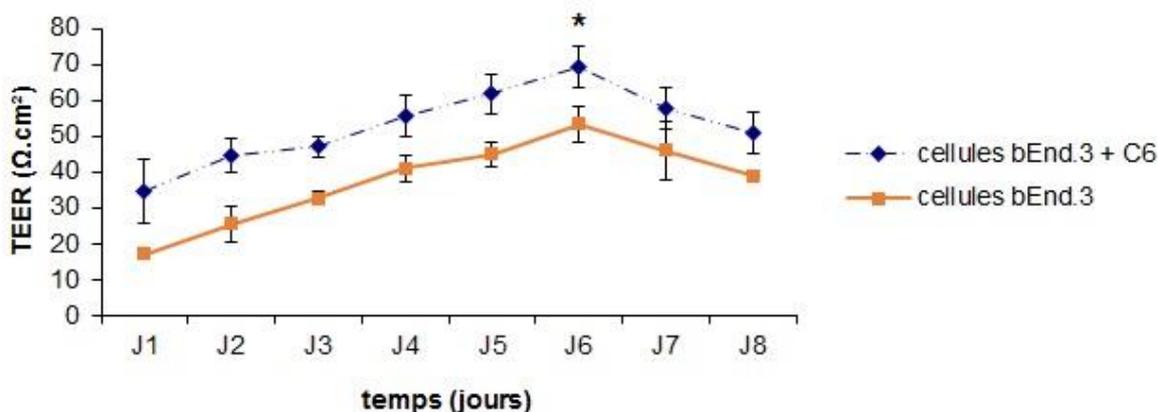
Dans cette configuration, les cellules bEnd.3 sontensemencées à raison de  $4.10^5$  cellules/insert, sur la surface lumineuse de l'insert et dans 200  $\mu$ l milieu DMEM. Dans le même temps, les cellules C6 sontensemencées au fond du puits à raison de  $4.10^4$  cellules/insert, dans 600  $\mu$ l de milieu DMEM. Les concentrations ont été déterminées d'après la littérature (Wuest and Lee, 2012). Afin d'attester du critère imperméable de ce modèle, des mesures de TEER et perméabilité ont été effectuées.

Les mesures de TEER sont effectuées tous les jours pendant 8 jours, dès le lendemain de l'ensemencement, grâce à un épithélial voltohmètre. Trois mesures par insert, à des endroits différents, sont réalisées. La TEER, est ensuite calculée grâce à la formule suivante et est exprimée en Ohm.cm<sup>2</sup>:

$$TEER \text{ du modèle} = (TEER \text{ mesurée} - TEER \text{ blanc}) \times \text{aire de la membrane} \quad \text{¶}$$

Où TEER blanc correspond à la TEER d'un insert vide et l'aire de la membrane valant 0,33 cm<sup>2</sup>.

Les résultats obtenus sont représentés sur la **Figure 33**. Le lendemain de l'ensemencement, la TEER du modèle est de  $34,65 \pm 8,94$  ohm.cm<sup>2</sup>. Ensuite, cette TEER augmente jusqu'à J6, où elle atteint son maximum ( $69,3 \pm 5,64$  ohm.cm<sup>2</sup>). Puis cette TEER diminue pour atteindre  $50,9 \pm 5,6$  ohm.cm<sup>2</sup>, à J8. Néanmoins, ces valeurs de TEER sont supérieures à celles obtenues en mono-culture. En effet, à J1 la TEER, du modèle mono-culture est de  $17,08 \pm 1,54$  ohm.cm<sup>2</sup> et à J6 (TEER maximale) elle est de  $53,37 \pm 4,91$  ohm.cm<sup>2</sup>.

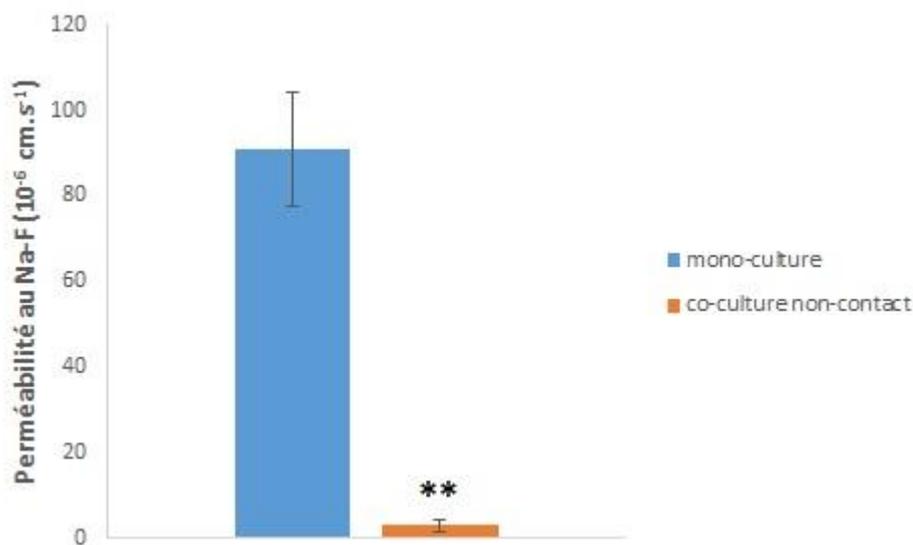


**Figure 33 : Mesures de TEER sur 8 jours.** La TEER augmente au cours du temps dans les deux configurations. Toutefois les valeurs sont plus élevées pour le modèle de co-culture non-contact (\*  $p < 0,05$  co-culture versus mono-culture). Les résultats correspondent aux moyennes  $\pm$  écart-type ( $n = 6$ ).

La fonction de barrière du modèle est évaluée en mesurant la perméabilité des cellules au sodium fluorescéine (Na-F) de poids moléculaire 376 Da. Les mesures de perméabilité sont réalisées lorsque la TEER atteint sa valeur maximale soit à J6. Pour cela, les cellules sont rincées avec du milieu Ringer-Hepes pré-chauffé (5mM Hepes, 5,2 mM KCl, 2,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 6mM NaHCO<sub>3</sub> et 2,8 mM glucose). Puis, 10 µg/ml de Na-F est ajoutée dans le compartiment luminale de l'insert (côté cellules endothéliales) et incubée 1 heure à 37°C. La

concentration en Na-F est ensuite déterminée en utilisant un fluorimètre ( $\lambda_{ex}$  485 nm et  $\lambda_{em}$  530 nm). Enfin, le coefficient de perméabilité (Pe) est calculé comme décrit précédemment par Deli et al. (Deli *et al.*, 2005).

Les résultats sont illustrés par la **Figure 34**. Le coefficient de perméabilité pour le modèle de co-culture est de  $3,01 \cdot 10^{-6} \pm 1,37 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , tandis que celui pour le modèle de mono-culture est significativement plus élevé ( $p < 0,01$ ) autour de  $9,09 \cdot 10^{-5} \pm 1,34 \cdot 10^{-5} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ .

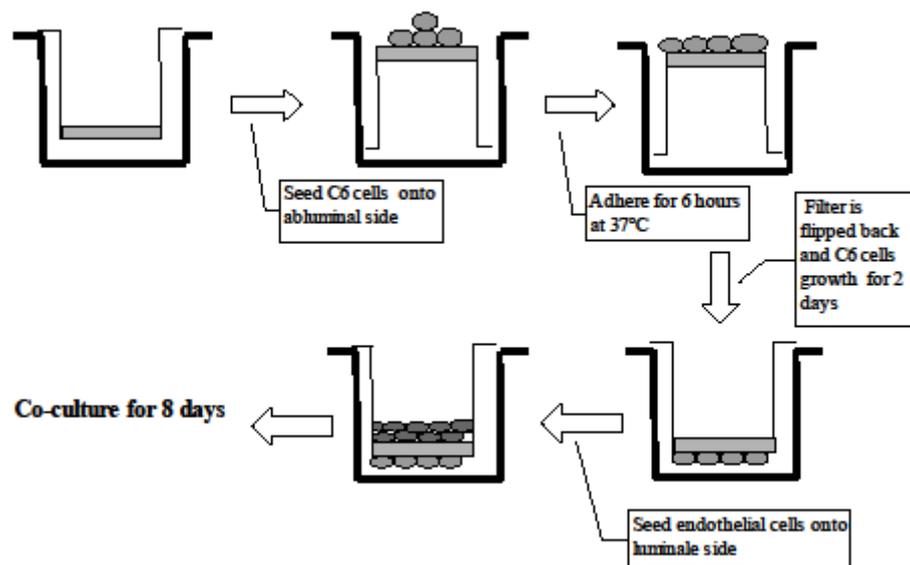


**Figure 34 : Mesures de la perméabilité au sodium fluorescéine à J6.** La perméabilité est significativement plus faible pour le modèle de co-culture (\*\*  $p < 0,01$ , co-culture versus mono-culture). Les résultats correspondent aux moyennes  $\pm$  écart-type ( $n = 6$ ).

Ces deux mesures montrent l'intérêt d'utiliser un modèle de co-culture pour étudier la fonction de BHE, puisque ce dernier présente une TEER plus élevée et une perméabilité plus faible qu'un modèle de mono-culture. Toutefois, il est intéressant d'étudier si le contact entre les cellules peut améliorer le modèle.

## 2.2. Le modèle co-culture « contact »

Dans cette configuration, les cellules C6 sont placées sous l'insert côté abluminal, il est donc nécessaire de les ensemercer en premier. Pour cela, l'insert est retourné et les cellules sont ensemençées à raison de  $4.10^4$  cellules/insert. Ensuite, les cellules sont incubées à  $37^{\circ}\text{C}$ , pendant 6h (temps nécessaire à l'adhésion des cellules sur l'insert). Puis l'insert est remis dans le puits et les cellules sont cultivées pendant 2 jours comme décrit par Li et al. (Li *et al.*, 2010). Enfin, les cellules bEnd.3 sont ensemençées sur la partie apicale de l'insert à raison de  $4.10^5$  cellules/insert et cultivées pendant 8 jours. Cette mise en place de co-culture « contact » est résumée sur la **Figure 35**.

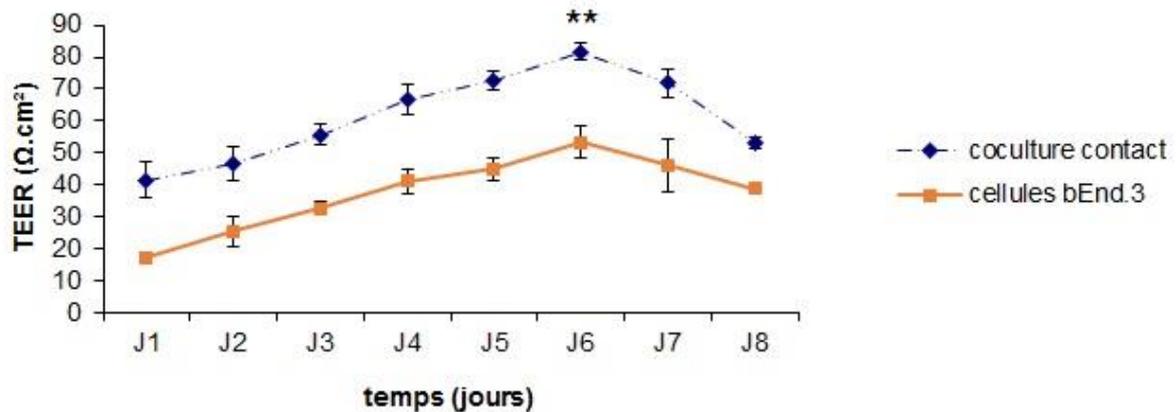


**Figure 35 : Schéma illustrant la mise en place du modèle co-culture « contact ».** Dans un premier temps les cellules C6 sont ensemençées sur insert retourné pendant 6h à  $37^{\circ}\text{C}$ , puis l'insert est remis dans le puits et les cellules sont cultivées pendant 2 jours. Enfin, les cellules endothéliales sont ensemençées dans l'insert et cultivées pendant 8 jours.

Le critère imperméable du modèle est ensuite évalué, de la même façon que pour le modèle co-culture non-contact, par des mesures de TEER et de perméabilité.

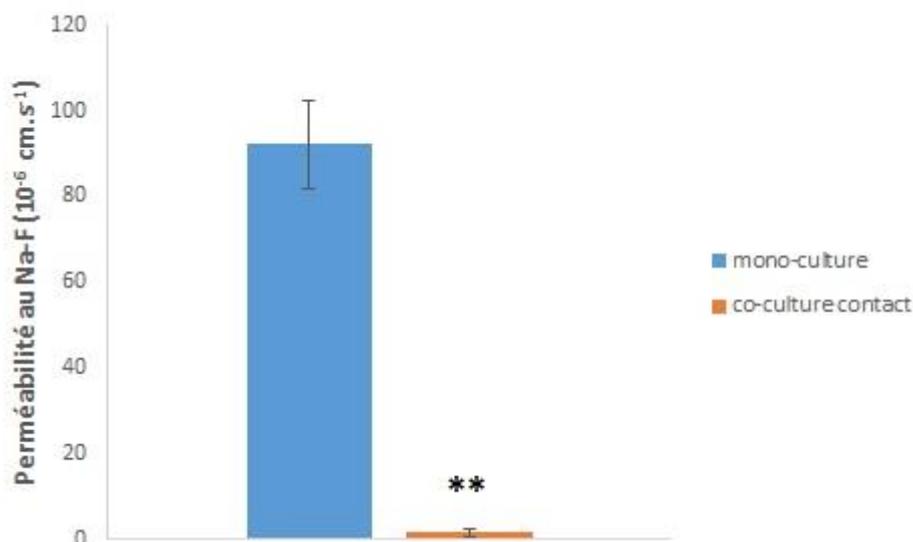
Le suivi de la TEER débute le lendemain de l'ensemencement des bEnd.3. Les résultats obtenus sont représentés sur la **Figure 36**. A J1, la TEER du modèle est de  $41,6 \pm 5,42 \text{ ohm.cm}^2$ . Ensuite, cette TEER augmente jusqu'à J6, où elle atteint son maximum ( $81,64 \pm 2,74 \text{ ohm.cm}^2$ ).

Puis cette TEER diminue pour atteindre  $53,05 \pm 1,62 \text{ ohm.cm}^2$ , à J8. Dans cette configuration, la TEER est également supérieure à celle obtenue en mono-culture. En effet à J6, la valeur de TEER est significativement plus élevée que celle obtenue en mono-culture ( $p < 0,01$ ).



**Figure 36 : Mesures de TEER sur 8 jours.** Les résultats correspondent aux moyennes  $\pm$  écart-type ( $n = 6$ ). (\*\*  $p < 0,01$  co-culture versus mono-culture).

La TEER augmente au cours du temps dans les deux configurations. Toutefois les valeurs sont plus élevées pour le modèle de co-culture « contact ». Enfin, la perméabilité du modèle co-culture « contact », pour le sodium fluorescéine est évaluée. Les résultats sont présentés sur la **Figure 37**. Le coefficient de perméabilité pour le modèle de co-culture est de  $1,51.10^{-6} \pm 1,12.10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ , tandis que celui pour le modèle de mono-culture est significativement plus élevé ( $p < 0,01$ ) de  $9,21.10^{-5} \pm 1,02.10^{-5} \text{ cm.s}^{-1}$ .



**Figure 37 : Mesures de la perméabilité au sodium fluorescéine à J6.** Les résultats correspondent aux moyennes  $\pm$  écart-type (n = 6). (\*\* p < 0,01, co-culture versus mono-culture).

La perméabilité est significativement plus faible pour le modèle de co-culture. Ces résultats montrent que le contact entre les cellules permet d'améliorer le critère imperméable du modèle de BHE, puisque la TEER est plus élevée et la perméabilité plus faible que celles obtenues avec le modèle co-culture non-contact. Enfin, nous nous sommes intéressés à une dernière configuration, où les cellules bEnd.3 sontensemencées sous l'insert et les cellules C6 sur la partie apicale de l'insert.

### 2.3. Le modèle co-culture « inversé »

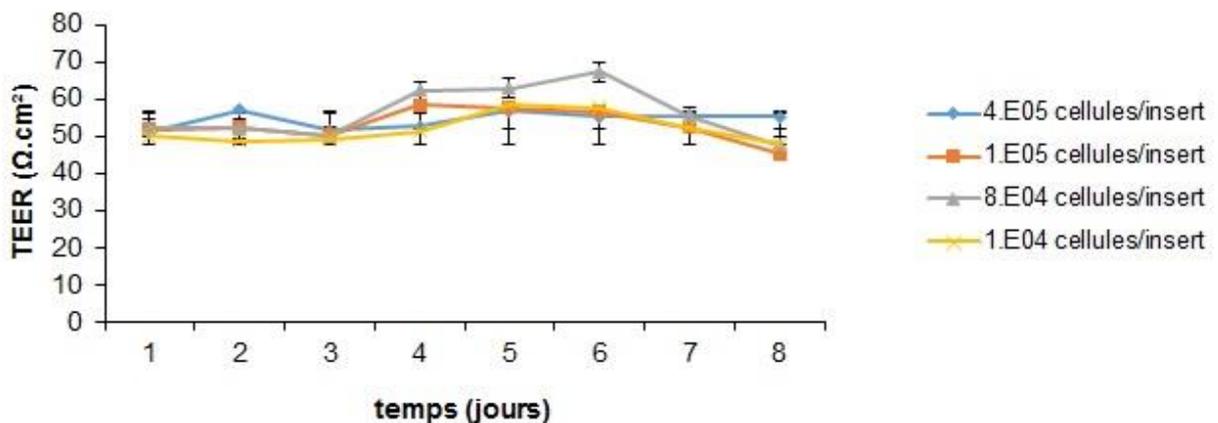
Cette configuration n'a pas été décrite dans la littérature, mais l'intérêt est d'avoir un modèle plus physiologique. En effet, à long terme l'objectif du laboratoire est de complexifier le modèle par un système de shear stress. Or, avec les autres configurations les premières cellules à subir ce stress seraient les astrocytes, ce qui n'est pas représentatif d'une situation *in vivo*. C'est pourquoi, nous avons testé une configuration inversée afin d'être plus représentatif et plus physiologique.

Plusieurs concentrations de cellules bEnd.3 ( $4.10^4$  ;  $8.10^4$  ;  $1.10^5$  et  $4.10^5$  cellules/inserts) sont testées puisque cette configuration n'a jamais été publiée auparavant. De la même façon que pour le modèle précédent, l'insert est retourné afin d'ensemencer les cellules bEnd.3. Puis les

cellules sont incubées 6h pour qu'elles adhèrent au support. L'insert est ensuite remis dans le puits et les cellules sont cultivées 48h à 37°C. Enfin les cellules C6 sontensemencées à raison de  $4.10^4$  cellules/insert sur la surface apicale de l'insert, et cultivées en co-culture pendant 8 jours.

La perméabilité du modèle est alors évaluée par des études de TEER et de perméabilité au sodium fluorescéine. Cette dernière est effectuée lorsque la TEER atteint son maximum.

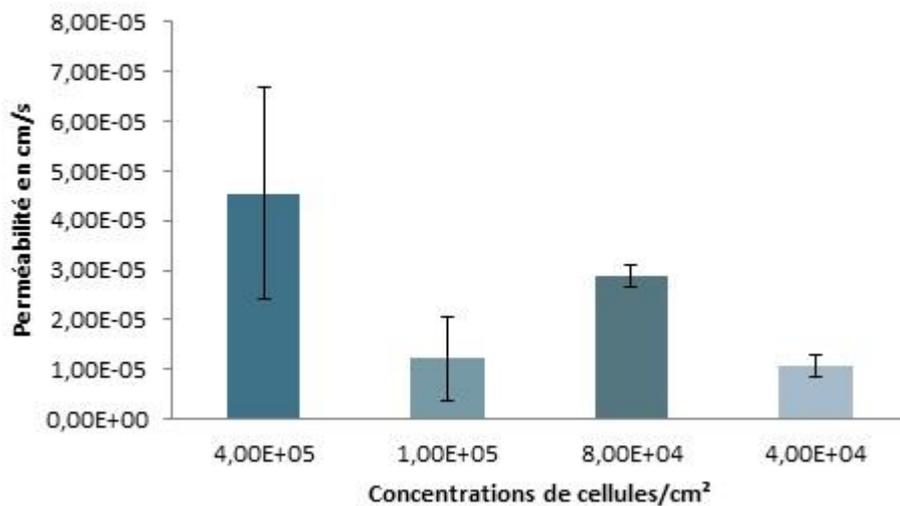
Le suivi de la TEER débute le lendemain de l'ensemencement des cellules C6 (**Figure 38**). La concentration  $8.10^4$  cellules/insert a obtenu les valeurs de TEER les plus élevées. En effet, à J1 la TEER est de  $52,14 \pm 0,72$  ohm.cm<sup>2</sup>, puis elle atteint sa valeur maximale à J6 ( $67,23 \pm 2,67$  ohm.cm<sup>2</sup>). Pour les concentrations élevées en cellules bEnd.3, la TEER n'est pas représentative car les cellules se décollent du support en raison de leur trop haute densité. La concentration  $1.10^4$  cellules/insert donne un profil de TEER semblable aux autres configurations mais les valeurs sont plus basses que la concentration  $8.10^4$  cellules/insert ( $57,6 \pm 2,02$  ohm.cm<sup>2</sup> à J6).



**Figure 38 : Mesures de TEER sur 8 jours pour différentes concentrations en cellules bEnd.3.** Les résultats correspondent aux moyennes  $\pm$  écart-type (n = 6).

La TEER augmente au cours du temps pour les concentrations les plus faibles. Toutefois les valeurs sont plus élevées pour la concentration  $8.10^4$  cellules/insert. Les concentrations les

plus élevées ne donnent pas de valeurs de TEER représentatives car les cellules se décollent du support en raison de leur forte densité. Enfin, la perméabilité de ce modèle, pour le sodium fluorescéine est évaluée pour les différentes concentrations en cellules bEnd.3. Les résultats sont présentés sur la **Figure 39**. Les coefficients de perméabilité sont élevés (de l'ordre de  $10^{-5}$   $\text{cm.s}^{-1}$ ) pour les différentes concentrations démontrant que le modèle dans cette configuration n'est pas imperméable.



**Figure 39 : Mesures de la perméabilité au sodium fluorescéine à J6 pour les différentes concentrations en cellules bEnd.3.** Les résultats correspondent aux moyennes  $\pm$  écart-type ( $n = 6$ ).

La perméabilité est élevée pour chaque concentration (de l'ordre de  $10^{-5}$   $\text{cm.s}^{-1}$ ). Par conséquent, cette configuration n'aboutit pas à un modèle de BHE adéquat notamment pour l'étude de la fonction de cette barrière, puisque le critère imperméable essentiel au modèle n'est pas respecté.

**En conclusion, la configuration de co-culture qui a donné les meilleurs résultats concernant la TEER et la perméabilité est le modèle de co-culture « contact » où les cellules bEnd.3 sontensemencées sur la surface apicale de l'insert, tandis que les cellules C6 sont placées sous l'insert (Table 3). En effet, ce modèle répond aux critères attendus d'un modèle *in vitro* de BHE, c'est-à-dire une valeur de TEER se rapprochant de 100  $\text{ohm.cm}^2$  (81,64  $\text{ohm.cm}^2$ ) et une perméabilité de l'ordre de  $10^{-6}$   $\text{cm.s}^{-1}$  ( $1,51.10^{-6}$   $\text{cm.s}^{-1}$ ).**

**Par la suite, nous avons caractérisé ce modèle en étudiant l'expression des protéines de jonctions serrées et la fonctionnalité des transporteurs d'efflux.**

configuration	TEER ( $\Omega \cdot \text{cm}^2$ )	Perméabilité ( $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$ )
mono-culture	$53,37 \pm 4,91$	$9,09 \cdot 10^{-5} \pm 1,34 \cdot 10^{-5}$
co-culture non-contact	$69,3 \pm 5,64$	$3,01 \cdot 10^{-6} \pm 1,37 \cdot 10^{-6}$
co-culture contact	$81,64 \pm 2,74$	$1,51 \cdot 10^{-6} \pm 1,12 \cdot 10^{-6}$
co-culture inversée	$67,23 \pm 2,67$	$3,0 \cdot 10^{-5} \pm 1,09 \cdot 10^{-5}$

**Tableau 3 : Récapitulatif des résultats obtenus pour les différentes configurations.**

### **3. Caractérisation du modèle co-culture « contact »**

Le modèle de co-culture « contact » répond au premier critère attendu d'un modèle *in vitro* de BHE, qui est l'étanchéité du modèle mesuré par la TEER et la perméabilité membranaire. Néanmoins, pour qu'un modèle soit adéquat à l'étude de la fonction de la BHE, ce dernier doit exprimer des protéines de jonctions serrées et posséder des transporteurs de la famille des ABC transporteurs qui soient fonctionnels.

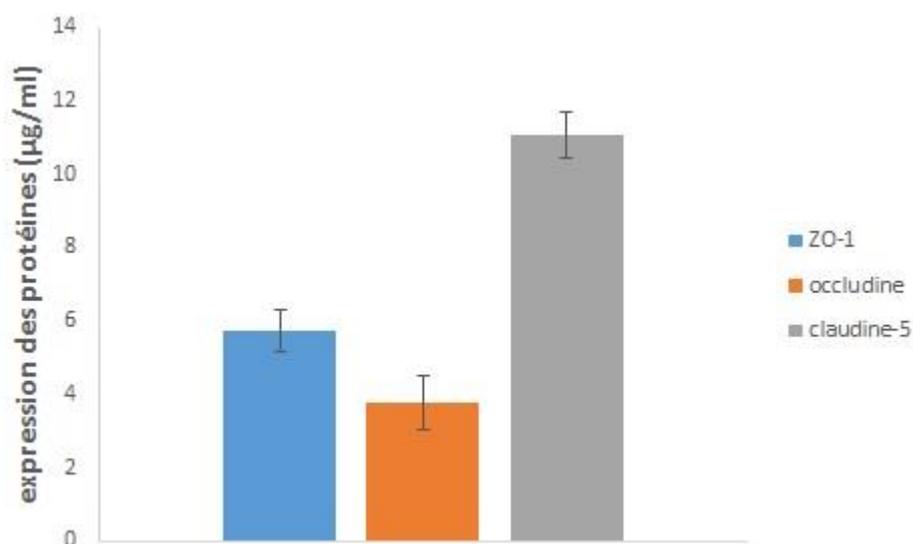
#### **3.1. Etude de l'expression des protéines de jonctions serrées du modèle de co-culture contact**

Nous avons étudié l'expression de trois protéines des jonctions serrées : ZO-1, occludine et claudine-5. En effet, ces protéines semblent jouer un rôle majeur dans le fonctionnement de la BHE (Naik and Cucullo, 2012). L'expression de ces protéines est évaluée par cell-ELISA et confirmée par microscopie confocale.

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression de ces protéines par cell-ELISA. Pour cela, les cellules de notre modèle sont fixées pendant 20 minutes à température ambiante avec 4% de PFA. Puis les cellules sont rincées et incubées avec 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dilué dans du méthanol, pendant 30 minutes afin de bloquer les sites endogènes à la peroxydase. Cette étape

est suivie d'une incubation avec 20% de sérum de chèvre afin de bloquer les sites non spécifiques. Puis, les cellules sont incubées 2 heures à température ambiante avec les anticorps primaires : anti-ZO-1 (4  $\mu\text{g/ml}$ ), anti-occludine (1  $\mu\text{g/ml}$ ) et anti-claudine-5 (2  $\mu\text{g/ml}$ ). Enfin, les anticorps secondaires couplés à la peroxydase (dilués au 1/500) sont ajoutés pendant 1h30 à température ambiante. Plusieurs lavages sont alors effectués puis une solution de phénylenediamine diluée dans du tampon citrate (0,05 M) est ajoutée pendant 10 minutes, à température ambiante et à l'abri de la lumière. La réaction colorimétrique est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 490 nm.

Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 40** et donnés en  $\mu\text{g/ml}$ . Cette concentration est déterminée grâce à une gamme étalon, préparée pour chaque protéine. Nous avons ainsi montré que notre modèle exprimait  $5,75 \pm 0,57 \mu\text{g/ml}$  pour ZO-1,  $3,78 \pm 0,72 \mu\text{g/ml}$  pour l'occludine et  $11,07 \pm 0,61 \mu\text{g/ml}$  pour claudine-5. Par conséquent, notre modèle exprime des protéines de jonctions serrées.

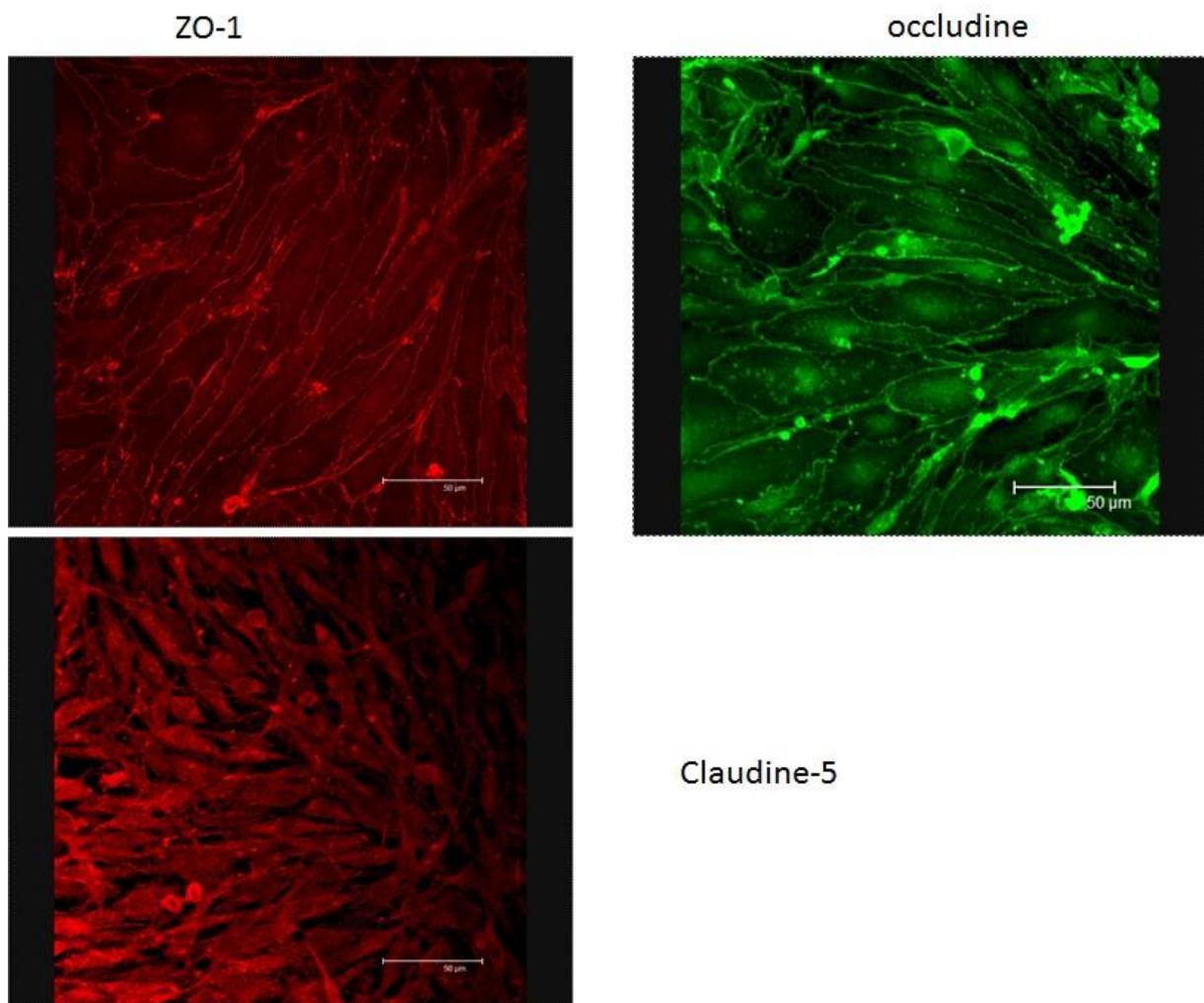


**Figure 40 : Expressions de ZO-1, occludine et claudine-5 en  $\mu\text{g/ml}$ , déterminées par cell-ELISA.**  
Les résultats correspondent aux moyennes  $\pm$  écart-type (n = 6).

Ces résultats sont confirmés par microscopie confocale. Pour cela, les inserts sont fixés 20 minutes avec 4% de PFA, à température ambiante, suivis de trois rinçages de 5 minutes avec du PBS. Les sites non spécifiques sont ensuite bloqués avec 6% de sérum de cheval dilué et

0,3 % de triton-X100 dans du PBS. Puis, les anticorps primaires sont ajoutés toute une nuit à 4°C : ZO-1 est dilué au 1/100, l'occludine est dilué au 1/75 et claudine-5 est dilué au 1/25. Trois rinçages de 5min sont effectués avec du PBS puis les anticorps secondaires alexa fluor 546 et 555 sont ajoutés pendant 1h30 à température ambiante. Enfin, après trois rinçage de 5 minutes avec du PBS, les inserts sont observés en microscopie confocale.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 41** et confirment ceux obtenus par cell-ELISA. En effet, notre modèle exprime ZO-1, occludine et claudine-5.



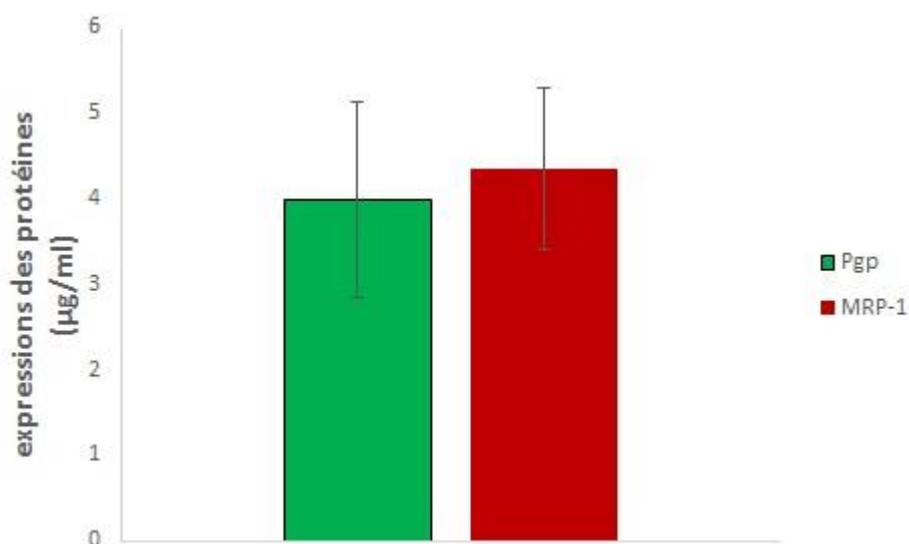
**Figure 41 : Marquages de ZO-1, occludine et claudine-5, observés en microscopie confocale (échelle 50 µm).**

Le dernier critère attendu pour un modèle *in vitro* de BHE est que ce dernier exprime des transporteurs d'efflux, et que ceux-ci soient fonctionnels.

### 3.2. Etude de l'expression et de la fonctionnalité des transporteurs d'efflux du modèle de co-culture « contact »

Nous nous sommes intéressés à deux transporteurs appartenant à la famille des ABC transporteurs : Pgp et MRP-1. En effet, ces deux protéines sont exprimées au sein de la BHE et ce sont les plus décrites dans la littérature (Dombrowski *et al.*, 2001; Schinkel and Jonker, 2003).

Dans un premier temps, l'étude s'est portée sur l'expression de ces protéines au sein de notre modèle de co-culture contact. Cette expression est étudiée par cell-ELISA. Le protocole est identique à celui décrit pour les protéines de jonctions serrées, à l'exception des anticorps primaires : anti-Pgp (2 µg/ml) et anti-MRP-1 (10 µg/ml). Les résultats obtenus sont illustrés par la **Figure 42**. Ceux-ci montrent que le modèle exprime des transporteurs d'efflux. En effet, notre modèle exprime  $3,99 \pm 1,15$  µg/ml de Pgp et  $4,34 \pm 0,95$  µg/ml de MRP-1.

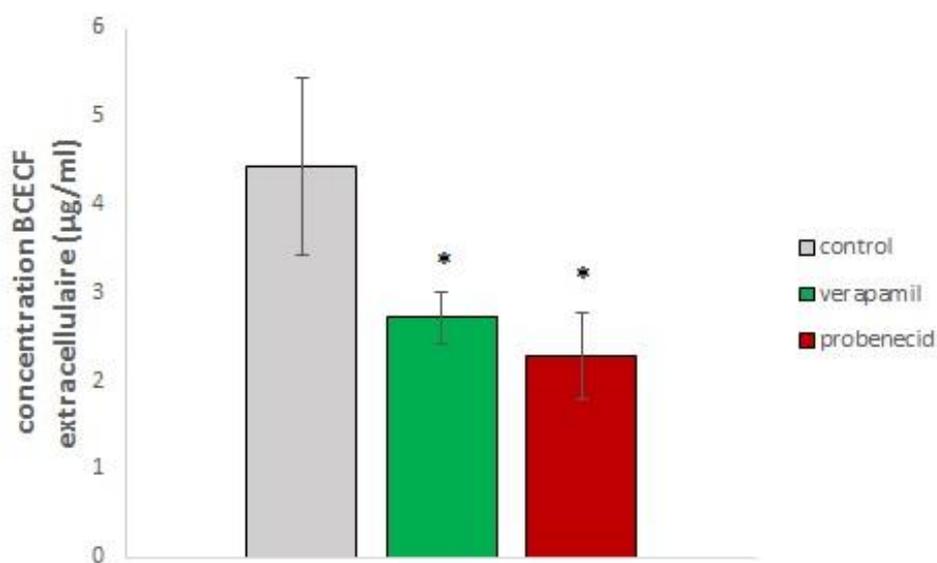


**Figure 42 : Expressions de Pgp et MRP-1 en µg/ml, déterminées par cell-ELISA.** Les résultats correspondent aux moyennes ± écart-type (n = 6).

Dans un deuxième temps, la fonctionnalité de ces deux transporteurs d'efflux est évaluée. Dans la littérature, il est décrit que ces pompes d'efflux sont exprimées préférentiellement au niveau des membranes apicales des cellules endothéliales cérébrales

(Cordon-Cardo *et al.*, 1989; Schinkel and Jonker, 2003). Par conséquent, nous avons caractérisé la fonctionnalité de ces pompes du côté apical de notre modèle. Pour cela, l'efflux du substrat BCECF-AM (substrat de Pgp et MRP-1) est évalué, en présence ou non d'inhibiteurs tels que verapamil pour Pgp et probenecid pour MRP-1. Ce composé entre dans la cellule et est clivé par des estérases intracellulaires sous la forme BCECF qui devient fluorescent. Lorsqu'il est efflué sous la forme du composé BCECF, son relargage peut être évalué par fluorescence. Les cellules du modèle sont pré-incubées à 37°C, pendant 15 minutes en présence (ou non pour les contrôles) de 40 µM de verapamil ou 1 mM de probenecid. Puis 1 mM de BCECF-AM est ajouté pendant 1 heure à 37 °C. Ces concentrations ont été précédemment déterminées au laboratoire (Perek *et al.*, 2005). Enfin, la fluorescence est mesurée avec un fluorimètre aux longueurs d'ondes suivantes :  $\lambda_{ex}$  493 nm et  $\lambda_{em}$  515 nm.

Notre modèle possède des pompes d'efflux qui sont fonctionnels (**Figure 43**). En effet, les cellules, qui n'ont pas été pré-incubées avec des inhibiteurs, effluent BCECF ( $4,43 \pm 1,01$  µg/ml). Toutefois, quand les cellules sont pré-incubées avec des inhibiteurs, une diminution significative du taux de BCECF extracellulaire (BCECF efflué) est observée. En effet  $2,29 \pm 0,49$  µg/ml de BCECF sont mesurés avec le probenecid, et  $2,72 \pm 0,29$  µg/ml de BCECF avec le verapamil.



**Figure 43 : Transport du BCECF par Pgp et MRP-1 afin d'évaluer la fonctionnalité de ces pompes ABC transporteurs.** Les résultats correspondent aux moyennes ± écart-type (n = 6).

#### **4. Avantages et limites du modèle co-culture « contact »**

Le modèle de co-culture « contact » de BHE mis en place durant ce travail de thèse, répond aux critères attendus pour un modèle *in vitro* de barrière :

- une TEER élevée proche de  $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (Naik and Cucullo, 2012)
- une perméabilité avoisinant  $10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ , qui correspond à celle observée *in vivo* (Wilhelm and Krizbai, 2014)
- la présence de protéines de jonctions serrées (Naik and Cucullo, 2012)
- la présence de transporteurs d'efflux fonctionnels (Naik and Cucullo, 2012)

De plus, ce modèle est facile, et rapide à mettre en place (8 jours). Néanmoins, il ne tient pas compte de l'interaction des péricytes, autres éléments de la BHE. Or, de nombreuses études montrent l'importance de ces cellules dans le maintien des propriétés de barrière, et notamment le maintien de l'homéostasie (Vandenhoute *et al.*, 2011). Par ailleurs, notre modèle ne tient pas compte du shear stress (forces de cisaillement) qui joue un rôle important dans l'induction et le maintien de cette barrière (Prabhakarandian *et al.*, 2013). Cependant, notre modèle permet d'étudier la physiologie de la BHE, mais également l'intégrité de cette dernière en condition pathologique. Ce dernier point est l'objectif majeur de ce travail de thèse.

## Chapitre 2 : Validation de l'hydralazine comme agent mimétique de la voie hypoxique pour étudier l'impact de ce stress sur la BHE

Ces dernières années, il a été montré que l'altération de la BHE contribuait à certaines pathologies neurologiques telles que les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, ou l'ischémie cérébrale. Il s'avère que l'hypoxie est un facteur commun à ces pathologies, et représente un facteur de stress majeur conduisant à une altération de la BHE (Sandoval and Witt, 2008; Al Ahmad *et al.*, 2011; Helms *et al.*, 2016). Toutefois, les résultats *in vivo* sont parfois difficiles à interpréter en raison de la complexité du cerveau. De ce fait, les études portant sur la BHE sont souvent réalisées grâce à des modèles *in vitro* (Fischer *et al.*, 2000; Cecchelli *et al.*, 2014).

La réponse cellulaire à l'hypoxie est menée principalement par l'activation de la voie HIF-1 (Engelhardt *et al.*, 2014). Ce facteur de transcription semble être un facteur clé dans la diminution de la perméabilité de la BHE (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). Néanmoins, la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires induits par un stress hypoxique, est complexe avec une hypoxie physique, en raison de la courte demi-vie de HIF-1 $\alpha$  ainsi que par la réversion rapide du phénomène. Dans ce cadre, de nombreux inhibiteurs de la PHD (prolyl hydroxylase domaine) ont été développés, et permettent de stabiliser HIF-1 $\alpha$ . Ceux-ci créent ainsi un environnement cellulaire « hypoxique » adéquat pour étudier l'altération de la BHE par l'hypoxie (Engelhardt *et al.*, 2014). Dans cette étude, nous avons évalué le potentiel de l'hydralazine comme agent mimétique de la voie hypoxique. L'hydralazine est un vasodilatateur utilisé en clinique, qui a montré des capacités d'induction de HIF-1 $\alpha$  en inhibant la PHD (Knowles *et al.*, 2004).

L'objectif de cette étude est double :

- valider le potentiel de l'hydralazine comme agent mimétique de la voie hypoxique en le comparant à une hypoxie physique (méthode d'induction standard de l'hypoxie)
- étudier l'impact de stress hypoxique induit par l'hydralazine sur l'intégrité de notre modèle de co-culture « contact », toujours en comparaison avec une hypoxie physique

## 1. Résultats

La première étape a été de déterminer la concentration pour laquelle l'hydralazine est non cytotoxique pour nos cellules puis d'évaluer son potentiel sur la voie métabolique de l'hypoxie. Cette cytotoxicité est évaluée selon deux méthodes : une méthode de viabilité cellulaire (méthode de MTT, test d'activité mitochondriale) et une méthode d'évaluation de la mortalité cellulaire (méthode de Lactate Deshydrogénase LDH, montrant l'intégrité membranaire). Ainsi, nous avons montré que la concentration 100  $\mu\text{M}$  était non cytotoxique pour nos cellules, ce qui confirmait les résultats obtenus par l'équipe de Knowles (*Knowles et al., 2004*).

L'étude de l'expression de HIF-1 $\alpha$  a montré une surexpression significative après une exposition de 2 heures à l'hypoxie. **Cette surexpression est similaire entre les deux méthodes d'induction** : 100  $\mu\text{M}$  d'hydralazine (dose efficace et non cytotoxique) ou 2 % d'O<sub>2</sub> (**Figure 3**). Par ailleurs, pour vérifier la spécificité d'action de l'hydralazine sur la voie hypoxique, nous avons étudié l'expression de HIF-1 $\alpha$  après une exposition avec un autre vasodilatateur : la prazosine. Les résultats n'ont montré aucun effet sur l'expression de HIF-1 $\alpha$  et par conséquent la prazosine n'agit pas sur la voie métabolique de l'hypoxie, confirmant ainsi la spécificité de l'hydralazine.

La suite de notre étude a consisté à évaluer l'impact d'un stress hypoxique induit soit par l'hydralazine, soit par une hypoxie physique, sur l'intégrité de notre modèle *in vitro* de BHE. L'intégrité de notre modèle est évaluée par des mesures de perméabilité (TEER et perméabilité membranaire au sodium fluorescéine), par expressions de protéines de jonctions serrées et de transporteurs d'efflux, ainsi que par la fonctionnalité de ces transporteurs. Nos résultats ont montré qu'un stress hypoxique, induit par l'hydralazine ou par hypoxie physique, diminuait significativement la TEER. En effet cette dernière diminue de 13,3 % avec l'hydralazine et de 17,2% avec une hypoxie physique (**Figure 4**). Toutefois, aucune différence significative n'est observée entre les deux méthodes d'induction. La perméabilité membranaire de notre modèle est également altérée après une exposition à l'hydralazine ou à une hypoxie physique. En effet, le coefficient de perméabilité au sodium fluorescéine augmente de façon significative avec les deux expositions (**Figure 5**). Ceux deux résultats, pris ensembles, montrent que l'intégrité de la BHE est altérée. Cette altération est due à une diminution de l'expression de ZO-1 (protéine de jonctions serrées). En effet une diminution significative de l'expression de

ZO-1 de 35% est observée après une exposition à l'hydralazine et de 44% après une exposition à l'hypoxie physique (**Figure 6A**). Toutefois aucune altération n'a été observée pour l'occludine (autre protéine des jonctions serrées) après exposition avec les deux méthodes d'induction d'hypoxie (**Figure 6B**).

Dans un dernier temps, nous nous sommes intéressés à l'impact d'un stress hypoxique, sur les transporteurs d'efflux, puisque ces derniers interviennent dans le rôle de protection de la BHE en rejetant les composés potentiellement cytotoxiques dans la circulation sanguine. Nos résultats montrent que Pgp et MRP-1 (deux transporteurs d'efflux) sont plus exprimés sur la membrane apicale des cellules endothéliales (**Figure 7A**). Ensuite, nous avons montré qu'à la suite d'un stress hypoxique, notre modèle augmentait l'activité de ces pompes d'efflux, et cette augmentation d'activité était associée à une augmentation de l'expression de ces protéines à la membrane des cellules (**Figures 7B-7C**). Nous n'avons montré aucune différence significative entre les deux méthodes d'induction d'hypoxie.

## **2. Discussion**

Certaines pathologies neurologiques sont associées à une altération de la BHE. En effet, la BHE est une structure essentielle à l'unité neurovasculaire, puisqu'elle protège le cerveau des variations ioniques et contrôle les échanges entre la circulation sanguine et le tissu cérébral. L'hypoxie semble être un facteur de stress majeur pouvant induire l'altération de la barrière. Toutefois, les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par l'hypoxie sont difficiles à étudier avec une hypoxie physique, en raison d'une réversion rapide du phénomène. Dans ce cadre là, nous avons présenté dans cette étude une méthode d'induction de stress hypoxique par agent chimique : l'hydralazine. Nous avons validé cette molécule comme agent mimétique de la voie hypoxique en comparant son action avec une hypoxie physique (2% O<sub>2</sub>). Puis nous avons étudié l'impact des deux méthodes d'induction de l'hypoxie sur l'intégrité de notre modèle *in vitro* de barrière (modèle décrit dans le chapitre précédent).

## 2.1. Validation de l'hydralazine comme agent mimétique de la voie hypoxique

Notre méthode d'induction d'hypoxie par l'hydralazine a été validée en comparant la capacité de cette molécule à créer un état hypoxique à une hypoxie physique, où les cellules ont été exposées à un mélange gazeux à 2% d'O<sub>2</sub>. Nous avons ainsi démontré qu'une exposition de 2 heures avec l'hydralazine à 100 µM induisait une surexpression de HIF-1α. Ces résultats confirment ceux obtenus par une autre équipe sur une lignée cellulaire différente (Knowles *et al.*, 2004). De plus nous avons montré dans cette étude que cette surexpression avec l'hydralazine était similaire à celle observée avec une exposition de 2h avec une hypoxie physique. **Ces résultats démontrent donc que l'hydralazine peut être considérée comme un agent mimétique de la voie hypoxique.** Toutefois, cette méthode d'induction avec l'hydralazine permet-elle d'étudier l'impact du stress hypoxique sur l'intégrité de la BHE ? Pour répondre à cette question, nous nous sommes intéressés à étudier l'impact des deux méthodes d'induction d'hypoxie sur l'intégrité de notre modèle *in vitro* de BHE.

## 2.2. Impact de stress hypoxique sur un modèle *in vitro* de BHE

Nos premiers résultats montrent que notre modèle *in vitro* de BHE **perd ses propriétés de barrière après un stress hypoxique** puisque des ions (diminution de la TEER) et des molécules (augmentation de la perméabilité au sodium fluorescéine) peuvent traverser notre modèle de barrière. Les protéines de jonctions serrées étant responsables de ces propriétés de barrière, une étude de leur expression a été réalisée. Nous avons ainsi observé une diminution de l'expression de la protéine ZO-1. En revanche, l'expression de la protéine occludine n'est pas altérée par un stress hypoxique. Ces résultats confirment ceux obtenus par Engelhardt *et al.* (Engelhardt *et al.*, 2014), suggérant que HIF-1α impacte la localisation de ZO-1 mais n'affecte pas celle de l'occludine. Ces résultats attestent le fait que ZO-1 joue un rôle majeur dans le développement et le maintien de la BHE (Katsuno *et al.*, 2008). Le résultat de l'expression de l'occludine est plus surprenant. Toutefois des études *in vivo*, menées chez la souris (knockdown pour l'occludine), ont révélé que cette protéine ne serait pas essentielle à la mise en place des complexes protéiques de jonctions serrées, mais participerait à la régulation de la BHE, et plus particulièrement dans la régulation du calcium à travers la BHE (Saitou *et al.*, 2000; Brown and

Davis, 2005). Ces résultats pourraient expliquer ceux que nous avons obtenus au cours de notre étude.

L'étude des transporteurs d'efflux, protéines conférant une protection au cerveau, a révélé que les cellules mettaient en place **un mécanisme de défense** afin de lutter contre cette perte de propriétés de barrière au sein de la BHE. Dans un premier temps, nous avons démontré que Pgp et MRP-1 étaient plus présents au niveau des membranes apicales des cellules endothéliales cérébrales, ce qui confirme les données de la littérature (Felix and Barrand, 2002; Nies *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2013) et attestent de la **validité de notre modèle *in vitro*** de BHE. Dans un second temps, nous avons observé que le BCECF (substrat de Pgp et MRP-1) était plus efflué par les cellules endothéliales après exposition à un stress hypoxique, que ce soit avec l'hydralazine ou par l'hypoxie physique. Ces résultats montrent donc que les cellules endothéliales augmentent l'activité de leurs transporteurs d'efflux. Ceci a également été montré pour des cellules cancéreuses, qui surexpriment HIF-1 $\alpha$  (Chen *et al.*, 2014). Enfin, nous avons démontré que cette augmentation d'activité était associée à une augmentation d'expression de ces pompes d'efflux après exposition à un stress hypoxique. Pris ensemble, ces résultats montrent que les cellules mettent en place un mécanisme de défense afin de protéger le cerveau d'une entrée possible de composés cytotoxiques. Toutefois, ceci pourrait entraîner une résistance à des thérapeutiques, comme ceci a été décrit pour les médicaments anti-épileptiques ou certaines molécules utilisées en chimiothérapie (Xiao-Dong *et al.*, 2008).

**Cette étude présente l'hydralazine comme candidat potentiel adéquat pour étudier l'impact de l'hypoxie sur la BHE. En effet, cette molécule est capable d'induire une surexpression de HIF-1 $\alpha$  comparable à celle obtenue en hypoxie physique, sans être cytotoxique pour nos cellules. Nous avons montré, avec les deux méthodes d'induction, qu'un stress hypoxique entraînait une perte d'intégrité de notre modèle *in vitro* de BHE, illustrée par une augmentation de perméabilité et une diminution de l'expression de ZO-1. Néanmoins, les cellules essaient de compenser cette perte en augmentant l'expression et l'activité de leurs transporteurs d'efflux. En conclusion, notre méthode d'induction d'hypoxie avec l'hydralazine semble être un moyen adéquat pour comprendre les premiers mécanismes cellulaires et moléculaires induits par l'hypoxie sur la BHE, puisque nos résultats avec l'hydralazine sont similaires à ceux obtenus par une hypoxie physique.**

RESEARCH ARTICLE

# Hypoxic Stress Induced by Hydralazine Leads to a Loss of Blood-Brain Barrier Integrity and an Increase in Efflux Transporter Activity

Morgane Chatard<sup>1,2</sup>, Clémentine Puech<sup>2</sup>, Frederic Roche<sup>1\* \*</sup>, Nathalie Perek<sup>2\*</sup>

**1** Université de Lyon, UJM-Saint-Etienne, SNA-EPIS, EA4607, F-42023, Saint-Etienne, France,

**2** Université de Lyon, UJM-Saint-Etienne, INSERM, SAINBIOSE U1089 Team DVH, F-42023, Saint-Etienne, France

© These authors contributed equally to this work.

\* frederic.roche@univ-st-etienne.fr



## Abstract

Understanding cellular and molecular mechanisms induced by hypoxic stress is crucial to reduce blood-brain barrier (BBB) disruption in some neurological diseases. Since the brain is a complex organ, it makes the interpretation of *in vivo* data difficult, so BBB studies are often investigated using *in vitro* models. However, the investigation of hypoxia in cellular pathways is complex with physical hypoxia because HIF-1 $\alpha$  (factor induced by hypoxia) has a short half-life. We had set up an innovative and original method of induction of hypoxic stress by hydralazine that was more reproducible, which allowed us to study its impact on an *in vitro* BBB model. Our results showed that hydralazine, a mimetic agent of the hypoxia pathway, had the same effect as physical hypoxia, with few cytotoxicity effects on our cells. Hypoxic stress led to an increase of BBB permeability which corresponded to an opening of our BBB model. Study of tight junction proteins revealed that this hypoxic stress decreased ZO-1 but not occludin expression. In contrast, cells established a defence mechanism by increasing expression and activity of their efflux transporters (Pgp and MRP-1). This induction method of hypoxic stress by hydralazine is simple, reproducible, controllable and suitable to understand the cellular and molecular mechanisms involved by hypoxia on the BBB.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Chatard M, Puech C, Roche F, Perek N (2016) Hypoxic Stress Induced by Hydralazine Leads to a Loss of Blood-Brain Barrier Integrity and an Increase in Efflux Transporter Activity. PLoS ONE 11(6): e0158010. doi:10.1371/journal.pone.0158010

**Editor:** Mária A. Deli, Hungarian Academy of Sciences, HUNGARY

**Received:** March 10, 2016

**Accepted:** June 8, 2016

**Published:** June 23, 2016

**Copyright:** © 2016 Chatard et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its supporting information files.

**Funding:** This work was supported by Jean Monnet University (from Saint Etienne, France). The funders had no role in study design, data collections and analysis, decision to publish, on preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

The blood-brain barrier (BBB) is a multicellular neurovascular unit formed of brain microvascular endothelial cells which are surrounded and supported by astrocytes, pericytes and extracellular matrix[1]. Brain microvascular endothelial cells control the transport of substances between blood and the brain via efflux pumps (transcellular transport) and tight junction (TJ) complexes (paracellular transport)[2]. This specialized phenotype allows a suitable protection for the brain[3–5]. Moreover, these barrier properties are mostly induced and maintained by the close opposition between brain microvascular endothelial cells and astrocytes[6,7]. During the last decades it was described that BBB disruption contributed to the pathophysiology of

some neurological diseases such as Alzheimer's disease, multiple sclerosis, Parkinson's disease and stroke. Since the brain is a complex organ, it makes the interpretation of *in vivo* data difficult, so BBB studies are often investigated using *in vitro* models[8,9]. Hypoxia is a common feature that characterizes many of these diseases and represents a major stress factor that leads to BBB disruption[2,10,11]. The cellular response to hypoxia is mainly driven through the activation of the hypoxia-induced factor 1 (HIF-1) pathway[12,13]. Under normoxic conditions, oxygen regulates the HIF-1 $\alpha$  subunit which is rapidly degraded by prolyl hydroxylation that targets its degradation in the proteasome. Hypoxia inhibits the prolyl hydroxylase domain leading to stabilization of the HIF-1 $\alpha$  subunit in the cytoplasm. Then it is translocated to the nucleus where it binds to hypoxia responsive elements in promoter regions of target genes involved in cellular adaptation to hypoxic stress and induces their expression[12]. HIF-1 $\alpha$  seemed to be a key factor to decrease the BBB's permeability[13]. Elucidation of the cellular and molecular mechanisms induced by hypoxic stress is complex with physical hypoxia because HIF-1 $\alpha$  has a short half-life. In this regard, a wide variety of prolyl hydroxylase domain (PHD) inhibitors, which lead to a stabilization of HIF-1 $\alpha$ , have been developed. These inhibitors allow to create hypoxic stress and represent a useful method to investigate the BBB's disruption by hypoxia. The most used in the literature is cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>)[12,14,15]. Cervelatti et al, used CoCl<sub>2</sub> to achieve stabilization of HIF-1 $\alpha$  because it inhibits PHD by blocking the catalysis of prolyl hydroxylases[16]. However, CoCl<sub>2</sub> is a rather highly cytotoxic agent for some cell types because CoCl<sub>2</sub> activates caspase-3 which leads to apoptosis[16]. Hydralazine is a vasodilator used to treat severe hypertension, congestive heart failure, myocardial infarction and preeclampsia[17]. Hydralazine also shows a capacity to induce a transient and physiological HIF-1 $\alpha$  overexpression by inhibiting PHD activity[18]. In the literature, hydralazine was only used to mimic a hypoxic state in *in vivo* and *in vitro* cancer models[19]. Hydralazine could represent a suitable and innovative way to study the cellular mechanism involved in hypoxic stress on the BBB and thereby understand the BBB disruption observed in several neurological diseases.

In the present study, we evaluated and validated the potentiality of hydralazine as a hypoxia mimetic agent in comparison to physical hypoxia (standard method of hypoxia induction). Impact of hypoxic stress induced by hydralazine and physical hypoxia on BBB integrity was determined using a coculture in-contact model composed of the immortalized cell line bEnd.3 [20] and the C6 cell line (rat malignant glioma cells which display astrocytic properties[9]). This approach allowed interaction between endothelial cells and astrocytic cells. Then impact of hypoxic stress was assessed by studying endothelial paracellular permeability with transendothelial electrical resistance (TEER) measurements and absolute membrane permeability was determined with sodium fluorescein (Na-F)[21,22]. Evaluation of transport was also investigated on expression and activity of two efflux transporters (Pgp and MRP-1) and two TJ proteins (ZO-1 and occludin). Our results showed that hydralazine represented a suitable, original and reproducible way to create a reproducible hypoxic environment since it had the same effect as physical hypoxia. This mimetic agent was further used to evaluate the impact of hypoxic stress on the integrity of our BBB model to understand the cellular mechanism involved by hypoxia.

## Materials and Methods

### Chemicals and reagents

Hydralazine, BCECF-AM, probenecid, verapamil and Na-F were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium) kit and DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) were also purchased from Sigma. All reagents for the

LDH release test were purchased from Promega Corporation (Madison, USA). Antibodies and reagents for the detection of HIF-1 $\alpha$  were products of R&D systems (Lille, France). All compounds for Ringer-Hepes buffer were purchased from Sigma.

Occludin and ZO-1 antibodies were purchased from Life Technologies (Saint Aubin, France), Pgp and MRP-1 antibodies were purchased from GeneTex (San Antonio, Texas, U.S.A) and Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, U.S.A), respectively.

bEnd.3 cells and C6 cells were obtained from the ATCC (Manassas, VA, USA).

Cell culture inserts for 24-well (0.4  $\mu$ m pore diameter size, transparent PET membrane) were purchased from Corning distributors (Sigma). EVOM voltohmmeter system was purchased from World Precision Instruments (Hertfordsire, UK).

### *In vitro* cytotoxicity assay

Cytotoxicity of hydralazine was measured by MTT method to determine the least cytotoxic concentration. Growing cells were seeded at 10,000 cells/well using a 96-well microplate that was supplemented with 100  $\mu$ l DMEM. Cells were allowed to grow for 48 h before they were exposed to drugs. Then cells were treated with various concentrations of hydralazine. Phosphate buffer saline (PBS) 1X was used to dissolve drugs. After the treated cells were incubated for 24 h, 20  $\mu$ l MTT was added and the plates were incubated at 37°C for 4 h. To dissolve formazan, 100  $\mu$ l DMSO was added and the plates were measured at 570 nm with a spectrophotometer. The least cytotoxic values were determined by plotting the drug concentrations versus the survival ratio of treated cells.

Then we also evaluated cell death with the LDH release method to confirm the least cytotoxic concentration of hydralazine given by MTT results. For that, cells were seeded in 96-well plates at 10,000 cells/well. 100  $\mu$ M of hydralazine was added during 2h (time of stress hypoxic that was used in this study) and 24 h (time chosen to determine the least cytotoxic concentration). After exposure period, a lysis solution was used in control wells to generate a maximum LDH release. Then cells were incubated with cytotox-ONE™ reagent during 10 min. A stop solution was added before recording fluorescence with an excitation wavelength of 560 nm and an emission wavelength of 590 nm. The average fluorescence values of the culture medium background (wells without cells) were subtracted from fluorescence values of experimental wells. Then percent cytotoxicity was given by the following equation:

$$\% \text{cytotoxicity} = 100 \times \frac{(\text{experimental-culture medium background})}{\text{maximum LDH release - culture medium background}}$$

### Exposure to physical hypoxia

To induce hypoxia, our *in vitro* BBB model was placed into a special chamber equipped with a thermostat housing that allowed us to incubate our cells at 37°C. Then cells were exposed to either normoxic or hypoxic conditions (2% O<sub>2</sub>), as was previously described by Fischer et al [9].

### Effect of hydralazine treatment or physical hypoxia on hypoxia metabolic pathway

Effect of hydralazine treatment or physical hypoxia was validated by the study of HIF-1 $\alpha$  expression (the key regulation of hypoxic response) to determine the effective dose where HIF-1 $\alpha$  was induced. For that, cells were seeded onto a 96-well plate at a density of 10,000 cells/well. Then cells were treated with hydralazine (50 and 100 $\mu$ M, the least cytotoxic doses defined by

cytotoxic test) or exposed to physical hypoxia during 2 h. Finally, cells were fixed to the support with 4% formaldehyde and the expression of HIF-1 $\alpha$  was determined by whole cell-ELISA. For that, anti-HIF-1 $\alpha$  antibodies were added at 4°C overnight (diluted at 1/100), then cells were incubated with secondary antibodies for 2 h at room temperature (diluted at 1/500). Fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer with 540 nm excitation and 600 nm emission wavelengths.

Furthermore, hydralazine is a vasodilator used for treating severe hypertension. So we verified the specificity of hydralazine to produce a cellular hypoxic state by comparing it to another vasodilator, prazosin, as a negative control.

### *In vitro* BBB model set up

The BBB model was composed of bEnd.3 cells (immortalized mouse brain endothelial cells) and C6 cells. All cells were used before passage number 30 (passages 12–28 for bEnd.3 cells and 10–30 for C6 cells), which corresponded to the time where these cells may begin to lose their BBB properties, as cited by the supplier and in a previous study [23].

Once the cells reached subconfluency, they were placed onto cell culture inserts for 24-well plates. Fig 1 shows a schematic description of the *in vitro* BBB model.

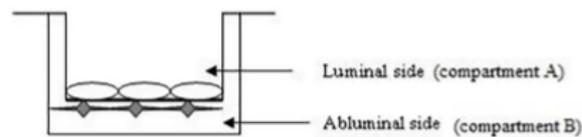
For the procedure of contact coculture, the transwell filter was inverted and C6 cells were seeded onto the abluminal side of the filter at a density of  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Then cells were placed at 37°C for 6 h (time necessary for the cells to adhere to the membrane of the insert). Afterwards, the insert was flipped back and C6 cells were cultured for two days in DMEM. At the end of two days, bEnd.3 cells were seeded onto the luminal side of the transwell filter at a density of  $4 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> and cocultured with C6 cells for eight days.

### TEER measurements

To characterize the formation of a tight endothelial cell monolayer, TEER was recorded using an EVOM resistance meter. One electrode was placed on the luminal side and the other electrode on the abluminal side. These two electrodes were separated by the endothelial layer. The TEER measurements of blank filters (without cells) were subtracted from those of filters with cells. Then the resulting value was multiplied by the membrane area to obtain the TEER measurements in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ .

### Sodium fluorescein permeability measurements

Endothelial paracellular barrier function was also evaluated by measuring the permeability of cells to Na-F (MW = 376 Da). First the medium was removed and cells were washed with Ringer-Hepes prewarmed buffer (5 mM Hepes, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM NaHCO<sub>3</sub> and 2.8 mM glucose). Then Ringer-Hepes buffer containing 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Na-F was loaded onto the luminal side of the insert and incubated at 37°C for 1 h. Samples were removed from the abluminal chamber at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min and immediately



**Fig 1. Schema of the *in vitro* BBB model.**

doi:10.1371/journal.pone.0158010.g001

replaced with fresh Ringer-Hepes buffer. The concentration of Na-F was determined using a fluorescence multiwell plate reader (Ex ( $\lambda$ ) 485 nm; Em ( $\lambda$ ) 530 nm). Transendothelial permeability coefficient (Pe) was calculated as previously described by Deli et al [24]. The increment in cleared volume was calculated by dividing the amount of compound in the receiver compartment by the drug concentration in the donor compartment. The volume cleared was plotted versus time and the slope estimated by linear regression analysis. Then the average cleared volume was plotted versus time, and permeability x surface area product value for endothelial monolayer (PSe) was calculated as follows:

$$\frac{1}{P_{\text{Sendothelial}}} = \frac{1}{P_{\text{Stotal}}} - \frac{1}{P_{\text{Sinsert}}}$$

Where PS total corresponded to the experimental data and PS insert corresponded to the insert without endothelial cells (insert with only C6).

$P_{\text{Sendothelial}}$  divided by the surface area (A) in  $\text{cm}^2$  ( $0.33\text{cm}^2$  for a 24-transwell) generated the endothelial permeability coefficient (Pe in  $10^{-6}\text{cm.s}^{-1}$ ) and calculated as follows:

$$Pe = \frac{P_{\text{Sendothelial}}}{A}$$

### Whole cell ELISA of Pgp, MRP1, ZO-1 and occludin

Cocultured cells were washed with 1% BSA in PBS at pH 7.4 and fixed for 20 min at room temperature with 4% paraformaldehyde in PBS at pH 7.4. Then inserts were washed again and overlaid with 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in methanol for 30 min to block endogenous peroxidase, followed by 20% normal goat serum to block unspecific immunoglobulin binding. Cells were incubated all night at  $4^\circ\text{C}$  with either monoclonal mouse anti-Pgp (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), monoclonal mouse anti-MRP-1 (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), rabbit anti-ZO-1 (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or rabbit anti-occludin (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) antibodies. Then cells were washed and peroxidase conjugated anti-mouse IgG was added as a secondary antibody for 2 h at room temperature (diluted at 1/500). After washing several times, 0.1% of o-phenylenediamine and 0.002%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 0.05 M citrate buffer at pH 4.5 was added for 10 min at room temperature and in the dark. The colour reaction was measured with a spectrophotometer at 490 nm, as described by Cioni et al [3].

### Drug transporter functional assays

The functionality of Pgp and MRP-1 was tested by assessing the release of the substrate BCECF-AM (specific for Pgp and MRP-1) in the absence or presence of specific inhibitors such as verapamil for Pgp and probenecid for MRP-1. The cocultured cells were washed and cultured in DMEM. Then cells were preincubated for 15 min in the absence or presence of inhibitors at  $37^\circ\text{C}$  (40  $\mu\text{M}$  verapamil and 1 mM probenecid, concentrations were determined previously [25]). Inhibitors were added in the luminal compartment to study the transport from the luminal to the abluminal side and conversely. The inserts were incubated with 1 mM of BCECF-AM for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . Finally, 100  $\mu\text{l}$  was sampled from each compartment and fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer at 493 nm excitation and 515 nm emission wavelengths.

### Statistical analysis

The values are expressed as the means  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using Student's t-test. One-way and two-way analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer's tests

were applied to multiple comparisons. Statistical analysis was performed using Statview software. The differences between means were considered to be significant when P values were less than 0.05.

## Results

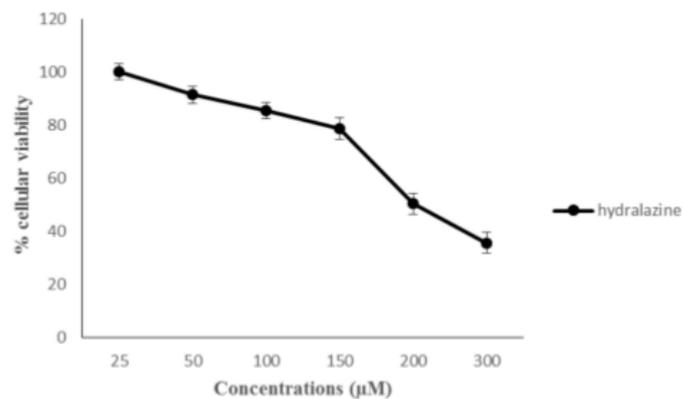
### *In vitro* cytotoxicity assay

The incubation of 24 h allowed us to determine the least cytotoxic concentration that we should use in our study. bEnd.3 cells were exposed to various concentrations of hydralazine (25–300  $\mu$ M). Cytotoxicity activity was evaluated, in a first time, by the MTT method (Fig 2). IC<sub>50</sub> value of hydralazine was 200  $\mu$ M. We chose to use 100  $\mu$ M of hydralazine for our study because at this concentration we had few cytotoxicity effects and confirmed Knowles's results [18]. Then we could confirm that 100  $\mu$ M of hydralazine was least cytotoxic by evaluating cell death with the LDH release method (S1 Fig).

### Effective dose of drugs induced HIF-1 pathway

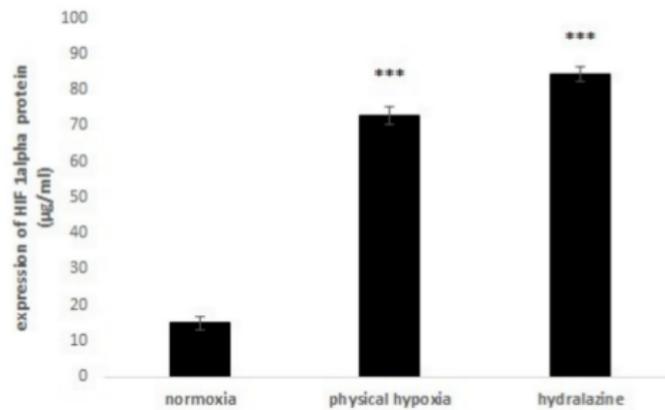
Hydralazine is a chemical agent which could mimic hypoxia since it inhibited PHD that negatively regulates HIF-1. First we determined the effective dose of hydralazine which induced HIF-1 $\alpha$  overexpression. For that, bEnd.3 cells were exposed to 50 and 100  $\mu$ M of hydralazine during 2 h and we compared it to the expression of HIF-1 $\alpha$  after exposure to 2% O<sub>2</sub>. The concentration 50  $\mu$ M of hydralazine did not induce HIF-1 $\alpha$  (data not shown). After 2 h treatment of 100  $\mu$ M hydralazine, the level of HIF-1 $\alpha$  significantly increased to 84.5  $\pm$  2.04  $\mu$ g/ml (versus 15  $\pm$  1.8  $\mu$ g/ml for normoxia) ( $p < 0.001$ ); whereas physical hypoxia significantly induced HIF-1 $\alpha$  after 2 h of exposure with an increase to 72.86  $\pm$  2.6  $\mu$ g/ml (versus 15  $\pm$  1.8  $\mu$ g/ml for normoxia) ( $p < 0.001$ ) (Fig 3). Consequently, we used the concentration of 100  $\mu$ M and 2 h of exposure in our study.

To determine the specific action of the vasodilator hydralazine as a hypoxia mimetic, we compared hydralazine with another vasodilator, prazosin (data not shown). The results showed



**Fig 2. Cytotoxicity effect of drugs in bEnd.3 cells.** Cells were incubated with various concentrations of hydralazine for 24 h. Cytotoxicity was measured by an MTT assay. The results are presented as mean value for triplicate.

doi:10.1371/journal.pone.0158010.g002



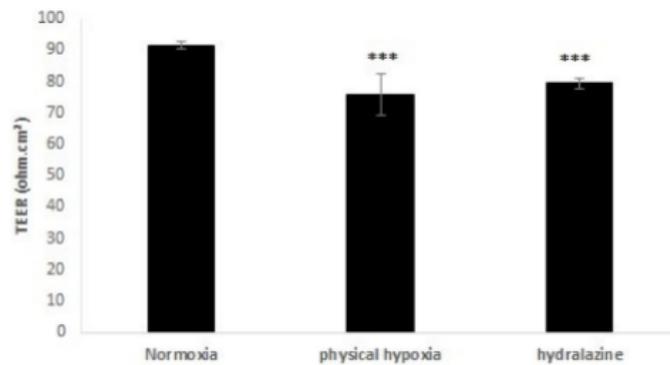
**Fig 3. HIF-1 expression induced by each exposure.** bEnd.3 cells were exposed to 100 µM hydralazine or physical hypoxia. Results were presented as mean value ± s.e.m (n = 8) and normalized. \*\*\* P < 0.001 normoxia vs. hypoxia.

doi:10.1371/journal.pone.0158010.g003

that the addition of prazosin had no effect on the expression of HIF-1α and, therefore, did not have an effect on the hypoxia metabolic pathway.

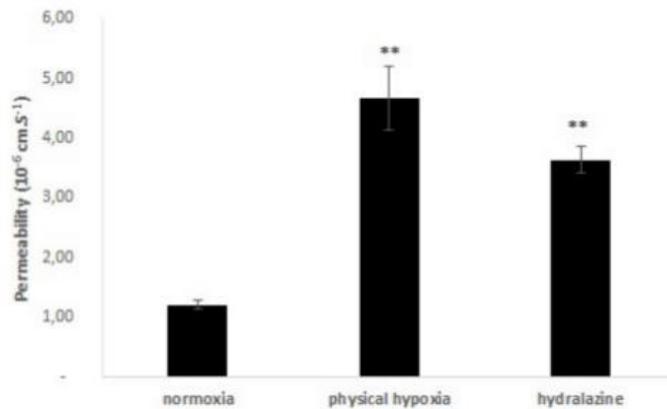
#### Impact of physical hypoxia and hydralazine on BBB integrity

**TEER measurements.** At the optimal TEER measurement (day 6 established at the laboratory), cells were exposed 2 h to physical hypoxia or hydralazine. Fig 4 shows the impact of these exposures on TEER in an *in vitro* BBB model. A decrease in TEER was observed after 2 h for each exposure. For hydralazine, TEER significantly decreased by 13.3%. TEER values varied



**Fig 4. Transendothelial electrical resistance (TEER) measurement after cells of the BBB model were exposed to 100 µM hydralazine or physical hypoxia during 2 h.** Results were presented as mean value ± s.e.m (n = 6). \*\*\* P < 0.05 normoxia vs. hypoxia.

doi:10.1371/journal.pone.0158010.g004



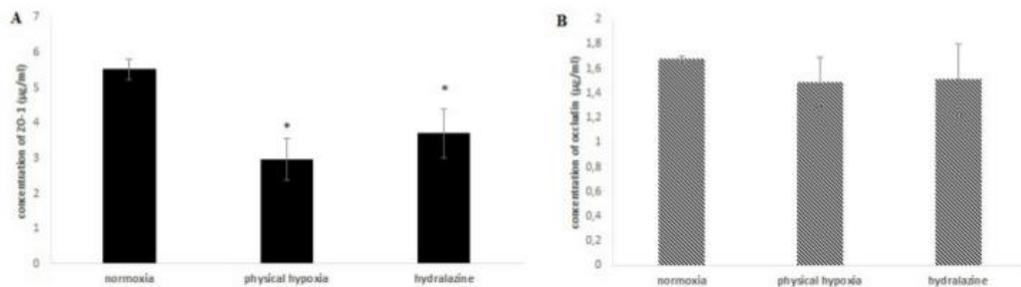
**Fig 5. Absolute membrane permeability measurement during 2 h of hydralazine or physical hypoxia exposures versus normoxia.** Results were presented as mean value  $\pm$  s.e.m (n = 4). \*\* P < 0.01 normoxia vs. hypoxia.

doi:10.1371/journal.pone.0158010.g005

from  $91.5 \pm 1.1$  to  $79.36 \pm 1.5 \Omega.\text{cm}^2$  (p < 0.001). For physical hypoxia, TEER significantly decreased by 17.2%. TEER values varied from  $91.5 \pm 1.1$  to  $75.80 \pm 6.4 \Omega.\text{cm}^2$  (p < 0.001).

**Membrane permeability.** Absolute membrane permeability was determined after 2 h exposure to hydralazine or physical hypoxia, and results are shown in Fig 5. Coefficient permeability of Na-F in the BBB model significantly increased from  $1.21 \pm 0.08 \times 10^{-6}$  to  $4.67 \pm 0.53 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ , for physical hypoxia (p < 0.01). Cells of the BBB model treated with hydralazine showed a significant increase in Na-F permeability (p < 0.01). The permeability coefficient of Na-F varied from  $1.21 \pm 0.08 \times 10^{-6}$  to  $3.64 \pm 0.23 \times 10^{-6} \text{ cm.s}^{-1}$ . There was no significant difference between the two exposures.

**Paracellular transport mediated tight junction proteins occludin and ZO-1.** Determination of occludin and ZO-1 expressions in our *in vitro* BBB model were established after hydralazine or physical hypoxia exposures (2h) (Fig 6). Expression of ZO-1 significantly

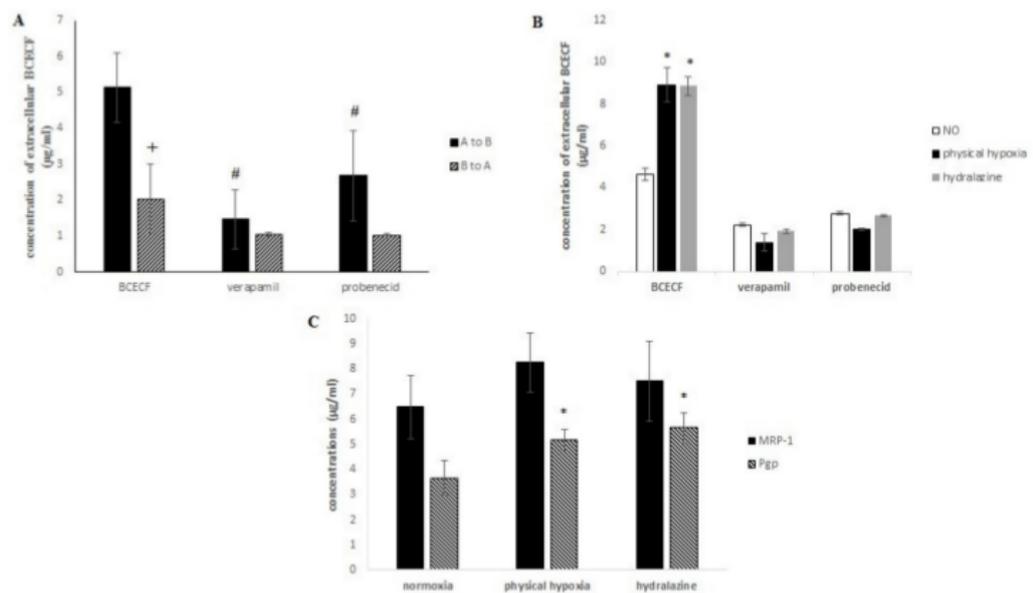


**Fig 6. Concentrations of ZO-1 (A) and occludin (B) after cells of the BBB model were exposed to 100  $\mu\text{M}$  hydralazine, or physical hypoxia, during 2h.** Results are presented as mean value  $\pm$  s.e.m (n = 3) and corrected by number of viable cells. \* P < 0.05 normoxia vs. hypoxia.

doi:10.1371/journal.pone.0158010.g006

decreased after hydralazine or physical hypoxia exposures ( $p = 0.028$  and  $p = 0.024$ , respectively). Expression of ZO-1 decreased by 35% with hydralazine and by 44% with physical hypoxia. There was no significant difference between hydralazine or physical hypoxia. There was also no significant difference for occludin expression with these two exposures. The concentration of occludin varied from  $1.68 \pm 0.02$  to  $1.51 \pm 0.29$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  with hydralazine and from  $1.68 \pm 0.02$  to  $1.49 \pm 0.2$   $\mu\text{g}/\text{ml}$  with physical hypoxia.

**Transendothelial transport mediated efflux transporters.** Transendothelial transport was evaluated by studying the transport of a substrate of Pgp and MRP-1, *i.e.*, BCECF-AM, with a method developed in our laboratory[26]. BCECF-AM is cleaved by intracellular esterase into a fluorescent component BCECF. We studied the release of BCECF in the upper compartment A (transport A to B) and in the lower compartment B (transport B to A). Fig 7A shows a significant decrease of extracellular BCECF release during the transport from B to A ( $p = 0.039$ ). Pumps were more active on apical membranes of bEnd.3 cells (transport from A to B) than on C6's membranes, since BCECF was more efflux. We also noticed that this release was due to Pgp and MRP-1, since a significant decrease of extracellular BCECF was observed when cells were respectively incubated with verapamil ( $p = 0.022$ ) or probenecid ( $p = 0.035$ ), two inhibitors of these pumps. Then transendothelial transport after hypoxic stress was evaluated. We investigated if the transport of BCECF from A to B was changed after hydralazine or physical hypoxia exposure (2h) (Fig 7B). We noticed that efflux transporters prevented the entry of BCECF in cells, since an important transendothelial transport was observed after each exposure. A significant increase of extracellular BCECF was also observed after hydralazine



**Fig 7. (A) Transport of BCECF by Pgp and MRP-1 from compartment A to B or B to A. (B) Release of BCECF during transport from A to B after hydralazine or physical hypoxia exposure. (C) Concentrations of MRP-1 and Pgp after cells of the BBB model were exposed to 100  $\mu\text{M}$  hydralazine, or 2%  $\text{O}_2$  during 2 h. Results are presented as mean value  $\pm$  s.e.m ( $n = 3$ ). \*  $P < 0.05$  BCECF vs. inhibitors and \*  $P < 0.05$  normoxia vs. treatment.**

doi:10.1371/journal.pone.0158010.g007

exposure:  $4.64 \pm 0.29$   $\mu\text{g/ml}$  versus  $8.84 \pm 0.47$   $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0.039$ ) together with physical hypoxia; where extracellular BCECF varied from  $4.64 \pm 0.29$   $\mu\text{g/ml}$  to  $8.91 \pm 0.8$   $\mu\text{g/ml}$  ( $p = 0.034$ ). In parallel, we observed no significant difference between the two exposures. The relative importance between Pgp and MRP-1 was evaluated with two specific inhibitors of Pgp and MRP-1, *i.e.*, verapamil and probenecid, respectively. We observed no significant difference between the two transporters.

In a second time, we studied the expression of Pgp and MRP-1 proteins in our *in vitro* BBB model after hydralazine or physical hypoxia exposure (2h) in order to understand the increase in the pump's observed activity (Fig 7C). MRP-1 expression increased after incubation each exposure. For physical hypoxia MRP-1 increased by 27% and by 18% for hydralazine. No significant difference between control and hypoxia exposures was observed. Pgp expression significantly increased by 41% ( $p = 0.015$ ) and 55% ( $p = 0.016$ ) for physical hypoxia and hydralazine, respectively. There was no significant difference between the two hypoxia exposures ( $p = 0.065$ ).

This study on transendothelial transport mediated efflux transporters showed that the functionality of Pgp and MRP-1 was more active on the apical membrane and this functionality was increased after hypoxic stress. This increase was explained by an overexpression of Pgp and MRP-1 proteins.

## Discussion

Some neurological diseases are associated with BBB disruption. The BBB is an essential structure of the neurovascular unit because it protects the brain from ionic variations and regulates the exchange of molecules between blood circulation and brain tissue. These functions are mainly ensured by TJ proteins and efflux transporters [6,27]. These TJ proteins create a physical dam to paracellular diffusion; whereas efflux transporters act as a barrier system since they actively pump compounds out of cerebral microvascular endothelial cells, which reduce the exposure of the central nervous system to drugs. Hypoxia seems to be a characteristic of these neurological diseases and also a major stress factor that can induce BBB disruption. The cellular response to hypoxia is driven by the HIF-1 pathway [12]. However, elucidation of cellular or molecular mechanisms induced by hypoxic stress, is difficult with physical hypoxia since HIF-1 $\alpha$  has a short half-life. In this regard, we present in this study an original method of hypoxic stress induction via a mimetic agent of the hypoxia pathway. We decided to validate our induction method by comparing the capacity of a new potential mimetic agent, hydralazine, to physical hypoxia (2% O<sub>2</sub>) in order to create a hypoxic state. This original induction method was set up to understand cellular mechanisms involved by hypoxic stress on an *in vitro* BBB model. Our *in vitro* BBB model was composed of the immortalized cell line bEnd.3 and the immortalized C6 cell line. The objective of our study was to establish a model and methodology of hypoxic induction, which requires a large number of cells and a strong reproducibility rate. These points are not always provided by the primary culture, even if primary cultures are more physiological than immortalized cell lines to set up a BBB model. This is why immortalized cell lines are good alternative methods.

In a first step, we demonstrated that these two exposures (hydralazine or physical hypoxia) were able to induce a hypoxic state on our cells since we observed an increase of HIF-1 $\alpha$  protein expression. We found that hydralazine induced an overexpression of HIF-1 $\alpha$  after 2 h at 100  $\mu\text{M}$  (Fig 3). This has been also confirmed by other researchers using this agent [18] or by physical hypoxia (Fig 3). We decided to use this concentration to investigate the consequences of hypoxic stress on our *in vitro* BBB model. Our results showed that hypoxic stress induced by hydralazine or physical hypoxia significantly decreased TEER value (Fig 4) and

significantly increased membrane permeability to fluorescein sodium (Fig 5). Taken together, these results demonstrated that BBB lost its physical barrier properties after hypoxic stress since ionic compounds (measured by TEER value) and molecules (measured by fluorescein sodium) could cross cell membranes. To understand this loss, we investigated the expression of TJ proteins since they are in charge of these physical barrier properties. Hypoxic stress significantly decreased ZO-1 but not occludin expression (Fig 6). This result confirmed those obtained by Engelhard et al with a  $\text{CoCl}_2$  approach (another mimetic agent of the hypoxia pathway) [12]. This suggested that HIF-1 $\alpha$  signalling impacts ZO-1 localization but has no effect on occludin localization. This must be explained by the fact that ZO-1 acts an important role in the development and barrier maintenance of the BBB [28]. Moreover, animal experiments (knockdown for occludin) showed that occludin was not essential for the establishment of TJ complexes despite the fact a loss of this protein was involved in many diseases. Occludin would participate in the regulation of the BBB and more particularly in the regulation of calcium flux through the BBB [29]. Then we investigated the impact of hypoxic stress on efflux transporters as they confer a protection for the brain by rejecting potential dangerous compounds. We showed that Pgp and MRP-1 were more present on apical membranes of brain endothelial cells (Fig 7A), which confirmed literature data [30–32]. We further investigated the impact of hypoxic stress on this apical transport (Fig 7B). Indeed, we showed that endothelial cells of our *in vitro* BBB model released more BCECF, with hydralazine or physical hypoxia, than cells exposed to normoxia. This increase demonstrated that Pgp and MRP-1 were significantly active since they rejected more BCECF during hypoxic stress; but we noticed no significant difference between the two pumps. This result was shown in tumours cells which are rather hypoxic cells. In these cells, HIF-1 $\alpha$  was overexpressed and was associated with an increase of Pgp and MRP-1 activity, which explained a chemoresistance for these cells [33]. Finally, we showed that this increase in activity was linked to an overexpression of Pgp and MRP-1 protein after hypoxic stress (Fig 7C). Taken together, these results demonstrated that cells established a defence mechanism to protect the brain against hypoxic stress; but it would create a resistance to therapy, as it has been described for anti-epileptic drugs and chemotherapy [34]. This would be taken into consideration during the development of therapeutics.

This study was undertaken to validate hydralazine as a suitable hypoxia inducer in order to investigate and understand cellular and molecular impacts of hypoxic stress on the BBB. Our results presented hydralazine as a suitable candidate to create a hypoxic state in our *in vitro* BBB model, since it was able to induce HIF-1 $\alpha$  as physical hypoxia and with few cytotoxicity effects. This result is in line with those described in the literature [18]. Hypoxic stress induced by hydralazine led to an increase of permeability due to a loss of ZO-1 at TJ sites. In contrast, this hypoxic stress induced a defence cellular mechanism with an overexpression of Pgp and MRP-1 which associated with an increase of the pump's activity. Finally, we showed similar results to those obtained by physical hypoxia (2% of  $\text{O}_2$  during 2 h). However, hypoxic alternative methods with mimetic agents could limit studies. Indeed, Shweta et al, showed that cobalt chloride, another mimetic agent, induced an inflammatory response by producing proinflammatory molecules like TNF- $\alpha$ , IL-6 or NO [35]. Moreover, Zhigalova et al, explained that cobalt chloride could activate other molecular pathways [36]. These activations of molecular pathways have not been shown with hydralazine in the literature because of the few studies on this molecule [18], but it could be a possibility. Nevertheless, hydralazine seems to be a good way to understand the first cellular and molecular steps caused by hypoxia on BBB, since our results with hydralazine showed similar results to those obtained with physical hypoxia.

## Conclusion

Induction of hypoxic stress using hydralazine is an innovative and acceptable method to understand the early stages of the consequences of hypoxic stress on the BBB. This induction method has many advantages because hypoxic stress is controlled, reproducible and reversible. It is also less expensive. We are confident that this innovative induction method will allow the understanding of cellular and molecular mechanisms activated at the BBB during pathological states and will bring us some necessary answers for the development of therapeutics.

## Supporting Information

**S1 Fig. Cytotoxicity effect of drugs in bEnd.3 cells.** Cells were incubated with 100  $\mu$ M of hydralazine during 2 h and 24 h. Cytotoxicity was measured by the LDH release method. The results are presented as mean value for triplicate. (TIF)

## Acknowledgments

The authors thank the Dr Anne Briançon-Marjollet (INSERM 1042 HP2 Laboratory of Grenoble, France) for her help in performing physical hypoxia experiments.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NP FR MC. Performed the experiments: MC CP. Analyzed the data: MC CP NP FR. Contributed reagents/materials/analysis tools: MC CP. Wrote the paper: MC NP FR.

## References

1. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev.* 2005; 57: 173–185. doi: [10.1124/pr.57.2.4](https://doi.org/10.1124/pr.57.2.4) PMID: [15914466](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15914466/)
2. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud P-O, Deli MA, et al. In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2016; doi: [10.1177/0271678X16630991](https://doi.org/10.1177/0271678X16630991)
3. Cioni C, Turfizzi E, Zanelli U, Oliveri G, Annunziata P. Expression of Tight Junction and Drug Efflux Transporter Proteins in an in vitro Model of Human Blood-Brain Barrier. *Front Psychiatry.* 2012; 3: 47. doi: [10.3389/fpsy.2012.00047](https://doi.org/10.3389/fpsy.2012.00047) PMID: [22593745](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22593745/)
4. Brown RC, Morris AP, O'Neil RG. Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res.* 2007; 1130: 17–30. doi: [10.1016/j.brainres.2006.10.083](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.10.083) PMID: [17169347](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17169347/)
5. Kido Y, Tamai I, Nakanishi T, Kagami T, Hirose I, Sai Y, et al. Evaluation of blood-brain barrier transporters by co-culture of brain capillary endothelial cells with astrocytes. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2002; 17: 34–41. PMID: [15618650](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15618650/)
6. Al Ahmad A, Taboada CB, Gassmann M, Ogunshola OO. Astrocytes and pericytes differentially modulate blood-brain barrier characteristics during development and hypoxic insult. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab.* 2011; 31: 693–705. doi: [10.1038/jcbfm.2010.148](https://doi.org/10.1038/jcbfm.2010.148)
7. Dehouck MP, Méresse S, Delome P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem.* 1990; 54: 1798–1801. PMID: [2182777](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2182777/)
8. Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, et al. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PloS One.* 2014; 9: e99733. doi: [10.1371/journal.pone.0099733](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099733) PMID: [24936790](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24936790/)
9. Fischer S, Wobben M, Kleinstück J, Renz D, Schaper W. Effect of astroglial cells on hypoxia-induced permeability in PBMEC cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 279: C935–944. PMID: [11003573](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11003573/)
10. Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis.* 2008; 32: 200–219. doi: [10.1016/j.nbd.2008.08.005](https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.08.005) PMID: [18790057](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18790057/)

11. Al Ahmad A, Gassmann M, Ogunshola OO. Involvement of oxidative stress in hypoxia-induced blood-brain barrier breakdown. *Microvasc Res*. 2012; 84: 222–225. doi: [10.1016/j.mvr.2012.05.008](https://doi.org/10.1016/j.mvr.2012.05.008) PMID: [22668821](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22668821/)
12. Engelhardt S, Al-Ahmad AJ, Gassmann M, Ogunshola OO. Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dependent mechanism. *J Cell Physiol*. 2014; 229: 1096–1105. doi: [10.1002/jcp.24544](https://doi.org/10.1002/jcp.24544) PMID: [24375098](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24375098/)
13. Ogunshola OO, Al-Ahmad A. HIF-1 at the blood-brain barrier: a mediator of permeability? *High Alt Med Biol*. 2012; 13: 153–161. doi: [10.1089/ham.2012.1052](https://doi.org/10.1089/ham.2012.1052) PMID: [22994514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22994514/)
14. Yang S-J, Pyen J, Lee I, Lee H, Kim Y, Kim T. Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation in rat C6 glioma cells. *J Biochem Mol Biol*. 2004; 37: 480–486. PMID: [15469737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15469737/)
15. Wang Y, Tang Z, Xue R, Singh GK, Liu W, Lv Y, et al. Differential response to CoCl<sub>2</sub>-stimulated hypoxia on HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and MMP-2 expression in ligament cells. *Mol Cell Biochem*. 2012; 360: 235–242. doi: [10.1007/s11010-011-1061-5](https://doi.org/10.1007/s11010-011-1061-5) PMID: [21938405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21938405/)
16. Cervellati F, Cervellati C, Romani A, Cremonini E, Sticozzi C, Belmonte G, et al. Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells. *Free Radic Res*. 2014; 48: 303–312. doi: [10.3109/10715762.2013.867484](https://doi.org/10.3109/10715762.2013.867484) PMID: [24286355](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24286355/)
17. Rodrigues SF, de Oliveira MA, dos Santos RA, Soares AG, de Cássia Tostes R, Carvalho MHC, et al. Hydralazine reduces leukocyte migration through different mechanisms in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Eur J Pharmacol*. 2008; 589: 206–214. doi: [10.1016/j.ejphar.2008.05.003](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.05.003) PMID: [18554582](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18554582/)
18. Knowles HJ, Tian Y-M, Mole DR, Harris AL. Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ Res*. 2004; 95: 162–169. doi: [10.1161/01.RES.0000134924.89412.70](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000134924.89412.70) PMID: [15192023](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15192023/)
19. Horsman MR, Nordmark M, Hoyer M, Overgaard J. Direct evidence that hydralazine can induce hypoxia in both transplanted and spontaneous murine tumours. *Br J Cancer*. 1995; 72: 1474–1478. PMID: [8519662](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8519662/)
20. Wuest DM, Wing AM, Lee KH. Membrane configuration optimization for a murine in vitro blood-brain barrier model. *J Neurosci Methods*. 2013; 212: 211–221. doi: [10.1016/j.jneumeth.2012.10.016](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.10.016) PMID: [23131353](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23131353/)
21. Hayashi K, Nakao S, Nakaoka R, Nakagawa S, Kitagawa N, Niwa M. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept*. 2004; 123: 77–83. doi: [10.1016/j.regpep.2004.05.023](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2004.05.023) PMID: [15518896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15518896/)
22. Eigenmann DE, Xue G, Kim KS, Moses AV, Hamburger M, Oufir M. Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and dBB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers CNS*. 2013; 10: 33. doi: [10.1186/2045-8118-10-33](https://doi.org/10.1186/2045-8118-10-33) PMID: [24262108](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24262108/)
23. Brown RC, Mark KS, Egleton RD, Huber JD, Burroughs AR, Davis TP. Protection against hypoxia-induced increase in blood-brain barrier permeability: role of tight junction proteins and NF $\kappa$ B. *J Cell Sci*. 2003; 116: 693–700. PMID: [12538770](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12538770/)
24. Dell MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*. 2005; 25: 59–127. PMID: [15962509](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15962509/)
25. Perek N, Le Jeune N, Denoyer D, Dubois F. MRP-1 protein expression and glutathione content of in vitro tumor cell lines derived from human glioma carcinoma U-87-MG do not interact with 99mTc-glucuronate uptake. *Cancer Biother Radiopharm*. 2005; 20: 391–400. doi: [10.1089/cbr.2005.20.391](https://doi.org/10.1089/cbr.2005.20.391) PMID: [16114987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16114987/)
26. Perek N, Denoyer D, Dubois F, Koumanov F. Malignant gliomas display altered plasma membrane potential and pH regulation—interaction with Tc-99m-MIBI and Tc-99m-Tetrofosmin uptakes. *Gen Physiol Biophys*. 2002; 21: 381–404. PMID: [12693711](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12693711/)
27. Berezowski V, Landry C, Dehouck M-P, Cecchelli R, Fenart L. Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res*. 2004; 1018: 1–9. doi: [10.1016/j.brainres.2004.05.092](https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.05.092) PMID: [15262198](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15262198/)
28. Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, et al. Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell*. 2008; 19: 2465–2475. doi: [10.1091/mbc.E07-12-1215](https://doi.org/10.1091/mbc.E07-12-1215) PMID: [18353970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18353970/)
29. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell*. 2000; 11: 4131–4142. PMID: [11102513](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11102513/)

30. Fang W, Lv P, Geng X, Shang E, Yang Q, Sha L, et al. Penetration of verapamil across blood brain barrier following cerebral ischemia depending on both paracellular pathway and P-glycoprotein transportation. *Neurochem Int.* 2013; 62: 23–30. doi: [10.1016/j.neuint.2012.10.012](https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.10.012) PMID: [23142723](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23142723/)
31. Felix RA, Barrand MA. P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation by transient oxidative stress. *J Neurochem.* 2002; 80: 64–72. PMID: [11796744](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11796744/)
32. Nies AT, Jedlitschky G, König J, Herold-Mende C, Steiner HH, Schmitt H-P, et al. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience.* 2004; 129: 349–360. doi: [10.1016/j.neuroscience.2004.07.051](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.051) PMID: [15501592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15501592/)
33. Chen Z-S, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, et al. Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* 2002; 62: 3144–3150. PMID: [12036927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12036927/)
34. Xiao-Dong L, Zhi-Hong Y, Hui-Wen Y. Repetitive/temporal hypoxia increased P-glycoprotein expression in cultured rat brain microvascular endothelial cells in vitro. *Neurosci Lett.* 2008; 432: 184–187. doi: [10.1016/j.neulet.2007.12.017](https://doi.org/10.1016/j.neulet.2007.12.017) PMID: [18241990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18241990/)
35. Shweta, Mishra KP, Chanda S, Singh SB, Ganju L. A comparative immunological analysis of CoCl<sub>2</sub> treated cells with in vitro hypoxic exposure. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med.* 2015; 28: 175–185. doi: [10.1007/s10534-014-9813-9](https://doi.org/10.1007/s10534-014-9813-9)
36. Zhigalova N, Artemov A, Mazur A, Prokhortchouk E. Transcriptome sequencing revealed differences in the response of renal cancer cells to hypoxia and CoCl<sub>2</sub> treatment. *F1000Research.* 2015; 4: 1518. doi: [10.12688/f1000research.7571.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.7571.1) PMID: [26925226](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26925226/)

# Chapitre 3 : Comparaison de deux agents mimétiques de la voie hypoxique afin de déterminer l'agent le plus adéquat pour des études *in vitro* de la BHE

Dans l'étude précédente, nous avons validé l'hydralazine, vasodilatateur ayant comme spécificité d'inhibiter la PHD, comme agent mimétique de la voie hypoxique (Chatard *et al.*, 2016). De plus, cette molécule semble être un moyen adéquat pour étudier l'impact de stress hypoxique sur la BHE. Toutefois, il existe d'autres inhibiteurs de la PHD décrits dans la littérature qui stabilisent HIF-1 $\alpha$ . L'inhibiteur, le plus utilisé et décrit dans la littérature, est le chlorure de cobalt (CoCl<sub>2</sub>) (Yang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012; Engelhardt *et al.*, 2014). En effet, le chlorure de cobalt a été utilisé pour induire une hypoxie sur des cellules épithéliales rétiniennes. Ils ont ainsi démontré que cette hypoxie, induit par CoCl<sub>2</sub>, entraînait des dommages sur ces cellules par l'intermédiaire de stress oxydatifs (Cervellati *et al.*, 2014). Néanmoins, le chlorure de cobalt s'est révélé plutôt cytotoxique pour les cellules épithéliales rétiniennes. Par conséquent, il est difficile de savoir si les effets observés sont dus à l'hypoxie induit par cet agent ou s'ils sont dus à sa cytotoxicité. Toutefois, peu d'études utilisent le chlorure de cobalt comme agent mimétique sur la BHE (Engelhardt *et al.*, 2014).

Dans cette étude, nous avons voulu déterminer l'agent mimétique de la voie hypoxique, le plus adéquat pour une étude sur la BHE en termes de non cytotoxicité, de reproductibilité et qui est contrôlable. Pour cela, nous avons comparé deux agents mimétiques : l'hydralazine, qui a montré un potentiel encourageant, et le chlorure de cobalt qui est l'agent mimétique de référence.

Les objectifs de cette étude ont été :

- d'évaluer la cytotoxicité de nos deux agents mimétiques par deux tests complémentaires.
- d'étudier l'impact du stress hypoxique induit par ces deux molécules sur l'intégrité de notre modèle *in vitro* de BHE

## 1. Résultats

Dans cette étude nous avons induit des stress hypoxiques de 24 heures afin d'étudier l'impact d'une hypoxie prolongée (modélisation d'une hypoperfusion cérébrale prolongée) sur la BHE, qui reste moins décrite dans la littérature. Le premier objectif a été d'évaluer la cytotoxicité possible des deux agents sur nos cellules, après une exposition de 24 heures. Cette évaluation a été effectuée avec deux tests : un test de viabilité cellulaire (MTT) et un test de mortalité cellulaire (LDH). Les résultats ont révélé que l'hydralazine avait une faible mortalité cellulaire (17,77 %) tandis que le chlorure de cobalt produit une forte cytotoxicité sur nos cellules (68,96 % de mortalité cellulaire) (**Figure 2**). **L'hydralazine présente donc un avantage sur l'agent mimétique de référence, puisqu'elle est beaucoup moins cytotoxique pour notre modèle *in vitro* de BHE.** Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la concentration efficace de chaque agent qui induit une surexpression de HIF-1 $\alpha$  et donc un état hypoxique. Nous avons ainsi montré que la concentration 50  $\mu$ M (une des concentrations les moins cytotoxiques pour les 2 molécules) n'induisait pas de surexpression de HIF-1 $\alpha$ , quel que soit l'agent mimétique. Toutefois, une **augmentation d'expression de HIF-1 $\alpha$**  de 212% et de 224% après une exposition avec **100  $\mu$ M d'hydralazine et de CoCl<sub>2</sub>** respectivement (**Figure 3**). Nous avons donc utilisé cette concentration pour la suite de notre étude.

Le deuxième objectif fut d'étudier l'impact de ce stress hypoxique prolongé, induit par ces deux molécules, sur l'intégrité de notre modèle cellulaire de BHE. Après une exposition de 24 heures, avec les agents mimétiques, une diminution importante de la TEER est observée. En effet, celle-ci diminue de 68,2 % avec l'hydralazine et de 58,5% avec le CoCl<sub>2</sub> (**Figure 4**). La perméabilité de notre modèle est également altérée après une exposition de 24 heures à une hypoxie. En effet, le coefficient de perméabilité au sodium fluorescéine augmente de façon significative après le stress hypoxique. Cette augmentation semble plus importante avec le CoCl<sub>2</sub> qu'avec l'hydralazine (Figure 5). **Ces deux résultats montrent que notre barrière est altérée.** L'étude de l'expression des protéines de jonctions serrées a confirmé ces résultats, puisque l'expression de ZO-1 diminue de 19 % avec l'hydralazine et de 30 % avec le CoCl<sub>2</sub>. Cependant l'expression de l'occludine n'est pas altérée par un stress hypoxique prolongé (**Figure 6**).

Enfin, nous avons étudié l'impact d'une exposition de 24h, avec l'hydralazine et le  $\text{CoCl}_2$ , sur l'expression et l'activité des transporteurs d'efflux. Nous avons montré que ces transporteurs empêchent l'entrée du BCECF dans les cellules, puisqu'un **important transport transendothélial est observé** après un stress hypoxique prolongé, que ce soit avec l'hydralazine ou le  $\text{CoCl}_2$  (**Figure 7A**). En effet, BCECF est efflué de façon plus importante dans des conditions d'hypoxie qu'en condition physiologique (normoxique). Aucune différence significative n'est observée entre l'induction produite par l'hydralazine ou par le  $\text{CoCl}_2$ . Cette augmentation d'activité de Pgp et MRP-1 peut être expliquée par **une surexpression de ces protéines** à la membrane apicale des cellules, qui est observée après une exposition à une hypoxie prolongée (**Figure 7B**). Toutefois, aucune différence significative n'est observée entre les deux agents mimétiques.

## **2. Discussion**

Dans notre précédente étude, nous avons démontré que l'hydralazine semblait être un bon candidat d'agent mimétique de la voie hypoxique pour la BHE (Chatard *et al.*, 2016). Toutefois, l'inhibiteur de PHD le plus utilisé dans la littérature est le chlorure de cobalt (Wang *et al.*, 2000, 2012). L'objectif de cette étude était de déterminer l'agent mimétique de la voie hypoxique le plus adéquat pour étudier l'impact de stress hypoxiques sur la BHE. Nous avons induit un stress hypoxique prolongé. Dans un premier temps, nous avons déterminé la concentration pour laquelle ces deux agents induisaient un état hypoxique sur nos cellules. Puis nous avons étudié leur impact sur l'intégrité de notre modèle cellulaire de BHE.

### **2.1. Un stress hypoxique prolongé induit une perte d'intégrité du modèle et une augmentation de l'activité des transporteurs d'efflux**

Dans un premier temps, nous avons démontré que l'hydralazine et le chlorure de cobalt induisaient une surexpression de HIF-1 $\alpha$  après 24 heures d'exposition à 100  $\mu\text{M}$  de l'une ou l'autre des molécules. Ce résultat est cohérent avec les concentrations utilisées pour d'autres études de la littérature (Knowles *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2012; Cervellati *et al.*, 2014). Nous

avons utilisé cette concentration pour étudier les conséquences d'un stress hypoxique de 24 heures sur notre modèle *in vitro* de BHE.

L'évaluation de la perméabilité (TEER et perméabilité au sodium fluorescéine) montre que **notre modèle** laisse passer des ions et des molécules, par conséquent celui-ci **n'est plus imperméable**. Cette perte d'intégrité s'explique par une diminution significative de l'expression de ZO-1, qui est une protéine des jonctions serrées essentielle à la mise en place et au maintien des propriétés de barrière de la BHE. Ce résultat est en adéquation avec ceux observés lors de l'étude précédente (Chatard *et al.*, 2016) et ou lors de l'étude d'Engelhardt et al (Engelhardt *et al.*, 2014). Les résultats observés sont identiques avec une induction avec l'hydralazine et avec une induction par le chlorure de cobalt.

L'étude des transporteurs d'efflux démontre qu'une exposition prolongée à l'hypoxie conduit à une augmentation de l'activité de Pgp et MRP-1 au niveau des membranes apicales des cellules endothéliales de notre modèle. **Cette augmentation est expliquée par une surexpression de ces protéines lors du stress hypoxique induit par les deux molécules**. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment et montrent que l'hydralazine et le chlorure de cobalt sont des méthodes alternatives appropriées pour étudier l'impact de l'hypoxie sur la BHE. Toutefois l'étude de cytotoxicité nous a permis de mettre en avant **l'hydralazine comme agent mimétique le plus adéquat pour évaluer la voie hypoxique sur la BHE**.

## **2.2. L'hydralazine est l'agent mimétique le plus adéquat pour les études sur la BHE.**

Nos résultats présentent l'hydralazine comme candidat adéquat pour créer un environnement cellulaire hypoxique sur la BHE, puisqu'il est capable d'induire une **surexpression de HIF-1 $\alpha$  avec peu d'effet cytotoxique sur nos cellules**. Ces résultats sont en adéquation avec ceux décrits dans la littérature (Knowles *et al.*, 2004; Chatard *et al.*, 2016). Le chlorure de cobalt est un agent mimétique déjà utilisé dans plusieurs études. Néanmoins l'évaluation de la cytotoxicité a révélée que cette molécule était très cytotoxique pour nos cellules endothéliales (100  $\mu$ M étant l'IC50, c'est-à-dire la concentration pour laquelle 50 % de

mortalité cellulaire est observée). L'étude de Cervellati et al. démontre que la cytotoxicité induite par le chlorure de cobalt proviendrait d'une activation de la caspase-3 entraînant une apoptose et donc la mort de nos cellules (Cervellati *et al.*, 2014). Par conséquent, cette cytotoxicité est un problème dans nos études sur l'impact de l'hypoxie, puisque nous ne pouvons pas déterminer si les effets observés sont dus à l'hypoxie ou à la cytotoxicité propre de la molécule inductrice. Ces résultats montrent donc que **le chlorure de cobalt n'est pas le meilleur candidat pour étudier l'impact cellulaire de l'hypoxie sur la BHE.**

**Cette étude présente l'hydralazine comme l'agent mimétique le plus adéquat pour étudier l'impact cellulaire et moléculaire de l'hypoxie sur la BHE. En effet, nous avons montré des résultats similaires pour l'hydralazine et le chlorure de cobalt sur la BHE. Toutefois, l'hydralazine s'avère peu cytotoxique pour nos cellules et donc permet une meilleure étude des conséquences de l'hypoxie. De plus, cette méthode d'induction d'hypoxie par l'hydralazine est contrôlable, facile à mettre en place, reproductible, réversible et peu coûteuse.**

*Cette étude a fait l'objet d'un article qui a été soumis dans la revue Cellular Physiology and Biochemistry et qui est en révision.*

**Hydralazine is a suitable mimetic agent of hypoxia to study the impact of hypoxic stress  
on in vitro blood-brain barrier model**

**Morgane Chatard<sup>1,2\*</sup>, Clémentine Puech<sup>2</sup>, Nathalie Perek<sup>2#</sup> and Frédéric Roche<sup>1#</sup>.**

<sup>1</sup>Univ Lyon, UJM-Saint-Etienne, SNA-EPIS, EA4607, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>2</sup>Univ Lyon, UJM-Saint-Etienne, INSERM, SAINBIOSE U1059 Team DVH, F-42023, Saint-  
Etienne, France

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author: Morgane Chatard, SNA-EPIS EA4607, Campus Santé Innovation 10,  
rue de la Marandière BP80019, 42270 Saint Priest en Jarez (France). Tel: (33)4.77.42.14.52;

e-mail address: [morgane.chatard@univ-st-etienne.fr](mailto:morgane.chatard@univ-st-etienne.fr)

Running head: Impact of hydralazine on blood-brain barrier

This work was supported by grants from Jean Monnet University of Saint-Etienne

**Abstract:** *Background/Aims* - Understanding cellular mechanisms induced by hypoxia is fundamental to reduce blood-brain barrier disruption. Nevertheless, the investigation of hypoxia on cellular pathways is complex with physical hypoxia because HIF-1 $\alpha$  has a short lifetime and rapidly reverts back to a normoxic state. To overcome this difficulty, mimetic agents of the hypoxia pathway have been developed, including the gold standard CoCl<sub>2</sub>. In this study, we proposed to compare CoCl<sub>2</sub> and hydralazine in order to determine the suitable mimetic agent of hypoxia for the study on the BBB.

*Methods* – We studied the cytotoxicity and the impact of these molecules on the integrity of an *in vitro* BBB model

*Results* - We showed that the impact of hypoxic stress in our *in vitro* BBB model is rather similar between hydralazine and CoCl<sub>2</sub>. Hypoxic stress led to an increase of BBB permeability either with CoCl<sub>2</sub> or hydralazine. Tight junction protein expressions showed that this hypoxic stress decreased ZO-1 but not occludin but cells had set up a defence mechanism by increasing expression and activity of their efflux transporters.

*Conclusion*- Our results demonstrated that hydralazine is a better mimetic agent and more suitable than CoCl<sub>2</sub> because it had the same effect but without the cytotoxic effect on *in vitro* BBB cells.

Keywords: Blood-brain barrier, CoCl<sub>2</sub>, hydralazine, hypoxia, *in vitro* model.

## Introduction

The blood-brain barrier (BBB) is a physical and metabolic barrier which separates the central nervous system (CNS) from the blood circulation. It is a multicellular neurovascular unit composed of brain microvascular endothelial cells, astrocytes, pericytes, microglia and extracellular matrix[1,2]. Brain endothelial cells control the transport of substances between brain and blood through transporters and tight junction (TJ) proteins [3]. TJ proteins regulate the transport of ions via the development of high transendothelial electrical resistance (TEER) as well as the transport of molecules[4,5], which create a physical blockade to paracellular diffusion[6]. This specialized phenotype is fundamental for protection of the brain. Moreover, this protection is also ensured by efflux ABC family transporter proteins which are ATP dependant and expressed by endothelial cells, like P-glycoprotein (Pgp) and multidrug resistance proteins (MRPs). These active efflux proteins act as a barrier system which reduce the exposure of the CNS to drugs, by pumping compounds out of endothelial cells in blood[4]. These barrier properties are mostly induced and maintained by the close opposition between brain endothelial cells and astrocytes[7,8]. Since the structural and functional integrity of transporters and TJ proteins are necessary for an intact BBB, alteration of these components is a key event in the BBB's impairment. Hypoxia is a major stress factor which induces a BBB's disruption. Indeed, the brain is a major consumer of oxygen and is therefore sensitive to changes in oxygen levels[9,10]. The cellular response to hypoxia is mainly driven through activation of the HIF-1 pathway[11]. Under normoxia conditions, oxygen regulates the HIF-1 $\alpha$  subunit, which is rapidly degraded by prolyl hydroxylation that targets its degradation in the proteasome. Hypoxia inhibits the prolyl hydroxylase domain leading to stabilization of the HIF-1 $\alpha$  subunit in the cytoplasm. Then it is translocated to the nucleus where it binds to hypoxia responsive elements in promoter regions of target genes involved in cellular

adaptation to hypoxic stress and induces their expression[12]. Elucidation of the cellular and molecular mechanisms, induced by hypoxic stress, is complex with physical hypoxia because HIF-1 $\alpha$  has a short half-life (almost five minutes) and is rapidly reverted. In this regard, a wide variety of prolyl hydroxylase domain (PHD) inhibitors, which lead to a stabilization of HIF-1 $\alpha$ , have been developed. These inhibitors allow to create hypoxic stress and represent a useful method to investigate the BBB's disruption by hypoxia. The PHD inhibitor usually used in studies is CoCl<sub>2</sub>[12–14]. Cervelatti et al used CoCl<sub>2</sub> to achieve stabilization of HIF-1 $\alpha$  because it inhibits PHD by blocking the catalysis of prolyl hydroxylases[15]. Unfortunately, CoCl<sub>2</sub> is a rather highly cytotoxic agent and prevents its use in *in vitro* studies to mimic prolonged cerebral hypoperfusion, like in ischemic stroke. Indeed it is difficult to know whether the observed effect is due to hypoxic stress induced by CoCl<sub>2</sub> or its cytotoxicity. Other inhibitors of PHD exist like hydralazine. Hydralazine is a vasodilator used to treat severe hypertension, congestive heart failure, myocardial infarction and pre-eclampsia[16]. Hydralazine also shows a capacity to induce a transient and physiological HIF-1 $\alpha$  overexpression by inhibiting PHD activity[17]. In the literature, hydralazine was only used to mimic a hypoxic state in *in vivo* and *in vitro* cancer models[18]. Hydralazine is already used in *in vivo* models, it is therefore interesting to test hydralazine as a mimetic agent of hypoxia because others mimetic agents, like CoCl<sub>2</sub>, are rather toxic to be used on *in vivo* models. In a recent work, we validated hydralazine as a mimetic agent of hypoxia on an *in vitro* BBB model in comparison with physical hypoxia[19].

In the present study, we wanted to determine a suitable mimetic agent of hypoxia which is not cytotoxic, reproducible and controllable. For that, we compared hydralazine and CoCl<sub>2</sub> to study the impact of hypoxia on an *in vitro* transwell BBB model. We used a co-culture in contact model composed of the immortalized cell line bEnd.3 and the C6 cell line. This approach allowed interaction between endothelial cells and astrocytic cells. Then impact of

hypoxic stress, induced by hydralazine or  $\text{CoCl}_2$ , was assessed by studying endothelial paracellular permeability with TEER measurements and absolute membrane permeability was determined with sodium fluorescein (Na-F)[20,21]. Evaluation of transport was also investigated on expression and activity of two efflux transporters (Pgp and MRP-1) and on expression of two TJ proteins (ZO-1 and occludin). Our results showed that hydralazine represented a suitable and reproducible way to create an *in vitro* hypoxic environment without cytotoxicity.

## **Materials and Methods**

### *Chemicals and reagents*

Hydralazine,  $\text{CoCl}_2$ , BCECF-AM, probenecid, verapamil and Na-F were purchased from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). MTT (methyl-thiazolyl-tetrazolium) kit and DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) were also purchased from Sigma. LDH release test was purchased from Promega Corporation (Madison, USA). Antibodies and reagents for the detection of HIF-1 $\alpha$  were products of R&D systems (Lille, France). All compounds for Ringer-Hepes buffer were purchased from Sigma.

Occludin and ZO-1 antibodies were purchased from Life Technologies (Saint Aubin, France), Pgp and MRP-1 antibodies were purchased from GeneTex (San Antonio, Texas, U.S.A) and Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, U.S.A), respectively.

bEnd.3 cells and C6 cells were obtained from the ATCC (Manassas, VA, U.S.A).

Cell culture inserts for 24-well (0.4  $\mu\text{m}$  pore diameter size, transparent PET membrane) were purchased from Corning distributors (Sigma). EVOM voltohmmeter system was purchased from World Precision Instruments (Hertfordshire, UK).

### *In vitro cytotoxicity assay*

Cytotoxicity of hydralazine or CoCl<sub>2</sub> was measured by MTT method. Growing cells were seeded at 10,000 cells/well using a 96-well microplate that was supplemented with DMEM. Cells were allowed to grow for 48 h before they were exposed to drugs. Then cells were treated with various concentrations of hydralazine or CoCl<sub>2</sub>. Phosphate buffer saline (PBS) 1X was used to dissolve drugs. After the treated cells were incubated for 24 h, MTT solution was added and the plates were incubated at 37°C for 4 h. To dissolve formazan, 100 µl DMSO was added and the plates were measured at 570 nm with a spectrophotometer. The less cytotoxic values were determined by plotting the drug concentrations versus the survival ratio of treated cells.

Then we also evaluated cell death with the LDH release method to confirm the least cytotoxic concentrations given by MTT results. For that, cells were seeded in 96-well plates at 10,000 cells/well. 100 µM of hydralazine or CoCl<sub>2</sub> was added during 24 h. After the exposure period, a lysis solution was used in control wells to generate a maximum LDH release. Then cells were incubated with cytotox-ONE™ reagent during 10 min. A stop solution was added before recording fluorescence with an excitation wavelength of 560 nm and an emission wavelength of 590 nm. The average fluorescence values of the culture medium background (wells without cells) were subtracted from fluorescence values of experimental wells. Then percent cytotoxicity was given by the following equation:

$$\% \text{ cytotoxicity} = 100 \times \frac{(\text{experimental} - \text{culture medium background})}{(\text{maximum LDH release} - \text{culture medium background})}$$

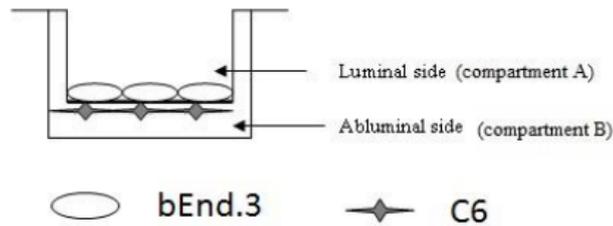
### *Effect of hydralazine or CoCl<sub>2</sub> treatment on hypoxia metabolic pathway*

Effect of hydralazine or  $\text{CoCl}_2$  treatment was validated by the study of HIF-1 $\alpha$  expression (the key regulation of hypoxic response) to determine the effective dose where HIF-1 $\alpha$  was induced. For that, cells were seeded onto a 96-well plate at a density of 10,000 cells/well. Then cells were treated with either hydralazine or  $\text{CoCl}_2$  (50 and 100  $\mu\text{M}$ ; the less cytotoxic doses defined by cytotoxic test) during 24 h. Finally, cells were fixed to the support with 4% formaldehyde and the expression of HIF-1 $\alpha$  was determined by whole cell-ELISA. For that, anti-HIF 1 $\alpha$  antibodies were added at 4°C overnight (diluted at 1/100), then cells were incubated with secondary antibodies for 2 h at room temperature (diluted at 1/500). Fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer with 540 nm excitation and 600 nm emission wavelengths.

#### *In vitro BBB model set up*

The BBB model was composed of bEnd.3 cells (immortalized mouse brain endothelial cells) and C6 cells. All cells were used before passage number 30 (passages 12-28 for bEnd.3 cells and 10-30 for C6 cells), which corresponded to the time where these cells may begin to lose their BBB properties, as cited by the supplier and in a previous study[22].

Once the cells reached subconfluency, they were placed onto cell culture inserts for 24-well plates. Figure 1 shows a schematic description of the *in vitro* BBB model.



**Figure 1: Schema of the *in vitro* blood-brain barrier model.**

For the procedure of contact co-culture, the transwell filter was inverted and C6 cells were seeded onto the abluminal side of the filter at a density of  $4 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. Then cells were placed at 37°C for 6 h (time necessary for the cells to adhere to the membrane of the insert). Afterward, the insert was flipped back and C6 cells were cultured for two days in DMEM. At the end of two days, bEnd.3 cells were seeded onto the luminal side of the transwell filter at a density of  $4 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> and co-cultured with C6 cells for eight days.

#### *TEER measurements*

To characterize the formation of a tight endothelial cell monolayer, TEER was recorded using an EVOM resistance meter. One electrode was placed on the luminal side and the other electrode on the abluminal side. These two electrodes were separated by the endothelial layer. The TEER measurements of blank filters (without cells) were subtracted from those of filters with cells. Then the resulting value was multiplied by the membrane area to obtain the TEER measurements in  $\Omega \cdot \text{cm}^2$ .

#### *Na-F permeability measurements*

Endothelial paracellular barrier function was also evaluated by measuring the permeability of cells to Na-F (MW = 376 Da). First the medium was removed and cells were washed with Ringer-Hepes prewarmed buffer (5 mM Hepes, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM NaHCO<sub>3</sub> and 2.8 mM glucose). Then Ringer-Hepes buffer containing 10 µg/ml of Na-F was loaded onto the luminal side of the insert and incubated at 37°C for 1 h. Samples were removed from the abluminal chamber at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min and immediately replaced with fresh Ringer-Hepes buffer. The concentration of Na-F was determined using a fluorescence multiwell plate reader (Ex (λ) 485 nm; Em (λ) 530 nm). Transendothelial permeability coefficient (Pe) was calculated as previously described by Deli et al[23]. The increment in cleared volume was calculated by dividing the amount of compound in the receiver compartment by the drug concentration in the donor compartment. The volume cleared was plotted versus time and the slope estimated by linear regression analysis. Then the average cleared volume was plotted versus time, and permeability x surface area product value for endothelial monolayer (PSe) was calculated as follows:

$$\frac{1}{PS_{endothelial}} = \frac{1}{PS_{total}} - \frac{1}{PS_{insert}}$$

PS<sub>endothelial</sub> divided by the surface area (A) in cm<sup>2</sup> (0.33cm<sup>2</sup> for transwell-24) generated the endothelial permeability coefficient (Pe in 10<sup>-6</sup>cm.s<sup>-1</sup>) and calculated as follows:

$$P_e = \frac{PS_{endothelial}}{A}$$

*Whole cell ELISA of Pgp, MRP1, ZO-1 and occludin*

Co-cultured cells were washed with 1% BSA in PBS at pH 7.4 and fixed for 20 min at room temperature with 4% paraformaldehyde in PBS at pH 7.4. Then inserts were washed again

9

and overlaid with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 30 min to block endogenous peroxidase, followed by 20% normal goat serum to block unspecific immunoglobulin binding. Cells were incubated all night at 4°C with either monoclonal mouse anti-Pgp (2 µg/ml), monoclonal mouse anti-MRP-1 (10 µg/ml), rabbit anti-ZO-1 (4 µg/ml) or rabbit anti-occludin (1 µg/ml) antibodies. Then cells were washed and secondary antibodies were added for 2 h at room temperature (diluted at 1/500). After washing several times, 0.1% of o-phenylenediamine and 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.05 M citrate buffer at pH 4.5 was added for 10 min at room temperature and in the dark. The colour reaction was measured with a spectrophotometer at 490 nm, as described by Cioni et al[5].

#### *Drug transporter functional assays*

The functionality of Pgp and MRP-1 was tested by assessing the release of the substrate BCECF-AM (specific for Pgp and MRP-1) in the absence or presence of specific inhibitors such as verapamil for Pgp and probenecid for MRP-1. The co-cultured cells were washed and cultured in DMEM. Then cells were preincubated for 15 min in the absence or presence of inhibitors at 37°C (40 µM verapamil and 1 mM probenecid; concentrations were determined previously[24]). Inhibitors were added in the luminal compartment to study the transport from the luminal to the abluminal side and conversely. The inserts were incubated with 1 mM of BCECF-AM for 1 h at 37°C. Finally, 100 µl was sampled from each compartment and fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer at 493 nm excitation and 515 nm emission wavelengths.

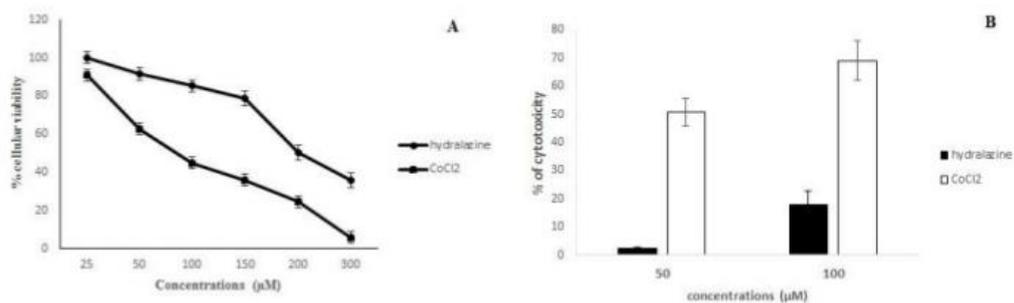
#### *Statistical analysis*

The values are expressed as the means  $\pm$  s.e.m. Statistical analysis was performed using Student's t-test. One-way and two-way analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer's tests were applied to multiple comparisons. Statistical analysis was performed using Statview software. The differences between means were considered to be significant when P values were less than 0.05.

## **Results**

### *In vitro* cytotoxicity assay

bEnd.3 cells were exposed to a range of concentrations of hydralazine or  $\text{CoCl}_2$  (25 – 300  $\mu\text{M}$ ) according to the literature. We studied the effect of hypoxic stress with an incubation time of about 24 h because the impact of prolonged hypoxia on BBB is less described than short exposure and difficult to monitor with chemical agents like  $\text{CoCl}_2$ , which has an important cytotoxicity[15]. After 24 h of exposure to drugs, cytotoxicity activity was evaluated by the MTT method (Figure 2A).  $\text{IC}_{50}$  values of drugs were 200  $\mu\text{M}$  for hydralazine and 100  $\mu\text{M}$  for  $\text{CoCl}_2$ , respectively. So less cytotoxic concentrations for hydralazine and  $\text{CoCl}_2$  are 50 and 100  $\mu\text{M}$ . We verified the cytotoxicity of these concentrations by evaluating cell death with the LDH release method (Figure 2B). We showed that hydralazine had a percentage of cytotoxicity about  $2.36 \pm 0.4\%$  for 50  $\mu\text{M}$  and  $17.77 \pm 4.9\%$  for 100  $\mu\text{M}$ ; whereas  $\text{CoCl}_2$  had a percentage of cytotoxicity about  $50.84 \pm 4.9\%$  for 50  $\mu\text{M}$  and  $68.96 \pm 7\%$  for 100  $\mu\text{M}$ .

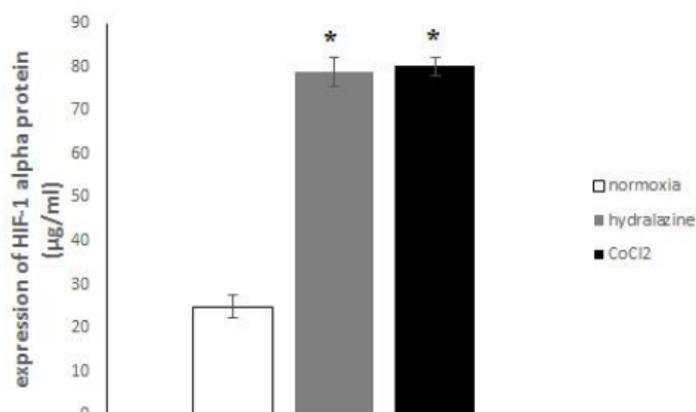


**Figure 2: Cytotoxicity effect of drugs in bEnd.3 cells. Cells were incubated with various concentrations of hydralazine or CoCl<sub>2</sub> for 24 h. Cytotoxicity was measured by an MTT assay (A) and LDH release method (B). The results are presented as a mean value for triplicates.**

As expected, CoCl<sub>2</sub> exposure produced a high cytotoxicity. On the contrary, hydralazine is not cytotoxic and can be used for 24 h of exposure.

*Effective dose of drugs induced HIF-1 pathway*

Hydralazine and CoCl<sub>2</sub> are chemical agents which could mimic hypoxia since they inhibited PHD, which negatively regulates HIF-1. First we determined the effective dose for each drug which induced HIF-1 $\alpha$  overexpression. For that, bEnd.3 cells were exposed to 50 and 100  $\mu$ M of hydralazine and CoCl<sub>2</sub> during 24 h. The concentration 50  $\mu$ M of hydralazine and CoCl<sub>2</sub> did not induce HIF-1 $\alpha$  (data not shown). After 24-h treatment with 100  $\mu$ M hydralazine, the level of HIF-1 $\alpha$  significantly increased by 212% ( $p = 0.018$ ); whereas 100  $\mu$ M of CoCl<sub>2</sub> significantly induced HIF-1 $\alpha$  after 24 h of treatment, with an increase of 224% ( $p = 0.024$ ) (Figure 3). Consequently, we used the concentration of 100  $\mu$ M in our studies.

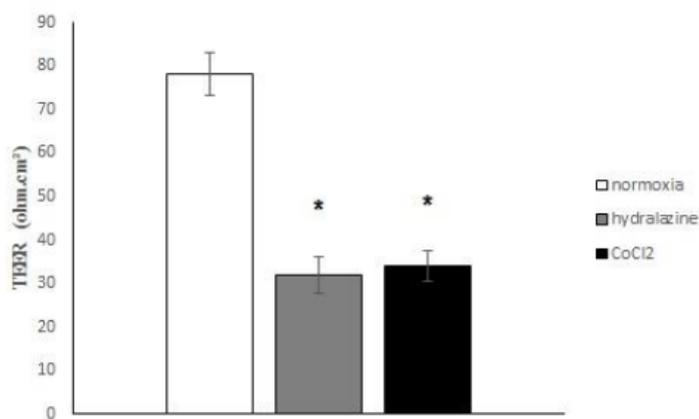


**Figure 3: HIF-1 expression induced by each drug. bEnd.3 cells were treated with 100 µM hydralazine or CoCl<sub>2</sub>. Results were presented as mean value ± s.e.m (n=3) and normalized. \* P < 0.05 normoxia vs. treatment.**

*Impact of CoCl<sub>2</sub> and hydralazine on BBB integrity*

❖ On TEER measurements

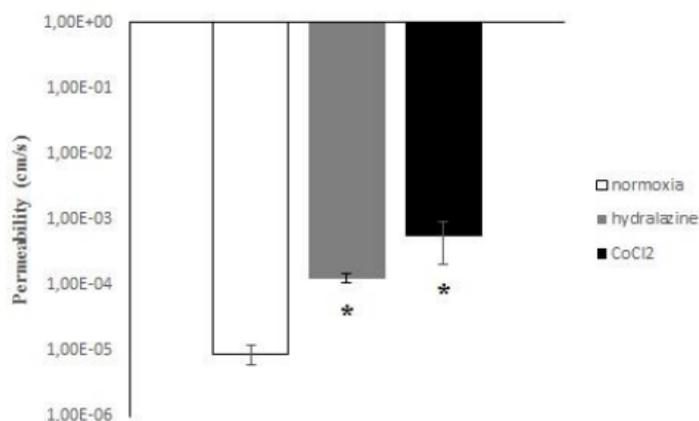
At the optimal TEER measurement (D6 established at the laboratory), cells were incubated 24 h with either CoCl<sub>2</sub> or hydralazine. Figure 4 shows the impact of addition of these molecules on TEER in an *in vitro* BBB model. A decrease in TEER was observed after 24 h for each molecule. For CoCl<sub>2</sub>, TEER significantly decreased by 58.5%. TEER values varied from  $81.95 \pm 2.29$  to  $34.01 \pm 3.55 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ( $p = 0.034$ ). For hydralazine, TEER significantly decreased by 68.2%. TEER values varied from  $80.33 \pm 4.86$  to  $32.01 \pm 4.21 \Omega \cdot \text{cm}^2$  ( $p = 0.03$ ).



**Figure 4: TEER measurement after cells of the blood-brain barrier model were treated with 100  $\mu$ M hydralazine or CoCl<sub>2</sub> during 24 h. Results are presented as mean value  $\pm$  s.e.m (n=3). \* P < 0.05 normoxia vs. treatment.**

❖ On membrane permeability

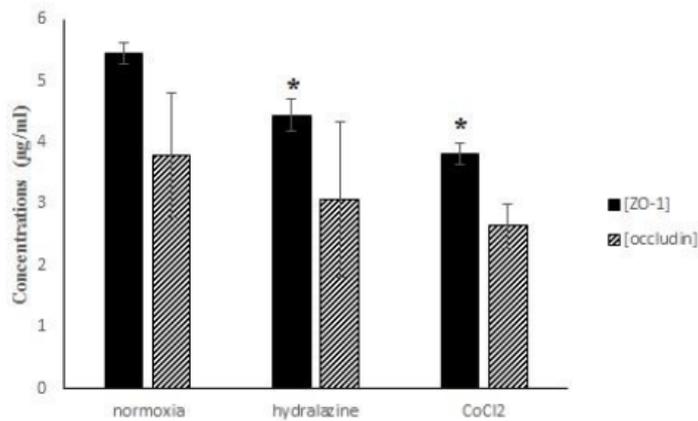
Absolute membrane permeability was determined after 24-h incubation with hydralazine or CoCl<sub>2</sub>, and results are illustrated by Figure 5. Coefficient permeability of Na-F in the BBB model significantly increased from  $6.06 \pm 0.6 \times 10^{-6}$  to  $5.66 \pm 0.36 \times 10^{-4}$  cm.s<sup>-1</sup> for CoCl<sub>2</sub> (p = 0.029). Cells of the BBB model treated with hydralazine showed a significant increase in Na-F permeability (p = 0.035). The permeability coefficient of Na-F varied from  $9.09 \pm 0.1 \times 10^{-6}$  to  $1.27 \pm 0.2 \times 10^{-6}$  cm.s<sup>-1</sup>. There was no significant difference between the two exposures.



**Figure 5: Absolute membrane permeability measurement during 24 h of hydralazine or CoCl<sub>2</sub> exposure versus normoxia. The membrane permeability of sodium fluorescein is expressed in log 10 in cm.s<sup>-1</sup> in order to have a homogenous scale. Results are presented as mean value ± s.e.m (n=3). \* P < 0.05 normoxia vs. treatment.**

❖ On paracellular transport mediated TJ proteins occludin and ZO-1

Determination of occludin and ZO-1 expressions in our *in vitro* BBB model were established after treatment with hydralazine or CoCl<sub>2</sub> (Figure 6). Expression of ZO-1 significantly decreased after treatment with hydralazine or CoCl<sub>2</sub> (p = 0.028 and p = 0.024, respectively). Expression of ZO-1 decreased by 19% with hydralazine and by 30% with CoCl<sub>2</sub>. However, there was no significant difference for occludin's expression with these two molecules. The concentration of occludin varied from 3.78 to 3.07 ± 1.26 µg/ml with hydralazine and from 3.78 to 2.64 ± 0.37 µg/ml with CoCl<sub>2</sub>. There was no significant difference between hydralazine and CoCl<sub>2</sub>.



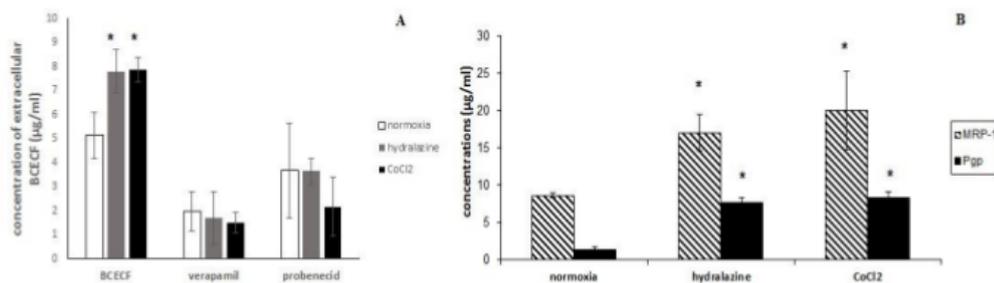
**Figure 6: Concentrations of ZO-1 and occludin after cells of the blood-brain barrier model were treated with 100 µM hydralazine or CoCl<sub>2</sub>. Results are presented as mean value ± s.e.m (n=3). \* P < 0.05 normoxia vs. treatment.**

❖ On transendothelial transport mediated efflux transporters

Transendothelial transport in our model was evaluated with two efflux transporter pumps, Pgp and MRP-1. It was evaluated by studying the transport of a substrate of Pgp and MRP-1, *i.e.*, BCECF-AM, with a method developed in our laboratory[25]. BCECF-AM is cleaved by intracellular esterase into a fluorescent component BCECF. In a previous work, we demonstrated that pumps were more active on apical membranes of endothelial cells (transport A to B), since BCECF was more efflux[19]. So we investigated if the transport of BCECF from A to B was changed after hydralazine or CoCl<sub>2</sub> exposure (Figure 7A). We noticed that efflux transporters prevented entry of BCECF in cells, since an important transendothelial transport was observed after each exposure. A significant increase of extracellular BCECF was also observed after hydralazine exposure:  $5.13 \pm 0.97$  µg/ml versus  $7.80 \pm 0.88$  µg/ml ( $p = 0.039$ ) together with CoCl<sub>2</sub>, where extracellular BCECF varied from  $5.13 \pm 0.97$  µg/ml to  $7.88 \pm 0.51$  µg/ml ( $p = 0.034$ ). In parallel, we observed no significant

difference between the two agents. The relative importance between Pgp and MRP-1 was evaluated with two specific inhibitors of Pgp and MRP-1, *i.e.*, verapamil and probenecid, respectively. We observed no significant difference between the two transporters.

In a second time, we studied the expression of Pgp and MRP-1 proteins in our *in vitro* BBB model after treatment with hydralazine or CoCl<sub>2</sub>, in order to understand the increase in the pump's observed activity (Figure 7B). MRP-1 expression significantly increased after incubation with each molecule. For hydralazine MRP-1 increased by 98% (p = 0.017) and by 132% (p=0.015) for CoCl<sub>2</sub>. There was no significant difference between hydralazine and CoCl<sub>2</sub> (p = 0.056). Pgp expression significantly increased by 475% (p=0.015) and 532% (p=0.016) for hydralazine and CoCl<sub>2</sub>, respectively. There was no significant difference between hydralazine and CoCl<sub>2</sub> (p=0.065).



**Figure 7: (A) Release of BCECF during transport on apical membranes of endothelial cells, after treatment with hydralazine or CoCl<sub>2</sub>. (B) Concentrations of MRP-1 and Pgp after cells of the blood-brain barrier model were treated with 100 µM hydralazine or CoCl<sub>2</sub> during 24 h. Results are presented as mean value ± s.e.m (n=3). # P < 0.05 BCECF vs. inhibitors and\* P < 0.05 normoxia vs. treatment.**

This study on transendothelial transport mediated efflux transporters showed that the functionality of Pgp and MRP-1 increased after hypoxic stress, which can be explained by an overexpression of Pgp and MRP-1 proteins.

## ***Discussion***

The BBB is a fundamental structure for the CNS because it confers a protection for the brain. This protection is mainly ensured by TJ proteins and efflux transporter proteins[26]. On the one hand, TJ proteins create a tightness barrier and reduce paracellular diffusion. On the other hand, efflux transporter proteins actively pump compounds out of endothelial cells to reduce the entry of potential cytotoxic substances. However, this BBB can be disrupted in some cases. Hypoxia is a key factor of the BBB's disruption involved in some neurological diseases. The cellular response to hypoxia is driven by the HIF-1 pathway[12]. Nevertheless, elucidation of cellular mechanisms induced by hypoxic stress is rather difficult with physical hypoxia because HIF-1 $\alpha$  has a short half-life, is rapidly reverted and thus less reproducible. In this regard, we present in this study a suitable method of hypoxic stress induction via mimetic agents of the hypoxia pathway. We decided to compare the capacity of a potential mimetic agent, hydralazine, with the classical agent used in the literature, CoCl<sub>2</sub>[14,27], to determine the suitable mimetic agent for the study of hypoxic stress on the BBB. This induction method was set up to understand cellular mechanisms involved by hypoxic stress on an original *in vitro* BBB model. We exposed our model to hydralazine or CoCl<sub>2</sub> during 24 h to study the effect of hypoxic stress on the BBB to mimic prolonged cerebral hypoperfusion, like in inschemic stroke. In a first step, we demonstrated that these two molecules were able to induce a hypoxic state on our cells since we observed an increase of HIF-1 $\alpha$  protein expression. We found that hydralazine or CoCl<sub>2</sub>, induced an overexpression of HIF-1 $\alpha$  after 24 h at 100  $\mu$ M (Figure 3). This has also been confirmed by other researchers using these agents[14,15,17]. Moreover, we observed the same result for HIF-1 expression after 24-h exposure to physical hypoxia (data not shown). So we decided to use this concentration to investigate the consequences of hypoxic stress on our *in vitro* BBB model. Our results showed

that hypoxic stress, induced by hydralazine or  $\text{CoCl}_2$ , significantly decreased TEER value (Figure 4) and significantly increased membrane permeability to Na-F (Figure 5). Taken together, these results demonstrated that the BBB lost its physical barrier properties after hypoxic stress since ionic compounds (measured by TEER value) and molecules (measured by Na-F) could cross cell membranes. To understand this loss, we investigated the expression of TJ proteins since they are in charge of these physical barrier properties. Hypoxic stress significantly decreased ZO-1 but not occludin expression (Figure 6). This result confirmed those obtained by Engelhard et al with a  $\text{CoCl}_2$  and physical hypoxia approach[12]. This suggested that HIF-1 $\alpha$  signalling impacts ZO-1 localization but has no effect on occludin localization. This must be explained by the fact that ZO-1 has an important role in the development and barrier maintenance of the BBB[28]. Moreover, animal experiments (knockdown for occludin) showed that occludin was not essential for the establishment of TJ complexes, despite the fact that a loss of this protein was involved in many diseases. Occludin would participate in the regulation of the BBB and more particularly in the regulation of calcium flux through the BBB[29]. Then we investigated the impact of hypoxic stress on efflux transporters as they conferred a protection for the brain by rejecting potential dangerous compounds. We investigated the impact of hypoxic stress on this apical transport (Figure 7A). Indeed, we showed that endothelial cells, of our *in vitro* BBB model, released more BCECF, with hydralazine or  $\text{CoCl}_2$ , than cells exposed to controls. This increase demonstrated that Pgp and MRP-1 were significantly active since they rejected more BCECF during hypoxic stress; but we noticed no significant difference between the two pumps. This result was shown in tumours cells which are rather hypoxic cells. In these cells, HIF-1 $\alpha$  was overexpressed and was associated with an increase of Pgp and MRP-1 activity, which explained a chemoresistance for these cells[30]. Moreover, this result confirmed those obtained by physical hypoxia[19]. Finally, we showed that this increase in activity was linked to an

overexpression of Pgp and MRP-1 proteins after hypoxic stress (Figure 7B). Taken together, these results demonstrated that cells established a defence mechanism to protect the brain from hypoxic stress, but it would create a resistance to therapy, as it has been described for anti-epileptic drugs and chemotherapy[31]. This should be taken into consideration during the development of therapeutics.

To conclude, this study was undertaken to define a suitable mimetic hypoxia agent in order to investigate and understand cellular and molecular impacts of hypoxic stress on the BBB. Our results presented hydralazine as a suitable candidate to create a hypoxic state in our *in vitro* BBB model, since it was able to induce HIF-1 $\alpha$  without any cytotoxic effect. This result is in line with those described in the literature[17,19]. CoCl<sub>2</sub> could be a useful tool to create a hypoxic state, but Figure 2 shows that 100  $\mu$ M was the IC<sub>50</sub> for bEnd.3, meaning that at this concentration there were 50% dead cells and at a lower concentration there was no induction of HIF-1 $\alpha$ . Cervellati et al explained that this decrease of viability in cells induced by CoCl<sub>2</sub> must be due to activation of caspase-3, which leads to apoptosis[15]. This decrease of viability in cells could be a problem because we could not determine whether the observed effect was due to the inhibition of the PHD induced by CoCl<sub>2</sub> or its cytotoxicity. Hypoxic stress induced by hydralazine showed rather similar results to those obtained by physical hypoxia[12,19,31]. Hence induction of hypoxic stress by hydralazine is a suitable mimetic agent of hypoxia to understand the early stages of the consequences of hypoxic stress on the BBB. This induction method has many advantages on physical hypoxia because hypoxic stress is standardization controlled, easy to produce, reproducible and reversible. It is also less expensive. We are confident that this induction method by hydralazine will allow the understanding of cellular and molecular mechanisms activated at the BBB during hypoxic events.

### ***Declaration of conflicting interests***

The authors declare no conflict of interest.

### ***Funding***

This work was supported by grants from Jean Monnet University of Saint-Etienne.

### ***References***

- 1 Hawkins BT, Davis TP: The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005 Jun;57:173–185.
- 2 Daneman R, Prat A: The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015 Jan;7:a020412.
- 3 Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud P-O, Deli MA, et al.: In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2016 Feb 11; DOI: 10.1177/0271678X16630991
- 4 Kido Y, Tamai I, Nakanishi T, Kagami T, Hirosawa I, Sai Y, et al.: Evaluation of blood-brain barrier transporters by co-culture of brain capillary endothelial cells with astrocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2002;17:34–41.
- 5 Cioni C, Turlizzi E, Zanelli U, Oliveri G, Annunziata P: Expression of Tight Junction and Drug Efflux Transporter Proteins in an in vitro Model of Human Blood-Brain Barrier. *Front Psychiatry* 2012;3:47.
- 6 Brown RC, Davis TP: Hypoxia/aglycemia alters expression of occludin and actin in brain endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 Feb 25;327:1114–1123.
- 7 Al Ahmad A, Taboada CB, Gassmann M, Ogunshola OO: Astrocytes and pericytes differentially modulate blood-brain barrier characteristics during development and hypoxic insult. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2011 Feb;31:693–705.
- 8 Dehouck MP, Méresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R: An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 1990 May;54:1798–1801.

- 9 Ogunshola OO, Al-Ahmad A: HIF-1 at the blood-brain barrier: a mediator of permeability? *High Alt Med Biol* 2012 Sep;13:153–161.
- 10 Keller A: Breaking and building the wall: the biology of the blood-brain barrier in health and disease. *Swiss Med Wkly* 2013;143:w13892.
- 11 Fandrey J, Gassmann M: Oxygen sensing and the activation of the hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)--invited article. *Adv Exp Med Biol* 2009;648:197–206.
- 12 Engelhardt S, Al-Ahmad AJ, Gassmann M, Ogunshola OO: Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dependent mechanism. *J Cell Physiol* 2014 Aug;229:1096–1105.
- 13 Yang S-J, Pyen J, Lee I, Lee H, Kim Y, Kim T: Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation in rat C6 glioma cells. *J Biochem Mol Biol* 2004 Jul 31;37:480–486.
- 14 Wang Y, Tang Z, Xue R, Singh GK, Liu W, Lv Y, et al.: Differential response to CoCl<sub>2</sub>-stimulated hypoxia on HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and MMP-2 expression in ligament cells. *Mol Cell Biochem* 2012 Jan;360:235–242.
- 15 Cervellati F, Cervellati C, Romani A, Cremonini E, Sticozzi C, Belmonte G, et al.: Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells. *Free Radic Res* 2014 Mar;48:303–312.
- 16 Rodrigues SF, de Oliveira MA, dos Santos RA, Soares AG, de Cássia Tostes R, Carvalho MHC, et al.: Hydralazine reduces leukocyte migration through different mechanisms in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Eur J Pharmacol* 2008 Jul 28;589:206–214.
- 17 Knowles HJ, Tian Y-M, Mole DR, Harris AL: Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ Res* 2004 Jul 23;95:162–169.
- 18 Horsman MR, Nordmark M, Høyer M, Overgaard J: Direct evidence that hydralazine can induce hypoxia in both transplanted and spontaneous murine tumours. *Br J Cancer* 1995 Dec;72:1474–1478.
- 19 Chatard M, Puech C, Roche F, Perek N: Hypoxic Stress Induced by Hydralazine Leads to a Loss of Blood-Brain Barrier Integrity and an Increase in Efflux Transporter Activity. *PLoS One* 2016;11:e0158010.
- 20 Hayashi K, Nakao S, Nakaoka R, Nakagawa S, Kitagawa N, Niwa M: Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept* 2004 Dec 15;123:77–83.
- 21 Eigenmann DE, Xue G, Kim KS, Moses AV, Hamburger M, Oufir M: Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. *Fluids Barriers CNS* 2013;10:33.

- 22 Brown RC, Mark KS, Egleton RD, Huber JD, Burroughs AR, Davis TP: Protection against hypoxia-induced increase in blood-brain barrier permeability: role of tight junction proteins and NFkappaB. *J Cell Sci* 2003 Feb 15;116:693–700.
- 23 Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M: Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 2005 Feb;25:59–127.
- 24 Perek N, Le Jeune N, Denoyer D, Dubois F: MRP-1 protein expression and glutathione content of in vitro tumor cell lines derived from human glioma carcinoma U-87-MG do not interact with <sup>99m</sup>Tc-glucarate uptake. *Cancer Biother Radiopharm* 2005 Aug;20:391–400.
- 25 Perek N, Denoyer D, Dubois F, Koumanov F: Malignant gliomas display altered plasma membrane potential and pH regulation--interaction with Tc-<sup>99m</sup>-MIB1 and Tc-<sup>99m</sup>-Tetrofosmin uptakes. *Gen Physiol Biophys* 2002 Dec;21:381–404.
- 26 Berezowski V, Landry C, Dehouck M-P, Cecchelli R, Fenart L: Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res* 2004 Aug 20;1018:1–9.
- 27 Wang G, Hazra TK, Mitra S, Lee HM, Englander EW: Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl<sub>2</sub> in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic Acids Res* 2000 May 15;28:2135–2140.
- 28 Katsuno T, Umeda K, Matsui T, Hata M, Tamura A, Itoh M, et al.: Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol Biol Cell* 2008 Jun;19:2465–2475.
- 29 Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, et al.: Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000 Dec;11:4131–4142.
- 30 Chen Z-S, Lee K, Walther S, Raftogianis RB, Kuwano M, Zeng H, et al.: Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res* 2002 Jun 1;62:3144–3150.
- 31 Xiao-Dong L, Zhi-Hong Y, Hui-Wen Y: Repetitive/temporal hypoxia increased P-glycoprotein expression in cultured rat brain microvascular endothelial cells in vitro. *Neurosci Lett* 2008 Feb 27;432:184–187.

# Chapitre 4: Impact de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de la BHE

L'hypoxie est un facteur clé dans certaines pathologies neurologiques car la BHE, qui est la barrière de protection du cerveau, est sensible à des changements du taux d'oxygène. En effet, des études ont montré qu'une hypoxie aiguë ou soutenue induisait un changement au sein de la BHE, entraînant l'entrée de molécules toxiques dans le tissu cérébral (Mark and Davis, 2002; Schoch *et al.*, 2002). Ce changement est provoqué par une diminution de l'expression et un réarrangement des protéines de jonctions serrées au sein des cellules endothéliales (Al Ahmad *et al.*, 2011; Engelhardt *et al.*, 2014).

Cependant, certaines pathologies sont associées à une hypoxie intermittente comme le syndrome d'apnées du sommeil par exemple. Les conséquences cérébrales de cette hypoxie intermittente sont bien moins décrites que celles d'une hypoxie aiguë. Des études, menées chez la souris, ont montré une altération de la fonction endothéliale cérébrale après une exposition à une hypoxie intermittente (Phillips *et al.*, 2004). Toutefois les mécanismes, induits par une hypoxie intermittente, entraînant cette altération restent inconnus. Dans leur revue de la littérature, Lim and Pack font l'hypothèse que l'hypoxie intermittente induirait un changement au sein de la BHE (Lim and Pack, 2014). En effet, l'hypoxie intermittente pourrait altérer la fonction des cellules endothéliales cérébrales par activation de la voie HIF-1, mais les mécanismes précis sur la BHE restent pour ces auteurs à décrire.

Dans cette étude, nous avons évalué les conséquences de stress hypoxiques répétés sur un modèle *in vitro* de BHE afin de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par ce type d'hypoxie.

Les objectifs de ce travail ont été:

- de mettre en place une méthode d'induction de stress hypoxiques répétés, reproductibles, par l'hydralazine
- d'étudier l'impact de ces stress répétés sur notre modèle *in vitro* de BHE

## 1. Résultats

Dans notre première étude, nous avons démontré que l'hydralazine induisait un état cellulaire hypoxique après 2 heures d'exposition. La première étape de ce travail a été de déterminer le temps nécessaire à nos cellules pour retrouver un état physiologique (niveau fondamental de HIF-1 $\alpha$ ), afin de pouvoir induire un second stress hypoxique. L'étude de l'expression de HIF-1 $\alpha$  a révélé que **les cellules retrouvaient un niveau fondamental, similaire à celui de nos contrôles, 8 heures après l'exposition à l'hydralazine (Figure 1)**. Pour la suite de l'étude, nous avons décidé d'induire un stress hypoxique de 2 heures avec l'hydralazine, suivi d'un intervalle de 8 heures durant lequel les cellules sont incubées seulement avec du milieu pour retrouver un statut physiologique. Puis un second stress hypoxique induit. Ceci est répété sur 24 heures, ce qui correspond à un cycle cellulaire.

La deuxième partie de l'étude a consisté à évaluer l'intégrité de notre modèle *in vitro* de BHE après des stress hypoxiques répétés. Les premiers résultats montrent **une perte d'étanchéité de notre modèle**. En effet, la TEER diminue de 27 à 30 % entre le premier stress hypoxique et le dernier (**Figure 2**), tandis que la perméabilité au sodium fluorescéine augmente à chaque stress hypoxique (**Figure 3**). Cette augmentation de perméabilité est associée à une **diminution de l'expression** de deux protéines de jonctions serrées que sont **ZO-1 et claudine-5 (Figure 4)**. En effet, une diminution d'expression de ZO-1 de 73% est observée après le dernier stress hypoxique, tandis que l'expression de claudine-5 diminue de 75% à ce même temps. Ces résultats ont été confirmés par imagerie confocale (**Figures 5a et 5b**). En effet, le marquage de ZO-1 n'est plus continu à la membrane des cellules alors que celui de claudine-5 est moins intense au cours des stress hypoxiques. De plus, il est observé que les cellules perdent leur forme après une exposition répétée à l'hypoxie confirmant une perte de jonctions serrées à la membrane.

Enfin dans un dernier temps, nous avons évalué l'expression et la fonctionnalité des transporteurs d'efflux puisque ces derniers participent activement à la protection du cerveau en rejetant les substances potentiellement toxiques pour les neurones et les cellules de soutien. L'étude de la fonctionnalité de Pgp et MRP-1 révèlent que les cellules endothéliales augmentent

progressivement l'activité de leurs pompes d'efflux, après une exposition répétée à l'hypoxie (**Figure 6A**). Ces résultats ont été complétés par une évaluation de l'expression de Pgp et MRP-1. Les résultats montrent que l'expression de ces transporteurs augmente de façon progressive après chaque stress hypoxique (**Figure 6B**). En effet, une augmentation de 55% et de 78% est observée dès le deuxième stress hypoxique pour Pgp et MRP-1, respectivement. **L'étude du transport transendothélial, des transporteurs d'efflux, a donc révélé une augmentation progressive de l'activité de Pgp et MRP-1 qui est expliquée par une surexpression de ces protéines à la membrane des cellules endothéliales.**

## **2. Discussion**

La BHE est une structure essentielle au bon fonctionnement du cerveau, en raison de son rôle dans le maintien de l'homéostasie cérébrale. Cette barrière est altérée lors de condition hypoxique, en raison de sa sensibilité à la diminution de la pression partielle en oxygène (Keller, 2013). En effet, cette altération serait due à un changement au sein des complexes protéiques des jonctions serrées (Zehendner *et al.*, 2013). Toutefois, certaines pathologies sont associées à une hypoxie intermittente répétée, comme le syndrome d'apnées du sommeil. Les conséquences de ce type d'hypoxie sur le cerveau, et plus particulièrement sur la BHE, sont peu connues. Dans leur revue Lim and Pack émettent l'hypothèse qu'une hypoxie intermittente activerait la voie HIF-1, qui conduirait à l'altération de la BHE (Lim and Pack, 2014). De ce fait, l'objectif de cette étude a consisté à mettre en place une méthode d'induction de stress hypoxiques répétés adéquate afin d'étudier les mécanismes cellulaires impliqués sur notre modèle *in vitro* de BHE.

### **2.1. Induction de stress hypoxiques répétés par l'hydralazine**

L'étude de l'expression de HIF-1 $\alpha$  après 2 heures d'exposition avec l'hydralazine, temps précédemment déterminé pour induire un environnement cellulaire hypoxique (Chatard *et al.*, 2016), révèle que les cellules retrouvent un niveau fondamental de HIF-1 $\alpha$ , et donc un statut normoxique, 8 heures après le stress hypoxique. Le but était de déterminer le temps nécessaire à nos cellules pour revenir à un état normoxique, afin d'induire un second stress et étudier l'impact de stress hypoxiques répétés sur la BHE. **Cette méthode d'induction avec l'hydralazine, permet de contrôler les stress hypoxiques, d'avoir un phénomène réversible**

qui est plus ou moins long, mais surtout d'obtenir des hypoxies répétées qui sont reproductibles.

## 2.2. Des stress hypoxiques répétés conduisent à des changements progressifs au sein de la BHE

Peu d'études dans la littérature s'intéressent aux conséquences d'une hypoxie intermittente sur la BHE. Les auteurs d'une étude *in vivo* avaient émis l'hypothèse que la perméabilité de cette barrière serait altérée chez un modèle murin mimant des apnées du sommeil (Kim *et al.*, 2015). Toutefois, ils n'ont observé aucun changement de perméabilité. Une de leurs hypothèses était qu'ils avaient sousestimé les effets locaux au sein de la BHE en utilisant le bleu Evans qui est un traceur permettant une approche plus globale de la perméabilité de la BHE. Les modèles *in vitro* de BHE s'avèrent être des outils adéquats pour vérifier cette hypothèse. Toutefois, **aucune étude à ce jour ne s'était intéressée à l'impact cellulaire d'une hypoxie intermittente sur l'intégrité de la BHE.**

Dans notre étude, nous avons démontré des changements au sein de notre modèle cellulaire de BHE après des expositions répétées à l'hypoxie. En effet, une diminution de la TEER et une augmentation de la perméabilité, de plus en plus importante, montrent que **notre barrière perd son intégrité durant ces épisodes hypoxiques.** Cette perte d'intégrité est liée à une diminution progressive d'expressions de ZO-1 et de claudine-5, protéines essentielles au maintien des propriétés de barrière de la BHE. Toutefois, l'occludine n'est pas impactée par ces stress hypoxiques répétés, et confirment donc que cette protéine n'est pas essentielle dans la mise en place fonctionnelle de ces complexes de jonctions serrées (Saitou *et al.*, 2000; Chatard *et al.*, 2016).

**Le transport transendothélial par les protéines d'efflux est également modifié au cours de ces épisodes d'hypoxies répétées.** En effet, nos résultats montrent que les activités de Pgp et de MRP-1 sont progressivement augmentées lors de ces épisodes. Ce qui confirme ceux obtenus par Xiao-Dong lors d'une étude sur l'épilepsie (Xiao-Dong *et al.*, 2008). Cette augmentation d'activité s'explique par le fait qu'au cours de ces épisodes d'hypoxies répétées les expressions de Pgp et MRP-1 sont augmentées. Ainsi, les cellules endothéliales mettent

progressivement en place un mécanisme de défense afin de pallier à la perte d'étanchéité de la barrière.

**Notre étude est la première à s'intéresser à l'impact cellulaire et moléculaire de stress hypoxies répétés (modélisation d'une hypoxie intermittente) sur la BHE. Nos résultats montrent que ces stress répétés entraînent un changement progressif au sein de la BHE, illustré par une altération des protéines de jonctions serrées entraînant une perte d'intégrité, et une augmentation d'activité des pompes d'efflux (mécanisme de défense). Cette augmentation d'activité pourrait créer une résistance au passage cérébral de certains médicaments.**

**Notre méthode d'induction de stress hypoxiques répétés induits par l'hydralazine, permet d'obtenir des stress hypoxiques qui sont contrôlés, réversibles et surtout reproductibles. Toutefois, l'induction d'hypoxie est plutôt longue (2 heures) et ne permet donc pas de réaliser des cycles courts qui correspondraient davantage à une hypoxie intermittente caractéristique des pathologies telle que le syndrome d'apnée du sommeil. Cependant, cette méthode nous permet d'apporter des premiers éléments de réponses sur l'impact de ces stress sur la BHE.**

*Cette étude a fait l'objet d'un article qui a été soumis dans la revue Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.*

**Blood-brain barrier cells progressively lose tight junction protein expression after repetitive hypoxic stress and set up defense mechanisms by increasing ABC transporter activities**

**Morgane Chatard<sup>1,2\*</sup>, Sabine Palle<sup>3</sup>, Frédéric Roche<sup>1#</sup> and Nathalie Perek<sup>2#</sup>**

<sup>1</sup>University of Lyon, UJM-Saint-Etienne, SNA-EPIS, EA4607, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>2</sup>University of Lyon, UJM-Saint-Etienne, INSERM, SAINBIOSE U1059 Team DVH, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>3</sup>University of Lyon, UJM-Saint-Etienne, 4D Multiphotonic Confocal Microscopy Platform, Laboratoire Hubert Curien, UMR CNRS 5516, F-42023, Saint-Etienne, France

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

\*Corresponding author: Morgane Chatard, SNA-EPIS EA4607, Campus Santé Innovation 10, rue de la Marandière BP80019, 42270 Saint Priest en Jarez (France). Tel: (33)4.77.42.14.52; e-mail address: [morgane.chatard@univ-st-etienne.fr](mailto:morgane.chatard@univ-st-etienne.fr)

This work was supported by grants from Jean Monnet University of Saint-Etienne.

Running headed: repeated hypoxia lead to a blood-brain barrier breakdown

## **Abstract**

Hypoxia is a key factor in some neurological diseases such as stroke and some studies have shown that sustained hypoxia leads to a breakdown of the blood-brain barrier (BBB). Nevertheless, several diseases are related to intermittent hypoxia, e.g., epilepsy or sleep apnea syndrome. Consequences of intermittent hypoxia on the brain are less recognized. In this study, we proposed an *in vitro* method for inducing reproducible repetitive hypoxic stress to study its impact on the BBB's integrity. For this, we induced repeated hypoxic stress with hydralazine (an inhibitor of the prolylhydroxylase domain) during 24 h, which corresponds to a cell cycle. Then we investigated its impact on an *in vitro* BBB model on paracellular and transendothelial pathways. Our results demonstrated that the BBB lost its physical barrier properties after exposition to repeated hypoxic stress. The increase of BBB permeability is due to a decrease of tight junction proteins. In contrast, cells increased the expression and activity of their efflux transporters in order to try fighting against the entry of potential cytotoxic compounds.

**Key words** : Barrier integrity, BBB model, hydralazine, repeated hypoxia

## **Introduction**

Hypoxia is a key factor in some neurological diseases which lead to a breakdown of the blood-brain barrier (BBB), such as cerebral ischemia. Indeed, the brain is the first consumer of oxygen, using 20% of the arterial supply<sup>1</sup>. In addition, the BBB is a structure highly sensitive to hypoxic conditions<sup>2</sup>. Several studies have investigated the consequences of acute hypoxia (mimicking transient brain ischemia or stroke) on the BBB<sup>1,3-5</sup>. All these studies led to the conclusion that hypoxia alters the BBB by inducing a loss of expression of tight junction (TJ) proteins, which is illustrated by an increase in permeability. Nevertheless, if the consequences of acute and sustained hypoxia on the BBB have been well described, this has not been the case with intermittent hypoxia. However, this phenomenon has been found in pathologies, particularly sleep related breathing disorders, such as sleep apnea syndrome. This intermittent hypoxia does not seem to be innocent on brain structure and function, since studies in humans have demonstrated that these patients suffer from cognitive disorders<sup>6,7</sup>. These results tended to show that neuronal homeostasis is affected and therefore suggested that the BBB could be impaired. Endothelial cells are the site of the BBB because they restrict and control the passage of molecules into the brain. These properties are provided by TJ proteins (paracellular pathway) and ABC efflux transporters (transendothelial pathway). Philipps et al observed in mice an impaired brain endothelial function after exposure to intermittent hypoxia<sup>8</sup>. However, the mechanism induced by intermittent hypoxia and leading to this alteration remains unknown. Lim and Pack hypothesized that intermittent hypoxia causes a change in the BBB's site<sup>9</sup>. They proposed that intermittent hypoxia could alter endothelial cell function by activation of the hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. The challenge is to have a better understanding of the mechanisms leading to this alteration in order to develop adequate therapeutic strategies. To this end, many *in vitro* models of the BBB have been developed to understand the function of this barrier in physiological and pathological conditions. In this present study, we had set up an *in vitro* method for inducing reproducible repetitive hypoxia to study the impact of intermittent hypoxia on the integrity of the BBB. Repeated hypoxic stresses were induced by hydralazine, an inhibitor of the prolyl hydroxylase domain (PHD), which has been validated in a previous work to create a cellular hypoxic environment<sup>10</sup>. Then we studied the impact of these repeated hypoxic stresses induced by hydralazine on a coculture in-contact BBB model. The impact of hypoxic stresses was studied on two pathways which are essential for the barrier's properties. Firstly, on the paracellular pathway allowed by TJ proteins which are essential for

the barrier's properties. Secondly, on the transcellular pathway by studying the ABC efflux transporters which confer a cellular protection by pumping compounds out of endothelial cells and setting up a defense mechanism. Our results showed that repeated hypoxic stress induced by hydralazine progressively altered the paracellular pathway by decreasing the expression of TJ proteins in our *in vitro* BBB model. Moreover, the transcellular pathway was also affected by these hypoxic stresses demonstrated by an increase of efflux protein activity.

## **Materials and Methods**

### Chemicals and reagents

Hydralazine, BCECF-AM, probenecid, verapamil, sodium fluorescein (Na-F) and secondary antibodies (Alexa Fluor 546) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) is also purchased from Sigma. Antibodies and reagents for the detection of HIF-1 $\alpha$  were products of R&D systems (Lille, France). All compounds for Ringer-Hepes buffer were purchased from Sigma.

Occludin and ZO-1 antibodies were purchased from Life Technologies (Saint Aubin, France), Pgp and MRP-1 antibodies were purchased from GeneTex (San Antonio, TX, USA) and Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA), respectively. Claudin-5 antibody was purchased from Abcam (Paris, France).

bEnd.3 cells and C6 cells were obtained from the ATCC (Manassas, VA, USA).

Cell culture inserts for 24-well (0.4  $\mu$ m pore diameter size, transparent PET membrane) were purchased from Corning distributors (Sigma). EVOM voltohmmeter system was purchased from World Precision Instruments (Hertfordshire, UK).

### Determination of repeated hypoxic stress induced by hydralazine

In a previous work we showed that hydralazine is a suitable way to induce hypoxic stress because it showed the same results as physical hypoxia<sup>10</sup>. We showed in this previous study

that hydralazine induced HIF-1 $\alpha$  (a key regulator of hypoxic response) after 2 h of incubation. In this present study we investigated the impact of repeated hypoxic stress on BBB integrity. To induce repeated hypoxic stress it has been necessary to determine the time for our cells to recover a basal level of HIF-1 $\alpha$  (a normoxic state) in order to induce another hypoxic stress. For this, cells were seeded into a 96-well plate at a density of 10 000 cells/well. Then cells were incubated with 100  $\mu$ M of hydralazine for 2 h (dose and time incubation established previously in laboratory<sup>10</sup>). We measured at 2-4-6-8-10-24 h the expression of HIF-1 $\alpha$  by cell-ELISA to establish the time when cells recovered a basal level of HIF-1 $\alpha$ . For that, cells were fixed to the support with 4% formaldehyde during 10 min at room temperature. Anti-HIF-1 $\alpha$  antibodies were added at 4°C overnight (diluted at 1/100). Then cells were incubated with secondary antibodies (diluted at 1/500) for 2 h at room temperature. Finally, fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer with 540 nm excitation and 600 nm emission wavelengths.

#### Establishment of an *in vitro* BBB model

The BBB model was composed of bEnd.3 cells (immortalized mouse brain endothelial cells) and C6 cells. All cells were used before passage number 30 (passages 8–26 for bEnd.3 cells and 7–28 for C6 cells), which corresponded to the time where these cells may begin to lose their BBB properties, as cited by the supplier and in a previous study<sup>11</sup>. Once the cells reached subconfluency, they were placed onto cell culture inserts for 24-well plates as described in a previous study<sup>10</sup>.

#### Transendothelial electrical resistance (TEER) measurements

To characterize the formation of a tight endothelial cell monolayer, TEER was recorded using an EVOM resistance meter. One electrode was placed on the luminal side and the other electrode on the abluminal side. These two electrodes were separated by the endothelial layer. The TEER measurements of blank filters (without cells) were subtracted from those of filters with cells. Then the resulting value was multiplied by the membrane area to obtain the TEER measurements in  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>.

Paracellular permeability measurements with sodium fluorescein

Endothelial paracellular barrier function was also evaluated by measuring the permeability of cells to Na-F (MW = 376 Da). First the medium was removed and cells were washed with prewarmed Ringer-Hepes buffer (5 mM Hepes, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM NaHCO<sub>3</sub> and 2.8 mM glucose). Then Ringer-Hepes buffer containing 10 µg/ml of Na-F was loaded onto the luminal side of the insert and incubated at 37°C for 1 h. Samples were removed from the abluminal chamber at 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min and immediately replaced with fresh Ringer-Hepes buffer. The concentration of Na-F was determined using a fluorescence multiwell plate reader (Ex (λ) 485 nm; Em (λ) 530 nm). Transendothelial permeability coefficient (Pe) was calculated as previously described by Deli et al<sup>12</sup>. The increment in cleared volume was calculated by dividing the amount of compound in the receiver compartment by the drug concentration in the donor compartment. The volume cleared was plotted versus time and the slope estimated by linear regression analysis. Then the average cleared volume was plotted versus time, and permeability x surface area product value for endothelial monolayer (PSe) was calculated as follows:

$$\frac{1}{P_{Sendothelial}} = \frac{1}{P_{Stotal}} - \frac{1}{P_{Sinsert}}$$

Where PS total corresponded to the experimental data and PS insert corresponded to the insert without endothelial cells (insert with only C6).

P<sub>Sendothelial</sub> divided by the surface area (A) in cm<sup>2</sup> (0.33cm<sup>2</sup> for a 24-transwell) generated the endothelial Pe (in 10<sup>-6</sup> cm.s<sup>-1</sup>) and calculated as follows:

$$Pe = \frac{P_{Sendothelial}}{A}$$

Whole cell-ELISA of efflux transporters (Pgp, MRP-1) and TJ proteins (ZO-1, occludin and claudin-5)

Cocultured cells were washed with PBS and fixed for 20 min at room temperature with 4% paraformaldehyde in PBS at pH 7.4. Then inserts were washed again and overlaid with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 30 min to block endogenous peroxidase, followed by 20% horse serum to block unspecific immunoglobulin binding. Cells were incubated 2 h with either monoclonal mouse anti-Pgp (2 µg/ml), polyclonal rabbit anti-MRP-1 (10 µg/ml), monoclonal polyclonal rabbit anti-ZO-1 (4 µg/ml), polyclonal rabbit anti-occludin (1 µg/ml) or polyclonal rabbit anti-claudin-5 (2 µg/ml) antibodies. Then cells were washed and peroxidase conjugated anti-mouse, anti-rat or anti-rabbit IgG was added as a secondary antibody for 2 h at room temperature (diluted at 1/500). After washing several times, 0.1% ophenylenediamine and 0.002% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0.05 M citrate buffer at pH 4.5 was added for 10 min at room temperature and in the dark. The color reaction was measured with a spectrophotometer at 490 nm.

#### Immunohistochemistry of ZO-1 in the *in vitro* BBB model

For immunohistochemical stainings, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature. Following fixation, cells were washed with PBS. Then Antibodies were diluted in 6% horse serum and 0.3% triton X-100 in PBS. Cells were incubated with polyclonal rabbit anti-ZO-1, diluted at 1/100 or polyclonal rabbit anti-claudin-5 diluted at 1/25, for 2 h at room temperature. Then cells were washed with PBS and incubated with secondary antibodies diluted at 1/500 (Alexa Fluor 546 or 555) for 90 min at room temperature. Finally, cells were washed with PBS, embedded in fluoromount and observed by confocal microscopy.

#### Drug transporter functionality assays

The functionality of Pgp and MRP-1 was tested by assessing the release of the substrate BCECF-AM (specific for Pgp and MRP-1) in the absence or presence of specific inhibitors such as verapamil for Pgp and probenecid for MRP-1. The cocultured cells were washed and cultured in DMEM. Then cells were preincubated for 15 min in the absence or presence of inhibitors at 37°C (40 µM verapamil and 1 mM probenecid, concentrations were determined previously<sup>13</sup>). Inhibitors were added in the luminal compartment to study the transport from the luminal to the abluminal side. The inserts were incubated with 1 mM of BCECF-AM for 1 h at 37°C. Finally, fluorescence was measured with a fluorescence spectrophotometer at 493 nm excitation and 515 nm emission wavelengths.

### Statistical analysis

The values are expressed as the means  $\pm$  s.e.m. One-way and two-way analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey-Kramer's tests were applied to multiple comparisons. Statistical analysis was performed using Statview software. The differences between means were considered to be significant when P values were less than 0.05.

### **Results**

#### Time of repeated hypoxic stress induced by hydralazine

Hydralazine is a chemical agent which mimics a hypoxic environment in cells since it inhibits PHD that negatively regulates HIF-1. We determined the time necessary to recover a fundamental level of HIF-1 $\alpha$  in order to induce another hypoxic stress. For that, bEnd.3 cells were exposed to 100  $\mu$ M of hydralazine for 2 h (time and concentration previously determined to induce HIF-1 $\alpha$  overexpression<sup>10</sup>). Then we measured the expression of HIF-1 $\alpha$  at 2-4-6-8-10 and 24 h after incubation with hydralazine. Figure 1 shows that bEnd.3 cells significantly overexpressed HIF-1 $\alpha$  after 2 h exposure to hydralazine. HIF-1 $\alpha$  expression significantly decreased in bEnd.3 cells 8 h after the hypoxic stress. At this time the cells recovered a level of HIF-1 $\alpha$  similar to the fundamental level expressed prior to exposition to hydralazine. So we decided to induce a hypoxic stress during 2 h with 100  $\mu$ M of hydralazine and repeated this stress 8 h afterward. These cycles (hypoxic stress and normoxia conditions) were repeated during 24 h, which corresponded to a cell cycle.

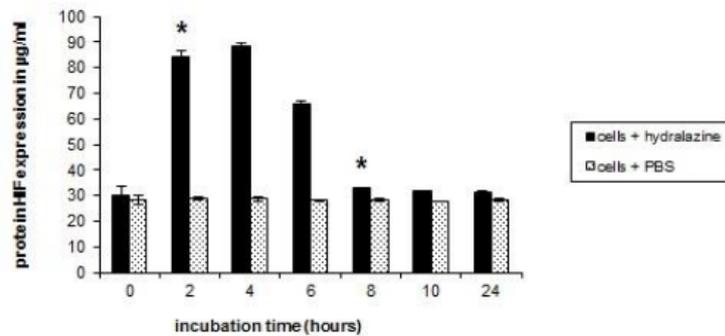
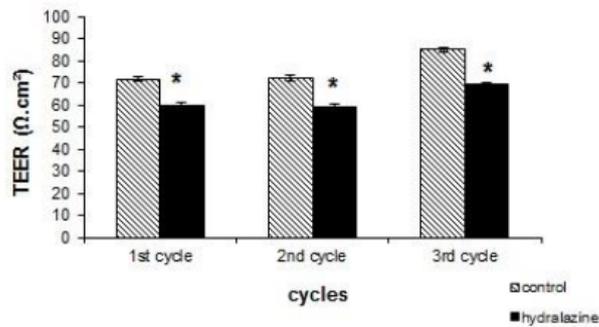


Figure 1 : HIF-1 $\alpha$  expression level after 2 h exposition with hydalazine. bEnd.3 cells were exposed to 100  $\mu$ M hydalazine during 2 h, then medium was replaced and HIF-1 $\alpha$  expression was measured. Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m (n = 8). \* p < 0.05 control versus hydalazine.

#### Effect of repeated hypoxic stress on an *in vitro* BBB model

- TEER measurements

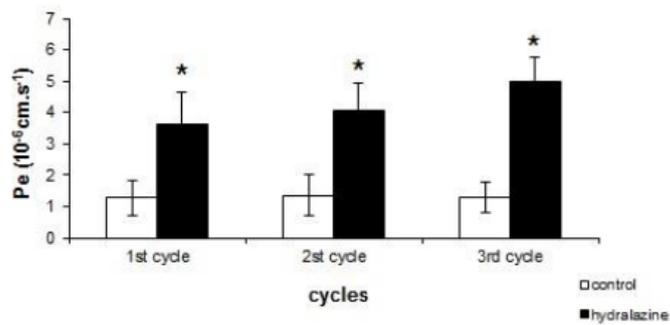
At the optimal TEER measurement (day 6 established at the laboratory), cells were exposed to repeated hypoxic stress induced by hydalazine. Figure 2 shows that this repeated hypoxic stress had an impact on TEER in our *in vitro* BBB model. Indeed, a significant decrease in TEER was observed after each hypoxic stress. TEER values significantly decreased by 27% after the 1st hypoxic stress. TEER values varied from  $81.5 \pm 1.1$  to  $59.4 \pm 1.5 \Omega.cm^2$ . After the 2nd hypoxic stress TEER values varied from  $82.2 \pm 1.2$  to  $58.8 \pm 1.4 \Omega.cm^2$ . Finally, TEER significantly decreased by 30% after the 3rd cycle. Indeed, TEER values varied from  $85 \pm 1.1$  to  $59 \pm 1.2 \Omega.cm^2$ .



**Figure 2 : Transendothelial electrical resistance (TEER) measurements in *an in vitro* blood-brain barrier model after cells were exposed to repeated hypoxic stress induced by hydralazine. Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m (n = 6). \* p < 0.05 control versus hydralazine.**

- Membrane permeability

Absolute membrane permeability was measured after each hypoxic stress induced by hydralazine, and results are shown in Figure 3. After the 1st hypoxic stress, Pe of Na-F in our *in vitro* BBB model significantly increased from  $1.27 \pm 0.58 \times 10^{-6}$  to  $3.64 \pm 0.99 \times 10^{-6}$  cm.s<sup>-1</sup>. Pe of Na-F significantly varied from  $1.35 \pm 0.65 \times 10^{-6}$  to  $4.04 \pm 0.87 \times 10^{-6}$  cm.s<sup>-1</sup> after the 2nd hypoxic stress. After the 3rd hypoxic stress, this Pe significantly increased from  $1.29 \pm 0.48 \times 10^{-6}$  to  $4.97 \pm 0.79 \times 10^{-6}$  cm.s<sup>-1</sup>.



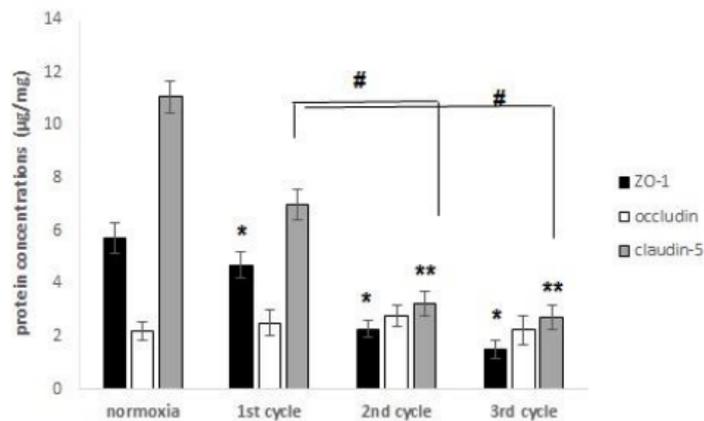
**Figure 3 : Absolute membrane permeability measurement after each hypoxic stress induced by hydralazine. Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m (n = 6). \* p < 0.05 control versus hydralazine. Pe: permeability coefficient.**

- Paracellular transport

Determination of three TJ protein expressions (ZO-1, occludin and claudin-5) in our *in vitro* BBB model was established after repeated hypoxic stress (Figure 4). ZO-1 expression progressively decreased after each hypoxic stress. After the 1st hypoxic stress ZO-1 expression significantly decreased by 18%, by 60% after the 2nd hypoxic stress, and by 73% after the last hypoxic stress.

The study of occludin expression showed any significant difference between controls and cells exposed to each hypoxic stress.

The expression of claudin-5 progressively decreased after repeated hypoxic stress. We noticed a significant decrease by 37% after the 1st hypoxic stress, by 71% after the 2nd hypoxic stress, and by 75% after the last exposition to hydralazine.



**Figure 4 : Concentrations of ZO-1, occludin and claudin-5 after each hypoxic stress induced by hydralazine in an *in vitro* BBB model. Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m (n = 6). \* p < 0.05 control versus hydralazine.**

Using confocal laser microscopy, we confirmed the alteration of ZO-1 protein in membrane cells. Controls cells showed that ZO-1 staining was continuous in membrane cells. After the 1st hypoxic stress we observed that ZO-1 staining was less intense. Then after the 2nd and 3rd hypoxic stresses, ZO-1 staining was no longer continuous in membrane cells, which confirmed the decrease of this protein expression as observed by the cell-ELISA method (Figure 5a).

Claudin-5 protein was also altered after repeated hypoxic stress. Indeed, we observed a loss of staining after each hypoxic stress (Figure 5b).

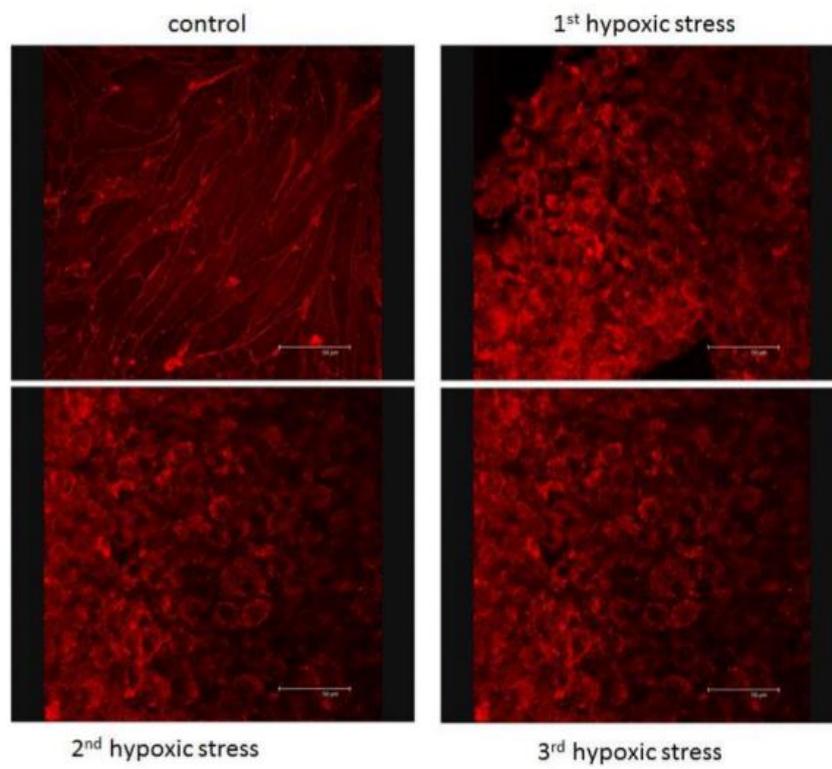


Figure 5a: Expression of ZO-1 after repeated hypoxic stress under confocal microscopy

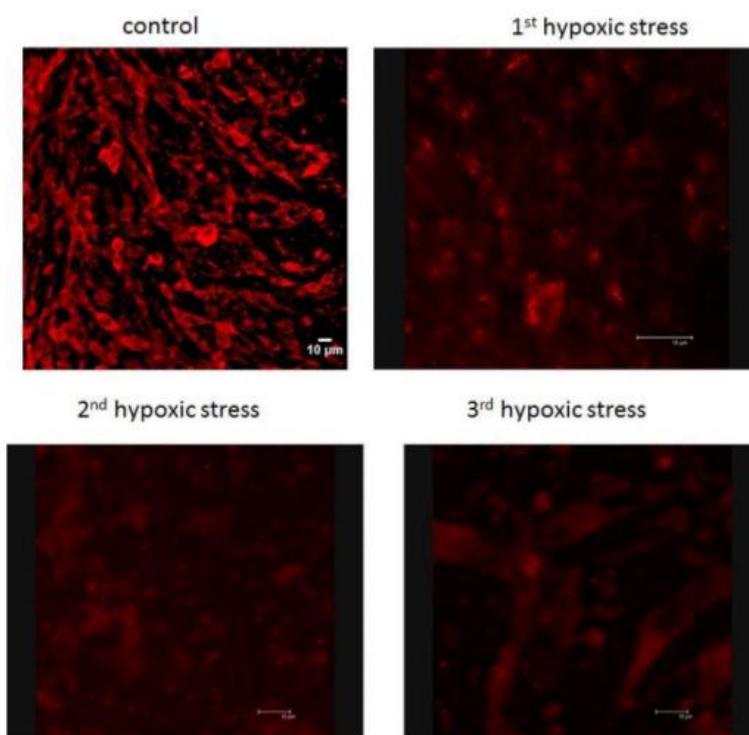


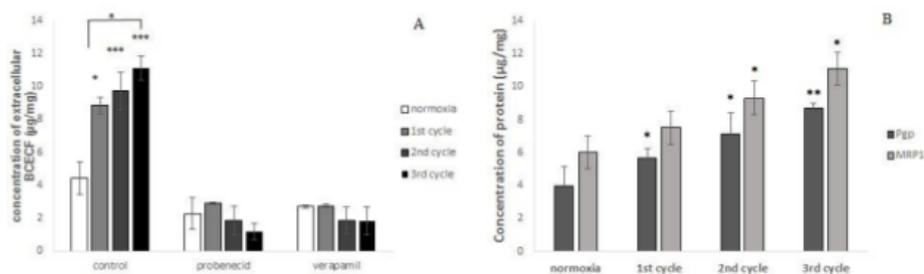
Figure 6b: Expression of claudin-5 after repeated hypoxic stress under confocal microscopy.

- Transendothelial transport by efflux transporters

Transendothelial transport was evaluated by studying the transport of a substrate of Pgp and MRP-1, *i.e.*, BCECF-AM, with a method developed in our laboratory<sup>13</sup>. BCECF-AM is cleaved by intracellular esterase into a fluorescent component BCECF. We studied only the release of BCECF in the upper compartment (apical to basal) because we showed in a previous study that pumps were more active on apical membranes of our *in vitro* BBB model<sup>10</sup>. Then we evaluated this transendothelial transport after each hypoxic stress. We observed that efflux transporters prevented the entry of BCECF in cells because an important transendothelial transport was noticed after each hypoxic stress (Figure 6A). Indeed, a significant increase of extracellular BCECF was observed from the 1st hypoxic stress to the 3rd exposition. The concentration of BCECF varied from  $4.43 \pm 1.1$  to  $8.84 \pm 0.47$   $\mu\text{g/ml}$  after the 1st exposition to hydralazine and

to  $11.13 \pm 0.72 \mu\text{g/ml}$  after the last exposition. These results showed that endothelial cells progressively increased their efflux transporter's activity after repeated hypoxic stress. The relative importance between Pgp and MRP-1 was evaluated with two specific inhibitors, *i.e.*, verapamil and probenecid, respectively. We observed any significant difference between the two transporters.

In addition, we investigated the expression of Pgp and MRP-1 proteins in our *in vitro* BBB model after this repeated hypoxic stress (Figure 6B) in order to explain the observed increase in the pump's activity. MRP-1 expression significantly increased after the 2nd hypoxic stress. Its expression increased by 25% after the 1st hypoxic stress, by 55% after the 2nd and by 84% after the last exposition. Pgp expression increased after each hypoxic stress. Indeed, its expression significantly increased by 42% after the 1st exposition, by 78% after the 2nd and by 118% after the 3rd exposition to hydalazine.



**Figure 6: (A) Release of BCECF during transport from A to B after repeated hypoxic stress. (B) Concentrations of MRP-1 and Pgp proteins after cells were exposed to repeated exposition with hydalazine. Results are presented as mean  $\pm$  s.e.m (n = 6). \* p < 0.05 control versus hydalazine, \*\*\* p < 0.001 control versus hydalazine.**

This investigation on transendothelial transport by efflux transporters showed that the activity of Pgp and MRP-1 was more active and increased progressively after repeated hypoxic stress. This increase could be explained by an overexpression of these proteins.

## Discussion

The BBB is a key structure for the brain's function through its roles in maintaining brain homeostasis. This function is ensured by two types of proteins: TJ proteins and efflux transporters. TJ proteins create a physical blockade to paracellular diffusion, whereas efflux transporters act as a barrier system by pumping compounds out of endothelial cells, which reduce for example the exposure to drugs in the central nervous system. However, the BBB is sensitive to hypoxic stress<sup>2</sup>. Indeed, Zehendner et al showed that hypoxia causes a breakdown of the BBB illustrated by a TJ protein disruption<sup>14</sup>. Nevertheless, several diseases are responsible for intermittent hypoxic stress. The consequences of this specific type of hypoxia on the brain, and in particular on the BBB, are less well known. Lim and Pack proposed in a review paper that intermittent hypoxia could alter the BBB by activating the HIF-1 pathway<sup>9</sup>. Nevertheless, cellular and molecular mechanisms are still unknown. Indeed, few studies in the literature are concerned with the consequences of intermittent hypoxia on the BBB. Some authors using an *in vivo* study had hypothesized that the permeability of this barrier is impaired in a mouse model mimicking sleep apnea<sup>15</sup>. However, they observed no change in permeability; their hypothesis was that they had underestimated the local effects within the BBB using Evans Blue, which is a more global approach to the permeability of the BBB. The *in vitro* BBB models turn out to be the right tools to test this hypothesis. However, no study to date has been interested in the cellular impact of intermittent hypoxia on the integrity of the BBB. In this regard, we present in this study a suitable induction method of repeated hypoxic stress by hydralazine, an inhibitor of the PHD. This method was set up to understand cellular mechanisms involved by these repeated stresses on an *in vitro* BBB model.

In a first step we determined after exposure of 2 h with hydralazine the time for our cells to recover a fundamental level of HIF-1 $\alpha$ , which corresponds to a normoxic state, in order to induce another hypoxic stress. This exposure duration time with hydralazine was previously determined to induce a cellular hypoxic environment<sup>10</sup>. We found that after 8 h exposure to hydralazine, cells expressed a fundamental level of HIF-1 $\alpha$  as compared to our controls (Figure 1). We repeated these stresses during 24 h, which corresponded to a cell cycle. Then we investigated its impact on our *in vitro* BBB model. Our results showed a disruption of the BBB because we observed a significant decrease of TEER values (Figure 2) and a significant increase of membrane permeability to Na-F (Figure 3) after each hypoxic stress. These results, taken together, demonstrated that our *in vitro* BBB model lost its physical barrier properties after repeated hypoxic stress because ionic compounds and molecules could cross cell membranes. So we investigated the impact of these stresses on the paracellular pathway because TJ proteins

are responsible for these properties. Figures 4 and 5 show that repeated hypoxic stresses lead to a TJ disruption. Indeed, we noticed that claudin-5 and ZO-1 expressions progressively decreased after hypoxic stresses. However, occludin expression was not altered during these exposures. This result was also observed during acute hypoxia<sup>10,16</sup> and confirmed that occludin was not essential for the setup of TJ complexes but could participate in the regulation of ionic flux at the BBB<sup>16</sup>. Then we investigated if the transcellular pathway was modified by repeated hypoxic stress by studying efflux transporters because they confer a protection by rejecting potential cytotoxic compounds. Our results showed that Pgp and MRP-1 activities were gradually increased after these stresses (Figure 6A) since BCECF was more efflux; however, we could not find any significant difference between the two pumps. These results confirmed those obtained by Xiao-Dong et al in a rat *in vitro* BBB model<sup>17</sup>. Finally, we demonstrated that this increase of activity was linked to an overexpression of Pgp and MRP-1 after repeated hypoxic stresses (Figure 6B). Indeed, Pgp was significantly increased from the first hypoxic stress, whereas MRP-1 was significantly increased after the second stress. Taken together, these results showed that cells had set up a defense mechanism to protect the brain against the entry of potential cytotoxic compounds during these repeated hypoxic stresses.

This study is the first to study the impact of repeated hypoxic stresses on the BBB. Our results showed that these stresses cause changes at the BBB's site because it disrupted TJ proteins and increased the activity of efflux transporters. This last result could create a resistance to therapy because drugs could be rejected by these pumps. However, with our induction method, the stabilization of HIF-1 $\alpha$  (and so the induction of hypoxia) is rather long (2 h) and does not allow to do short cycles which would correspond better to intermittent hypoxia. Nevertheless, our induction of repeated hypoxic stress seems to be a suitable way to understand the first cellular and molecular mechanisms involved by this type of hypoxia on the BBB. Indeed, with this method, our stresses were controlled, reproducible and reversible. So this induction method will allow us to bring some necessary answers to the understanding of the early stages of the consequences of repeated hypoxic stress on the BBB during pathological states.

### **Acknowledgment**

The authors wanted to thank Florian Bergandi (technician at anatomy laboratory of St Etienne) for his help in the preparation of transwells for confocal microscopy studies.

### **Author contributions**

F. Roche and N. Perek conceived and designed the project. M. Chatard performed the experiments. M. Chatard analyzed the data. S.Palle analyzed images of confocal microscopy. M. Chatard, F. Roche and N. Perek wrote the paper.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that they have no conflict of interest.

### **References**

- 1 Ogunshola OO, Al-Ahmad A. HIF-1 at the blood-brain barrier: a mediator of permeability? *High Alt Med Biol* 2012; **13**: 153–161.
- 2 Keller A. Breaking and building the wall: the biology of the blood-brain barrier in health and disease. *Swiss Med Wkly* 2013; **143**: w13892.
- 3 Brillault J, Berezowski V, Cecchelli R, Dehouck M-P. Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J Neurochem* 2002; **83**: 807–817.
- 4 Hayashi K, Nakao S, Nakaoka R, Nakagawa S, Kitagawa N, Niwa M. Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul Pept* 2004; **123**: 77–83.
- 5 Al Ahmad A, Taboada CB, Gassmann M, Ogunshola OO. Astrocytes and pericytes differentially modulate blood-brain barrier characteristics during development and hypoxic insult. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab* 2011; **31**: 693–705.
- 6 Sforza E, Roche F, Thomas-Anterion C, Kerleroux J, Beauchet O, Celle S *et al*. Cognitive function and sleep related breathing disorders in a healthy elderly population: the SYNAPSE study. *Sleep* 2010; **33**: 515–521.

- 7 Kerner NA, Roose SP. Obstructive Sleep Apnea is Linked to Depression and Cognitive Impairment: Evidence and Potential Mechanisms. *Am J Geriatr Psychiatry Off J Am Assoc Geriatr Psychiatry* 2016; **24**: 496–508.
- 8 Phillips SA, Olson EB, Morgan BJ, Lombard JH. Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **286**: H388-393.
- 9 Lim DC, Pack AI. Obstructive sleep apnea and cognitive impairment: addressing the blood-brain barrier. *Sleep Med Rev* 2014; **18**: 35–48.
- 10 Chatard M, Puech C, Roche F, Perek N. Hypoxic Stress Induced by Hydralazine Leads to a Loss of Blood-Brain Barrier Integrity and an Increase in Efflux Transporter Activity. *PLoS One* 2016; **11**: e0158010.
- 11 Brown RC, Mark KS, Egleton RD, Huber JD, Burroughs AR, Davis TP. Protection against hypoxia-induced increase in blood-brain barrier permeability: role of tight junction proteins and NFκB. *J Cell Sci* 2003; **116**: 693–700.
- 12 Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol* 2005; **25**: 59–127.
- 13 Perek N, Le Jeune N, Denoyer D, Dubois F. MRP-1 protein expression and glutathione content of in vitro tumor cell lines derived from human glioma carcinoma U-87-MG do not interact with 99mTc-glucuronate uptake. *Cancer Biother Radiopharm* 2005; **20**: 391–400.
- 14 Zehendner CM, Librizzi L, Hedrich J, Bauer NM, Angamo EA, de Curtis M *et al*. Moderate hypoxia followed by reoxygenation results in blood-brain barrier breakdown via oxidative stress-dependent tight-junction protein disruption. *PLoS One* 2013; **8**: e82823.
- 15 Kim LJ, Martinez D, Fiori CZ, Baronio D, Kretzmann NA, Barros HMT. Hypomyelination, memory impairment, and blood-brain barrier permeability in a model of sleep apnea. *Brain Res* 2015; **1597**: 28–36.
- 16 Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H *et al*. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000; **11**: 4131–4142.
- 17 Xiao-Dong L, Zhi-Hong Y, Hui-Wen Y. Repetitive/temporal hypoxia increased P-glycoprotein expression in cultured rat brain microvascular endothelial cells in vitro. *Neurosci Lett* 2008; **432**: 184–187.

**Troisième partie :**  
**Discussion générale-**  
**conclusion et**  
**perspectives de**  
**l'étude**

# Discussion générale

La barrière hémato-encéphalique est une barrière physique et métabolique, qui sépare le système nerveux central de la circulation sanguine. Elle est composée de différents types cellulaires, qui lui confèrent ses propriétés de barrière, essentielles au fonctionnement optimal des neurones, et par conséquent du SNC (Hawkins and Davis, 2005). Ainsi, elle régule l'équilibre ionique entre le sang et le tissu cérébral, et limite l'entrée dans le cerveau de substances pouvant lui être toxiques (Ronaldson and Davis, 2015).

Toutefois certaines maladies, touchant le SNC, sont liées à une altération de la BHE, comme l'ischémie cérébrale par exemple. L'enjeu dans l'étude de ces pathologies, est de comprendre les mécanismes amenant à cette altération, afin de développer des stratégies thérapeutiques adéquates. Dans ce but, de nombreux modèles *in vitro* de BHE ont été développés, afin de comprendre la fonction de cette barrière dans des conditions physiologiques et pathologiques.

Un des facteurs, pouvant altérer l'homéostasie du SNC, est l'hypoxie. En effet, le cerveau est le premier consommateur d'oxygène, en utilisant 20% du débit cardiaque (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). De plus, la BHE est une structure sensible à des conditions hypoxiques (Keller, 2013). De ce fait, de nombreuses études se sont intéressées aux conséquences d'une hypoxie aiguë (modélisation d'une ischémie) sur la BHE (Brillault *et al.*, 2002; Hayashi *et al.*, 2004; Al Ahmad *et al.*, 2011; Ogunshola, 2011). Toutes ces études aboutissent aux conclusions que l'hypoxie altère la BHE en induisant une perte d'expressions des protéines de jonctions serrées, qui est illustrée par une augmentation de perméabilité de la barrière. Néanmoins, si les conséquences d'une hypoxie aiguë sur la BHE sont bien décrites, ce n'est pas le cas de l'hypoxie intermittente. Or, ce phénomène est retrouvé dans certaines pathologies, notamment respiratoires, comme le syndrome d'apnées du sommeil. Cette hypoxie intermittente ne semble pas être sans conséquence sur le cerveau, puisque des études chez l'Homme constatent que ces patients souffrent de troubles cognitifs (Sforza *et al.*, 2010; Kerner and Roose, 2016) mais peuvent aussi présenter des baisses focales de substance grise (Celle *et al.*, 2016). Ces résultats tendent à montrer que l'homéostasie neuronale est affectée et par

conséquent suggèrent que la BHE pourrait être altérée. Cependant, peu d'études se sont intéressées à l'impact de l'hypoxie intermittente sur la BHE en raison de la complexité du cerveau. Les modèles *in vitro* pourraient être un moyen de pallier à cette difficulté.

Dans ce cadre, l'objectif de ce travail de thèse a été, dans un premier temps, de mettre en place un modèle *in vitro* de BHE adéquat à l'étude du fonctionnement de cette barrière en conditions pathologiques. Dans un second temps, une méthode d'induction d'hypoxie par agent mimétique a été validée afin d'étudier par la suite l'impact de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de la BHE.

### **Mise en place d'un modèle co-culture contact pour étudier le fonctionnement de la BHE en condition pathologique (hypoxie)**

Le modèle *in vitro*, développé durant ce travail de thèse, est un modèle murin. Ce choix s'explique par le fait que des études *in vivo* vont être réalisées au sein du laboratoire, et ainsi nous pourrons faire un parallèle entre les études *in vitro* et *in vivo*.

Afin de mettre en place, un modèle cellulaire le plus représentatif possible d'une BHE *in vivo*, différentes configurations ont été testées. Ainsi, le modèle co-culture « contact » a montré les meilleurs résultats en termes de TEER et de perméabilité. Ceci peut s'expliquer par l'interaction étroite entre les cellules endothéliales et les astrocytes (Dehouck *et al.*, 1990; Al Ahmad *et al.*, 2011). Par ailleurs, la caractérisation de ce modèle a révélé que ce dernier exprimait des protéines de jonctions serrées (occludine, claudine-5 et ZO-1), à la membrane des cellules endothéliales. Enfin, ce modèle *in vitro* possède des transporteurs d'efflux (Pgp et MRP-1) qui sont fonctionnels et exprimés principalement à la surface apicale des cellules endothéliales. Ces résultats sont en adéquation avec les critères attendus pour un modèle *in vitro* de BHE (Naik and Cucullo, 2012). **Par conséquent, ce modèle *in vitro* de co-culture « contact » est adéquat pour étudier la physiologie, et particulièrement l'intégrité, de la BHE en condition pathologique telle qu'un stress hypoxique.**

Toutefois, ce modèle pourrait être amélioré sur le long terme en prenant en compte l'impact des péricytes et du shear stress, qui sont des facteurs importants dans la mise en place de cette barrière *in vivo* (Al Ahmad *et al.*, 2011; Vandenhoute *et al.*, 2011; Prabhakarpanian *et al.*, 2013; Takeshita *et al.*, 2014) En effet, le shear stress permettrait la mise en place du phénotype de la BHE en intervenant sur les jonctions serrées et les transporteurs d'efflux de type ABC (Cucullo *et al.*, 2011).

### **Une induction d'un stress hypoxique par des agents mimétiques est adéquate pour étudier son impact sur la BHE**

Ces dernières années, de nombreuses études ont montré que l'hypoxie représentait un stress majeur pour le cerveau en induisant une altération de la BHE, et entraînait des pathologies neurologiques (Sandoval and Witt, 2008; Al Ahmad *et al.*, 2009). Néanmoins, l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires provoqués par une hypoxie courte, peut être difficile à réaliser avec une hypoxie physique, en raison de la réversion rapide du phénomène. De ce fait, nous avons fait le choix d'induire une hypoxie avec un agent mimétique qui inhibe la PHD, permettant de stabiliser HIF-1 $\alpha$ , et ainsi de créer un environnement cellulaire hypoxique. Au cours de ce travail, l'agent mimétique utilisé est l'hydralazine qui est un vasodilatateur utilisé en clinique. Par ailleurs, elle est principalement utilisée dans la littérature pour mimer un environnement cellulaire dans des modèles *in vitro* et *in vivo* en cancérologie (Horsman *et al.*, 1995). En effet, cette molécule possède des capacités d'induction de HIF-1 $\alpha$  puisqu'elle inhibe la PHD (Knowles *et al.*, 2004). Notre première étude a présenté **l'hydralazine comme un candidat potentiel et adéquat pour étudier l'impact de l'hypoxie sur la BHE**, puisqu'elle est capable d'induire une surexpression de HIF-1 $\alpha$  comparable à celle obtenue en hypoxie physique (Chatard *et al.*, 2016). De plus, nous avons montré des impacts similaires sur la BHE avec les deux méthodes d'induction (hydralazine et hypoxie physique) et qui confirment les résultats obtenus dans la littérature (Fischer *et al.*, 2002). **L'avantage de l'hydralazine sur l'hypoxie physique est que le stress induit est reproductible au cours du temps, réversible, contrôlable et moins onéreux.**

Toutefois, plusieurs agents mimétiques sont décrits dans la littérature, notamment le chlorure de cobalt qui a déjà été utilisé pour induire une hypoxie sur la BHE (Engelhardt *et al.*,

2014). Nous nous sommes intéressés, dans notre seconde étude, à déterminer l'agent mimétique le plus adéquat pour la BHE entre l'hydralazine et le chlorure de cobalt. Cette étude comparative a montré que ces deux agents induisaient une surexpression de HIF-1 $\alpha$ , même sur des temps assez long ce qui permet d'étudier les conséquences d'une hypoxie prolongée sur la BHE. Ainsi, il a été montré dans cette étude qu'une hypoxie prolongée, induite par l'hydralazine ou le chlorure de cobalt, entraînait une perte d'intégrité du modèle cellulaire de BHE. Cette perte d'intégrité s'illustre par une augmentation de perméabilité provoquée par une diminution de l'expression de ZO-1 (protéine de jonctions serrées). Ces résultats sont en adéquation avec ceux obtenus dans la littérature (Engelhardt *et al.*, 2014). Par ailleurs, dans cette étude, il a également été démontré que les cellules mettaient en place un mécanisme de défense pour lutter contre l'entrée potentielle de molécules, liée à la perte d'expression de ZO-1. Ce mécanisme de défense est illustré par une augmentation d'activité de Pgp et MRP-1 qui est due à une surexpression des protéines après un stress hypoxique prolongé. Ces résultats ont également été retrouvés dans le cadre de l'épilepsie (Xiao-Dong *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014). Toutefois, ce mécanisme de défense devra être pris en compte lors du développement de stratégie thérapeutique car il pourra entraîner une résistance aux médicaments. En conclusion, notre deuxième étude a révélé que les deux agents mimétiques induisaient le même impact sur notre modèle cellulaire de BHE. Toutefois, le chlorure de cobalt présente l'inconvénient d'une forte cytotoxicité pour nos cellules. En effet, 50% de mortalité cellulaire est observée avec cet agent. Cette cytotoxicité pourrait provenir d'une activation de la caspase-3 par le chlorure de cobalt, ce qui conduirait à une apoptose et donc à la mort des cellules (Cervellati *et al.*, 2014). Cette cytotoxicité n'est pas observée pour l'hydralazine. Par conséquent, **l'hydralazine est l'agent mimétique le plus adéquat pour la BHE** puisque nous pouvons conclure que les effets observés sur la BHE sont les conséquences du stress hypoxique induit et non dus à la cytotoxicité de la molécule. Cette méthode d'induction d'hypoxie par l'hydralazine semble être une **méthode appropriée pour étudier l'impact de stress hypoxiques répétés** (alternance d'un état hypoxique et d'un état normoxique, permettant la modélisation de l'hypoxie intermittente) **sur la BHE**, afin de comprendre les troubles cognitifs observés chez les patients souffrant de pathologies respiratoires.

## **Impact de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de la BHE et les mécanismes de défense liés aux transporteurs d'efflux**

Cette étude est la **première menée *in vitro* qui s'intéresse à l'intégrité de la BHE** après une exposition à une hypoxie intermittente. En effet, seules deux études dans la littérature décrivent l'impact de l'hypoxie intermittente sur le cerveau. La première a été menée *in vitro* et montre une augmentation de l'activité de Pgp, qui pourrait expliquer la résistance aux médicaments dans le cadre de l'épilepsie (Xiao-Dong *et al.*, 2008). Toutefois, cette étude ne s'intéresse pas à l'intégrité de la BHE.

La seconde étude, menée chez la souris, s'intéressait à la myélinisation axonale et à la perméabilité de la BHE dans le cadre du syndrome d'apnées du sommeil. Leurs résultats montrent une hypomyélinisation des axones avec une altération de la mémoire, mais ne démontrent pas de modification de la perméabilité de la BHE. Une des hypothèses, pour ce dernier résultat, serait que la méthode au bleu Evans a été réalisée sur le cerveau dans sa globalité, et pourrait sous-estimer l'impact local sur la BHE (Kim *et al.*, 2015). De ce fait, nous avons étudié l'impact de cette hypoxie intermittente sur un modèle *in vitro* de BHE en induisant des stress hypoxiques répétés avec l'hydralazine (alternance d'un état hypoxique et d'un état normoxique répétée dans le temps au cours d'un cycle cellulaire).

Dans cette étude, nous avons pu observer des changements au sein de notre modèle *in vitro* de BHE après des expositions répétées à l'hypoxie induites par l'hydralazine. Ces changements sont observés à la fois au niveau paracellulaire (intégrité de la barrière) et au niveau transcellulaire (mécanisme de protection par les transporteurs d'efflux de type ABC). En effet une augmentation de perméabilité, de plus en plus importante, révèle que notre modèle cellulaire de barrière perd **progressivement** son intégrité au cours de ces épisodes hypoxiques. Ce résultat s'explique par une diminution progressive des expressions de claudine-5 et de ZO-1 à la membrane des cellules endothéliales. Ces résultats vérifient l'hypothèse de Kim et al (Kim *et al.*, 2015) puisqu'ils montrent que la BHE est impactée par une hypoxie répétée au cours du temps et donc que dans leur étude l'impact local sur la BHE a été sous-estimé.

Par ailleurs, les **mécanismes de protection** des cellules endothéliales **via les transporteurs ABC** tels que Pgp et MRP-1 sont, quant à eux, **progressivement mis en place** au cours des épisodes hypoxiques. En effet, une augmentation d'activité de Pgp et MRP-1,

d'autant plus importante au cours des épisodes, est observée. Celle-ci est associée à une surexpression des protéines à la membrane apicale des cellules endothéliales. Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus par Xiao-Dong et al et pourraient expliquer la résistance aux médicaments dans le cadre de l'épilepsie (Xiao-Dong *et al.*, 2008).

Notre étude est donc la première à s'intéresser à l'impact cellulaire et moléculaire de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité de la BHE. Nos résultats montrent donc la **BHE perd progressivement son intégrité et augmente, de plus en plus, l'activité de ces transporteurs d'efflux** au cours des épisodes hypoxiques, afin de **lutter contre le passage de molécules potentiellement toxiques pour le cerveau, possible par la perte de fonctionnalité protéines de jonctions serrées**.

Toutefois, l'induction de l'hypoxie par l'hydralazine reste plutôt longue (2 heures) et ne permet donc pas de faire des cycles courts qui correspondraient davantage à une hypoxie intermittente, caractéristique des pathologies respiratoires nocturnes comme le syndrome d'apnées du sommeil. Cependant, cette méthode alternative permet d'induire des stress hypoxiques qui sont contrôlés, réversibles et très reproductibles. De plus, nos résultats sont encourageants et cohérents avec ceux obtenus lors d'une étude menée *in vivo* au laboratoire. En effet, une diminution des protéines de jonctions serrées a été observée sur des coupes de cerveaux de souris exposées à une hypoxie intermittente (résultats qui ont donné lieu à un poster lors de la journée française de médecine à Saint Etienne). Ainsi, cette étude nous permet d'apporter des premiers éléments de réponses sur les conséquences de ces épisodes hypoxiques répétés sur la BHE.

## Conclusion

L'hypoxie est un facteur majeur dans l'altération de la barrière hémato-encéphalique, conduisant à des pathologies neurologiques. Toutefois, les conséquences d'épisodes hypoxiques répétés au cours du temps, sont très peu décrites dans la littérature, mais conduiraient à des troubles neuro-cognitifs sérieux accélérant ou déclenchant des pathologies neurodégénératives. Dans ce travail, une méthode d'induction reproductible d'épisodes

hypoxiques (suivis d'une phase de normoxie) répétés, a été mise en place afin d'étudier l'impact sur l'intégrité d'un modèle *in vitro* de BHE. Ainsi, il a été montré que des stress hypoxiques longs et répétés, induits par l'hydralazine, altèrent progressivement l'étanchéité de la BHE. En effet, cette étanchéité est assurée par deux types de protéines : les jonctions serrées (passage paracellulaire) et les transporteurs d'efflux de la famille ABC (passage transcellulaire). Or, dans cette étude, il a été démontré, qu'au cours de ces épisodes hypoxiques, les expressions de ZO-1 et claudine-5 diminuaient progressivement, témoignant ainsi d'une augmentation de la perméabilité de la BHE et créant un passage potentiel pour les molécules dans le tissu cérébral. Par ailleurs, les cellules endothéliales augmentent, de manière progressive, l'expression de ces transporteurs d'efflux (Pgp et MRP-1) afin d'augmenter leurs activités et probablement limiter ainsi l'accès de molécules potentiellement cytotoxiques, dans le cerveau.

En conclusion, **des épisodes hypoxiques répétés altèrent l'étanchéité de la BHE au cours du temps**. Ceci pourrait expliquer, comme le suggèrent Lim & Pack, les troubles cognitifs observés chez les patients atteints d'apnées du sommeil. La méthode d'induction de ces stress répétés par l'hydralazine, mise en place durant ce travail de thèse, a donc permis d'apporter des premiers éléments de réponse sur les mécanismes cellulaires et moléculaires induits par ces épisodes hypoxiques, dans ces pathologies. Toutefois, il serait intéressant d'étudier l'interaction entre les cellules et l'impact possible sur l'unité neurovasculaire, afin de développer des stratégies thérapeutiques pour ces pathologies comme le syndrome d'apnées du sommeil.

## Perspectives envisagées

### **Amélioration de la méthode d'induction hypoxie intermittente**

La méthode d'induction de stress hypoxiques répétés, induits par l'hydralazine, mise en place au cours de ce travail, a montré des résultats encourageant puisqu'ils correspondent à ceux obtenus récemment au laboratoire sur le petit animal. En effet, une augmentation de perméabilité et une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées, ont été observées au niveau des cerveaux, de souris exposées, à une hypoxie intermittente.

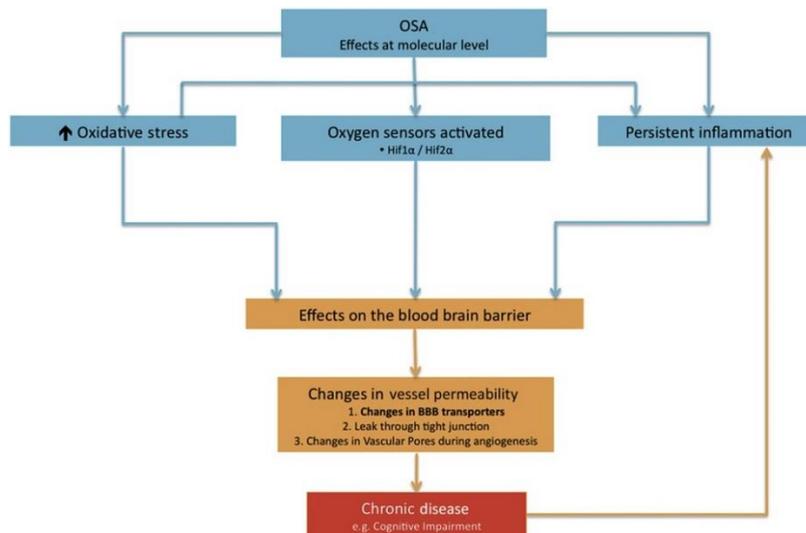
Néanmoins, notre induction avec l'hydralazine est plutôt longue car 2 heures sont nécessaires pour atteindre un état hypoxique, de même qu'il faut 8 heures pour retrouver un statut normoxique. Afin d'affiner notre étude, il est nécessaire d'avoir des inductions d'hypoxie plus courtes ainsi qu'une réversion plus rapide, dans le but de se rapprocher d'une hypoxie intermittente plus représentative de la réalité. Pour cela, le laboratoire SNA-EPIS a acquis, récemment, une enceinte à hypoxie (financée par l'association de recherche SYNAPSE). Ce dispositif va ainsi permettre d'induire des cycles plus courts d'hypoxie/normoxie, et donc plus représentatif d'une hypoxie intermittente produite *in vivo*. Par conséquent, nous allons pouvoir confirmer les résultats obtenus avec l'hydralazine et affiner l'étude en induisant des cycles, sur un plus long terme, afin d'évaluer l'impact des ces épisodes chroniques d'hypoxie sur la BHE, et par conséquent sur le cerveau, dans le cadre de ces pathologies.

### **Stratégies envisagées pour inhiber ou réduire l'impact de l'hypoxie sur la BHE**

Nos travaux ont montré qu'un stress hypoxique, aiguë ou répété, entraînait une altération de la barrière hémato-encéphalique par l'intermédiaire d'une perte des protéines de jonctions serrées et une augmentation de l'expression des transporteurs d'efflux (mécanismes de défense qui pourrait conduire à une résistance aux médicaments). Or l'augmentation de perméabilité de la BHE, induite par l'altération des protéines de jonctions serrées, serait associée au facteur de l'hypoxie HIF-1 $\alpha$ , qui activerait la production de VEGF par les cellules. Cette production entraînerait une augmentation de perméabilité et une réorganisation au sein des jonctions serrées (Ogunshola and Al-Ahmad, 2012). De ce fait, certaines études se sont intéressées à l'impact des inhibiteurs de HIF-1 $\alpha$  sur la perméabilité de la BHE. Ainsi, Yeh et al ont démontré que YC-1 (3-(5'-hydroxyethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole), un inhibiteur de HIF-1 $\alpha$ , était capable de prévenir l'augmentation de la perméabilité de cellules endothéliales cérébrales de rat lors d'une hypoxie aiguë de 24 heures (Yeh *et al.*, 2007). Par ailleurs, Engelhardt et al démontrent les mêmes résultats en utilisant deux inhibiteurs : YC-1 et 2ME2 (méthoxyestradiol) (Engelhardt *et al.*, 2014). Enfin, une étude plus récente menée *in vitro* et *in vivo*, confirme que l'utilisation d'inhibiteurs de HIF-1 $\alpha$  prévient l'altération de la BHE entraînée par une hypoxie dans le cadre d'un œdème cérébral (Yang *et al.*, 2015).

De ce fait, nous avons débuté une étude dans laquelle notre modèle cellulaire est incubé avec un inhibiteur de HIF-1 $\alpha$  avant chacun de nos épisodes hypoxiques. Deux inhibiteurs sont testés : YC-1 et 2ME2 car ce sont les plus utilisés lors d'études menées sur la BHE (Yeh *et al.*, 2007; Engelhardt *et al.*, 2014). Nos premiers résultats montrent un effet protecteur au cours du temps des inhibiteurs sur l'intégrité de notre modèle cellulaire. Une restauration complète de l'étanchéité du modèle de BHE n'a cependant pas été observée, que ce soit avec YC-1 ou 2ME2. De plus, YC-1 semble avoir un effet plus efficace que 2ME2 sur nos cellules. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à la concentration utilisée (concentration non cytotoxique pour nos cellules), HIF-1 $\alpha$  n'est pas totalement inhibée. Néanmoins, ce sont des premiers résultats et donc une répétition de l'étude est nécessaire.

Toutefois, si ces résultats se confirment cela implique que la voie de HIF-1 ne serait pas la seule impliquée dans l'altération de la BHE en situation de stress hypoxique. Par conséquent, il serait intéressant d'étudier les autres voies possibles comme l'inflammation ou le stress oxydatif (**Figure 44**). En effet, des études ont montré que l'hypoxie induisait une augmentation d'expression de molécules proinflammatoires comme l'IL-8 pouvant avoir un impact sur la BHE (Lim and Pack, 2014 ; Kim *et al.*, 2015). Par ailleurs, il a été démontré que la NADPH oxydase avait un rôle important dans les dommages observés au sein de la BHE chez un modèle murin d'ischémie cérébrale (Kahles *et al.*, 2007). Zehendner et al. proposent dans leur étude que le mécanisme cellulaire majeur conduisant à une ouverture de la BHE, est l'altération des jonctions serrées par l'intermédiaire d'un stress oxydatif lié à l'hypoxie (Zehendner *et al.*, 2013).



**Figure 44 : L’hypoxie intermittente génère une augmentation de stress oxydatif, active la voie HIF-1 et induit un état d’inflammation chronique.** Hypothèse de Lim & Pack. (Lim and Pack, 2014).

L’inflammation et son impact sur la BHE, au cours d’une hypoxie intermittente, sur la BHE sera étudiée lors d’études futures par une nouvelle étudiante en doctorat au sein du laboratoire SNA-EPIS, puisque des travaux préliminaires menés au laboratoire ont montré une sécrétion de cytokines inflammatoires après des épisodes hypoxiques.

L’implication du stress oxydatif, dans le cadre d’une hypoxie intermittente, sur la BHE n’est pas à écarter et pourrait faire l’objet d’autres sujets d’étude au sein du laboratoire, lors de projets futurs.

## Perspectives personnelles

Après la fin de ma thèse et de mon contrat d’ATER, je souhaite effectuer un « post-doctorat » à l’étranger dans un pays anglophone, toujours dans le domaine de la barrière hémato-encéphalique et des pathologies associées à son altération. L’objectif de « ce post-doctorat » est de parfaire et d’apprendre de nouvelles techniques ainsi que des nouvelles thématiques de recherche comme la maladie d’Alzheimer. Enfin je souhaite, à long terme, postuler pour un poste de Maître de Conférence qui me permettra d’associer une activité de recherche et d’enseignement.

# Bibliographie

- Abbott, N. J. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 200, 629–638.
- Abbott, N. J. (2013). Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J. Inherit. Metab. Dis.* 36, 437–449.
- Abbott, N. J., Hughes, C. C., Revest, P. A., and Greenwood, J. (1992). Development and characterisation of a rat brain capillary endothelial culture: towards an in vitro blood-brain barrier. *J. Cell Sci.* 103 ( Pt 1), 23–37.
- Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R., and Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25.
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53.
- Abbruscato, T. J., and Davis, T. P. (1999). Combination of hypoxia/aglycemia compromises in vitro blood-brain barrier integrity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 289, 668–675.
- Abe, T. *et al.* (1999). Identification of a Novel Gene Family Encoding Human Liver-specific Organic Anion Transporter LST-1. *J. Biol. Chem.* 274, 17159–17163.
- Ades, E. W., Candal, F. J., Swerlick, R. A., George, V. G., Summers, S., Bosse, D. C., and Lawley, T. J. (1992). HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* 99, 683–690.
- Adhikary, G., Kline, D., Yuan, G., Kumar, G. K., Simonson, M. S., Cherniack, N. S., and Prabhakar, N. R. (2001). Gene regulation during intermittent hypoxia: evidence for the involvement of reactive oxygen species. *Adv. Exp. Med. Biol.* 499, 297–302.
- Agarwal, S., Sane, R., Ohlfest, J. R., and Elmquist, W. F. (2011). The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 223–233.
- Aguzzi, A., Barres, B. A., and Bennett, M. L. (2013). Microglia: scapegoat, saboteur, or something else? *Science* 339, 156–161.
- Al Ahmad, A., Gassmann, M., and Ogunshola, O. O. (2009). Maintaining blood-brain barrier integrity: pericytes perform better than astrocytes during prolonged oxygen deprivation. *J. Cell. Physiol.* 218, 612–622.
- Al Ahmad, A., Taboada, C. B., Gassmann, M., and Ogunshola, O. O. (2011). Astrocytes and pericytes differentially modulate blood-brain barrier characteristics during development and hypoxic insult. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 693–705.
- Allahdadi, K. J., Walker, B. R., and Kanagy, N. L. (2005). Augmented endothelin vasoconstriction in intermittent hypoxia-induced hypertension. *Hypertens. Dallas Tex* 1979 45, 705–709.

- Allen, J. D., Brinkhuis, R. F., Wijnholds, J., and Schinkel, A. H. (1999). The mouse *Bcrp1/Mxr/Abcp* gene: amplification and overexpression in cell lines selected for resistance to topotecan, mitoxantrone, or doxorubicin. *Cancer Res.* *59*, 4237–4241.
- Alvarez, J. I. *et al.* (2011). The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* *334*, 1727–1731.
- Alvarez, J. I., Katayama, T., and Prat, A. (2013). Glial influence on the blood brain barrier. *Glia* *61*, 1939–1958.
- Argaw, A. T. *et al.* (2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* *122*, 2454–2468.
- Argaw, A. T., Gurfein, B. T., Zhang, Y., Zameer, A., and John, G. R. (2009). VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 1977–1982.
- Armulik, A. *et al.* (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* *468*, 557–561.
- Arthur, F. E., Shivers, R. R., and Bowman, P. D. (1987). Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient *in vitro* model. *Brain Res.* *433*, 155–159.
- van Aubel, R. A. M. H., Smeets, P. H. E., Peters, J. G. P., Bindels, R. J. M., and Russel, F. G. M. (2002). The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* *13*, 595–603.
- Bakos, E. *et al.* (1998). Functional multidrug resistance protein (MRP1) lacking the N-terminal transmembrane domain. *J. Biol. Chem.* *273*, 32167–32175.
- Ballabh, P., Braun, A., and Nedergaard, M. (2004). The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol. Dis.* *16*, 1–13.
- Bandopadhyay, R., Orte, C., Lawrenson, J. G., Reid, A. R., De Silva, S., and Allt, G. (2001). Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J. Neurocytol.* *30*, 35–44.
- Barakat, S., Turcotte, S., Demeule, M., Lachambre, M.-P., Régina, A., Baggetto, L. G., and Béliveau, R. (2008). Regulation of brain endothelial cells migration and angiogenesis by P-glycoprotein/caveolin-1 interaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *372*, 440–446.
- Bazzoni, G., and Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol. Rev.* *84*, 869–901.
- Beck, D. W., Vinters, H. V., Hart, M. N., and Cancilla, P. A. (1984). Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *43*, 219–224.
- Belinsky, M. G., Bain, L. J., Balsara, B. B., Testa, J. R., and Kruh, G. D. (1998). Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* *90*, 1735–1741.

- Bell, R. D., Winkler, E. A., Sagare, A. P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., and Zlokovic, B. V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 68, 409–427.
- Bendayan, R., Ronaldson, P. T., Gingras, D., and Bendayan, M. (2006). In situ localization of P-glycoprotein (ABCB1) in human and rat brain. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 54, 1159–1167.
- Bennani-Baiti, B., Toegel, S., Viernstein, H., Urban, E., Noe, C. R., and Bennani-Baiti, I. M. (2015). Inflammation Modulates RLIP76/RALBP1 Electrophile-Glutathione Conjugate Transporter and Housekeeping Genes in Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells. *PLoS One* 10, e0139101.
- Berezowski, V., Landry, C., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2004). Contribution of glial cells and pericytes to the mRNA profiles of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 1018, 1–9.
- Bernacki, J., Dobrowolska, A., Nierwińska, K., and Małcki, A. (2008). Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol. Rep. PR* 60, 600–622.
- Bernas, M. J. *et al.* (2010). Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier. *Nat. Protoc.* 5, 1265–1272.
- Bickel, U. (2005). How to measure drug transport across the blood-brain barrier. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2, 15–26.
- Black, K. L., Baba, T., and Pardridge, W. M. (1994). Enzymatic barrier protects brain capillaries from leukotriene C4. *J. Neurosurg.* 81, 745–751.
- Bolton, S. J., Anthony, D. C., and Perry, V. H. (1998). Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 86, 1245–1257.
- Bonkowski, D., Katyshev, V., Balabanov, R. D., Borisov, A., and Dore-Duffy, P. (2011). The CNS microvascular pericyte: pericyte-astrocyte crosstalk in the regulation of tissue survival. *Fluids Barriers CNS* 8, 8.
- Booth, R., and Kim, H. (2012). Characterization of a microfluidic in vitro model of the blood-brain barrier ( $\mu$ BBB). *Lab. Chip* 12, 1784–1792.
- Borst, P., Evers, R., Kool, M., and Wijnholds, J. (2000). A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1295–1302.
- Boveri, M., Berezowski, V., Price, A., Slupek, S., Lenfant, A.-M., Benaud, C., Hartung, T., Cecchelli, R., Prieto, P., and Dehouck, M.-P. (2005). Induction of blood-brain barrier properties in cultured brain capillary endothelial cells: comparison between primary glial cells and C6 cell line. *Glia* 51, 187–198.

- Bowman, P. D., Ennis, S. R., Rarey, K. E., Betz, A. L., and Goldstein, G. W. (1983). Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann. Neurol.* *14*, 396–402.
- Breuninger, L. M., Paul, S., Gaughan, K., Miki, T., Chan, A., Aaronson, S. A., and Kruh, G. D. (1995). Expression of multidrug resistance-associated protein in NIH/3T3 cells confers multidrug resistance associated with increased drug efflux and altered intracellular drug distribution. *Cancer Res.* *55*, 5342–5347.
- Brightman, M. W., and Reese, T. S. (1969). Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* *40*, 648–677.
- Brillault, J., Berezowski, V., Cecchelli, R., and Dehouck, M.-P. (2002). Intercommunications between brain capillary endothelial cells and glial cells increase the transcellular permeability of the blood-brain barrier during ischaemia. *J. Neurochem.* *83*, 807–817.
- Brown, R. C., and Davis, T. P. (2005). Hypoxia/aglycemia alters expression of occludin and actin in brain endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *327*, 1114–1123.
- Brown, R. C., Morris, A. P., and O’Neil, R. G. (2007). Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. *Brain Res.* *1130*, 17–30.
- Bussolari, S. R., Dewey, C. F., and Gimbrone, M. A. (1982). Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. *Rev. Sci. Instrum.* *53*, 1851–1854.
- Cardoso, F. L., Brites, D., and Brito, M. A. (2010). Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res. Rev.* *64*, 328–363.
- Cecchelli, R., Aday, S., Sevin, E., Almeida, C., Culot, M., Dehouck, L., Coisne, C., Engelhardt, B., Dehouck, M.-P., and Ferreira, L. (2014). A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* *9*, e99733.
- Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M.-P., and Fenart, L. (2007). Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 650–661.
- Celle, S., Delon-Martin, C., Roche, F., Barthélémy, J.-C., Pépin, J.-L., and Dojat, M. (2016). Desperately seeking grey matter volume changes in sleep apnea: A methodological review of magnetic resonance brain voxel-based morphometry studies. *Sleep Med. Rev.* *25*, 112–120.
- Cervellati, F., Cervellati, C., Romani, A., Cremonini, E., Sticozzi, C., Belmonte, G., Pessina, F., and Valacchi, G. (2014). Hypoxia induces cell damage via oxidative stress in retinal epithelial cells. *Free Radic. Res.* *48*, 303–312.
- Cestelli, A. *et al.* (2001). Functional feature of a novel model of blood brain barrier: studies on permeation of test compounds. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *76*, 139–147.
- Chatard, M., Puech, C., Roche, F., and Perek, N. (2016). Hypoxic Stress Induced by Hydralazine Leads to a Loss of Blood-Brain Barrier Integrity and an Increase in Efflux Transporter Activity. *PLoS One* *11*, e0158010.

Chen, J., Ding, Z., Peng, Y., Pan, F., Li, J., Zou, L., Zhang, Y., and Liang, H. (2014). HIF-1 $\alpha$  inhibition reverses multidrug resistance in colon cancer cells via downregulation of MDR1/P-glycoprotein. *PloS One* 9, e98882.

Chen, J., and Smith, L. E. H. (2007). Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis* 10, 133–140.

Chen, Z. S., Lee, K., and Kruh, G. D. (2001). Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J. Biol. Chem.* 276, 33747–33754.

Chen, Z.-S., Lee, K., Walther, S., Raftogianis, R. B., Kuwano, M., Zeng, H., and Kruh, G. D. (2002). Analysis of methotrexate and folate transport by multidrug resistance protein 4 (ABCC4): MRP4 is a component of the methotrexate efflux system. *Cancer Res.* 62, 3144–3150.

Choi, Y. K., and Kim, K.-W. (2008). Blood-neural barrier: its diversity and coordinated cell-to-cell communication. *BMB Rep.* 41, 345–352.

Cioni, C., Turlizzi, E., Zanelli, U., Oliveri, G., and Annunziata, P. (2012). Expression of Tight Junction and Drug Efflux Transporter Proteins in an in vitro Model of Human Blood-Brain Barrier. *Front. Psychiatry* 3, 47.

Cipolla, M. J., Crete, R., Vitullo, L., and Rix, R. D. (2004). Transcellular transport as a mechanism of blood-brain barrier disruption during stroke. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 9, 777–785.

Cisternino, S., Mercier, C., Bourasset, F., Roux, F., and Scherrmann, J.-M. (2004). Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res.* 64, 3296–3301.

Cohen, Z., Molinatti, G., and Hamel, E. (1997). Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 17, 894–904.

Cohen-Kashi Malina, K., Cooper, I., and Teichberg, V. I. (2009). Closing the gap between the in-vivo and in-vitro blood-brain barrier tightness. *Brain Res.* 1284, 12–21.

Coisne, C. *et al.* (2005). Mouse syngenic in vitro blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 85, 734–746.

Cole, S. P., Bhardwaj, G., Gerlach, J. H., Mackie, J. E., Grant, C. E., Almquist, K. C., Stewart, A. J., Kurz, E. U., Duncan, A. M., and Deeley, R. G. (1992). Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258, 1650–1654.

Cole, S. P., Sparks, K. E., Fraser, K., Loe, D. W., Grant, C. E., Wilson, G. M., and Deeley, R. G. (1994). Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. *Cancer Res.* 54, 5902–5910.

Cordon-Cardo, C., O'Brien, J. P., Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, J. L., Melamed, M. R., and Bertino, J. R. (1989). Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 695–698.

Cucullo, L., Couraud, P.-O., Weksler, B., Romero, I.-A., Hossain, M., Rapp, E., and Janigro, D. (2008). Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: a marriage of convenience for rational neurovascular studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *28*, 312–328.

Cucullo, L., Hossain, M., Puvenna, V., Marchi, N., and Janigro, D. (2011). The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci.* *12*, 40.

Cunningham, S., McColm, J. R., Wade, J., Sedowofia, K., McIntosh, N., and Fleck, B. (2000). A novel model of retinopathy of prematurity simulating preterm oxygen variability in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *41*, 4275–4280.

Dagenais, C., Ducharme, J., and Pollack, G. M. (2001). Uptake and efflux of the peptidic delta-opioid receptor agonist. *Neurosci. Lett.* *301*, 155–158.

Dallas, S., Miller, D. S., and Bendayan, R. (2006). Multidrug resistance-associated proteins: expression and function in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.* *58*, 140–161.

Daneman, R. (2012). The blood-brain barrier in health and disease. *Ann. Neurol.* *72*, 648–672.

Daneman, R., Agalliu, D., Zhou, L., Kuhnert, F., Kuo, C. J., and Barres, B. A. (2009). Wnt/beta-catenin signaling is required for CNS, but not non-CNS, angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 641–646.

Daneman, R., and Prat, A. (2015). The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *7*, a020412.

Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A., and Barres, B. A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* *468*, 562–566.

De Vivo, D. C., Leary, L., and Wang, D. (2002). Glucose transporter 1 deficiency syndrome and other glycolytic defects. *J. Child Neurol.* *17 Suppl 3*, 3S15-23; discussion 3S24-25.

De Vivo, D. C., Trifiletti, R. R., Jacobson, R. I., Ronen, G. M., Behmand, R. A., and Harik, S. I. (1991). Defective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycorrhachia, seizures, and developmental delay. *N. Engl. J. Med.* *325*, 703–709.

Dean, M., Hamon, Y., and Chimini, G. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* *42*, 1007–1017.

DeBault, L. E., and Cancilla, P. A. (1980). gamma-Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science* *207*, 653–655.

Dehouck, M. P., Méresse, S., Delorme, P., Fruchart, J. C., and Cecchelli, R. (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J. Neurochem.* *54*, 1798–1801.

Dejana, E., and Del Maschio, A. (1995). Molecular organization and functional regulation of cell to cell junctions in the endothelium. *Thromb. Haemost.* 74, 309–312.

Deli, M. A., Abrahám, C. S., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2005). Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 59–127.

Dente, C. J., Steffes, C. P., Speyer, C., and Tyburski, J. G. (2001). Pericytes augment the capillary barrier in in vitro cocultures. *J. Surg. Res.* 97, 85–91.

Di Fiore, J. M., Kaffashi, F., Loparo, K., Sattar, A., Schluchter, M., Foglyano, R., Martin, R. J., and Wilson, C. G. (2012). The relationship between patterns of intermittent hypoxia and retinopathy of prematurity in preterm infants. *Pediatr. Res.* 72, 606–612.

Dohgu, S., Takata, F., Yamauchi, A., Nakagawa, S., Egawa, T., Naito, M., Tsuruo, T., Sawada, Y., Niwa, M., and Kataoka, Y. (2005). Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Res.* 1038, 208–215.

Dombrowski, S. M., Desai, S. Y., Marroni, M., Cucullo, L., Goodrich, K., Bingaman, W., Mayberg, M. R., Bengez, L., and Janigro, D. (2001). Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* 42, 1501–1506.

Doyle, L. A., Yang, W., Abruzzo, L. V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A. K., and Ross, D. D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15665–15670.

Dyrna, F., Hanske, S., Krueger, M., and Bechmann, I. (2013). The blood-brain barrier. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* 8, 763–773.

Engelhardt, S., Al-Ahmad, A. J., Gassmann, M., and Ogunshola, O. O. (2014). Hypoxia selectively disrupts brain microvascular endothelial tight junction complexes through a hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) dependent mechanism. *J. Cell. Physiol.* 229, 1096–1105.

Evans, W. H., and Martin, P. E. M. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Mol. Membr. Biol.* 19, 121–136.

Fábián, G., Szabó, C. A., Bozó, B., Greenwood, J., Adamson, P., Deli, M. A., Joó, F., Krizbai, I. A., and Szucs, M. (1998). Expression of G-protein subtypes in cultured cerebral endothelial cells. *Neurochem. Int.* 33, 179–185.

Fandrey, J., and Gassmann, M. (2009). Oxygen sensing and the activation of the hypoxia inducible factor 1 (HIF-1)--invited article. *Adv. Exp. Med. Biol.* 648, 197–206.

Fang, W., Lv, P., Geng, X., Shang, E., Yang, Q., Sha, L., and Li, Y. (2013). Penetration of verapamil across blood brain barrier following cerebral ischemia depending on both paracellular pathway and P-glycoprotein transportation. *Neurochem. Int.* 62, 23–30.

Felix, R. A., and Barrand, M. A. (2002). P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation by transient oxidative stress. *J. Neurochem.* 80, 64–72.

- Felts, P. A., and Smith, K. J. (1996). Blood-brain barrier permeability in astrocyte-free regions of the central nervous system remyelinated by Schwann cells. *Neuroscience* 75, 643–655.
- Fischer, S., Clauss, M., Wiesnet, M., Renz, D., Schaper, W., and Karliczek, G. F. (1999). Hypoxia induces permeability in brain microvessel endothelial cells via VEGF and NO. *Am. J. Physiol.* 276, C812-820.
- Fischer, S., Wobben, M., Kleinstück, J., Renz, D., and Schaper, W. (2000). Effect of astroglial cells on hypoxia-induced permeability in PBMEC cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 279, C935-944.
- Fischer, S., Wobben, M., Marti, H. H., Renz, D., and Schaper, W. (2002). Hypoxia-induced hyperpermeability in brain microvessel endothelial cells involves VEGF-mediated changes in the expression of zonula occludens-1. *Microvasc. Res.* 63, 70–80.
- Franke, H., Galla, H., and Beuckmann, C. T. (2000). Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 5, 248–256.
- Frey, A., Meckelein, B., Weiler-Güttler, H., Möckel, B., Flach, R., and Gassen, H. G. (1991). Pericytes of the brain microvasculature express gamma-glutamyl transpeptidase. *Eur. J. Biochem. FEBS* 202, 421–429.
- Fricker, G., and Miller, D. S. (2004). Modulation of drug transporters at the blood-brain barrier. *Pharmacology* 70, 169–176.
- Gaete, P. S., Lillo, M. A., and Figueroa, X. F. (2014). Functional role of connexins and pannexins in the interaction between vascular and nervous system. *J. Cell. Physiol.* 229, 1336–1345.
- Gallagher, S. A., and Hackett, P. H. (2004). High-altitude illness. *Emerg. Med. Clin. North Am.* 22, 329–355, viii.
- Ganapathy, V., Prasad, P. D., Ganapathy, M. E., and Leibach, F. H. (2000). Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 413–420.
- Gao, B., Hagenbuch, B., Kullak-Ublick, G. A., Benke, D., Aguzzi, A., and Meier, P. J. (2000). Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 294, 73–79.
- Gao, B., Stieger, B., Noé, B., Fritschy, J. M., and Meier, P. J. (1999). Localization of the organic anion transporting polypeptide 2 (Oatp2) in capillary endothelium and choroid plexus epithelium of rat brain. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 47, 1255–1264.
- Ginhoux, F. *et al.* (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841–845.
- Goldbart, A., Row, B. W., Kheirandish, L., Schurr, A., Gozal, E., Guo, S. Z., Payne, R. S., Cheng, Z., Brittan, K. R., and Gozal, D. (2003). Intermittent hypoxic exposure during light

phase induces changes in cAMP response element binding protein activity in the rat CA1 hippocampal region: water maze performance correlates. *Neuroscience* 122, 585–590.

Golden, P. L., and Pardridge, W. M. (1999). P-Glycoprotein on astrocyte foot processes of unfixed isolated human brain capillaries. *Brain Res.* 819, 143–146.

Gozal, E., Sachleben, L. R., Rane, M. J., Vega, C., and Gozal, D. (2005). Mild sustained and intermittent hypoxia induce apoptosis in PC-12 cells via different mechanisms. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288, C535-542.

Haarmann, A., Deiss, A., Prochaska, J., Foerch, C., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.-O., Stoll, G., Rieckmann, P., and Buttmann, M. (2010). Evaluation of soluble junctional adhesion molecule-A as a biomarker of human brain endothelial barrier breakdown. *PLoS One* 5, e13568.

Hackett, P. H., and Roach, R. C. (2004). High altitude cerebral edema. *High Alt. Med. Biol.* 5, 136–146.

Hagenbuch, B., Gao, B., and Meier, P. J. (2002). Transport of Xenobiotics Across the Blood-Brain Barrier. *Physiology* 17, 231–234.

Hagenbuch, B., and Meier, P. J. (2004). Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 447, 653–665.

Haimeur, A., Conseil, G., Deeley, R. G., and Cole, S. P. C. (2004). The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr. Drug Metab.* 5, 21–53.

Haj-Yasein, N. N. *et al.* (2011). Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17815–17820.

Halilagic, A., Ribes, V., Ghyselinck, N. B., Zile, M. H., Dollé, P., and Studer, M. (2007). Retinoids control anterior and dorsal properties in the developing forebrain. *Dev. Biol.* 303, 362–375.

Haseloff, R. F., Blasig, I. E., Bauer, H. C., and Bauer, H. (2005). In search of the astrocytic factor(s) modulating blood-brain barrier functions in brain capillary endothelial cells in vitro. *Cell. Mol. Neurobiol.* 25, 25–39.

Hatherell, K., Couraud, P.-O., Romero, I. A., Weksler, B., and Pilkington, G. J. (2011). Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. *J. Neurosci. Methods* 199, 223–229.

Hawkins, B. T., and Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 57, 173–185.

Hayashi, K., Nakao, S., Nakaoka, R., Nakagawa, S., Kitagawa, N., and Niwa, M. (2004). Effects of hypoxia on endothelial/pericytic co-culture model of the blood-brain barrier. *Regul. Pept.* 123, 77–83.

Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J., and Yamamoto, H. (1997). Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia* 19, 13–26.

He, Y., Yao, Y., Tsirka, S. E., and Cao, Y. (2014). Cell-Culture Models of the Blood-Brain Barrier. *Stroke J. Cereb. Circ.*

Helms, H. C. *et al.* (2016). In vitro models of the blood-brain barrier: An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*

van Herwaarden, A. E., Jonker, J. W., Wagenaar, E., Brinkhuis, R. F., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., and Schinkel, A. H. (2003). The breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) restricts exposure to the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Res.* 63, 6447–6452.

Hofer, T., Wenger, H., and Gassmann, M. (2002). Oxygen sensing, HIF-1alpha stabilization and potential therapeutic strategies. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 443, 503–507.

Honjo, Y., Hrycyna, C. A., Yan, Q. W., Medina-Pérez, W. Y., Robey, R. W., van de Laar, A., Litman, T., Dean, M., and Bates, S. E. (2001). Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res.* 61, 6635–6639.

Hori, S., Ohtsuki, S., Hosoya, K., Nakashima, E., and Terasaki, T. (2004a). A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J. Neurochem.* 89, 503–513.

Hori, S., Ohtsuki, S., Tachikawa, M., Kimura, N., Kondo, T., Watanabe, M., Nakashima, E., and Terasaki, T. (2004b). Functional expression of rat ABCG2 on the luminal side of brain capillaries and its enhancement by astrocyte-derived soluble factor(s). *J. Neurochem.* 90, 526–536.

Horsman, M. R., Nordsmark, M., Høyer, M., and Overgaard, J. (1995). Direct evidence that hydralazine can induce hypoxia in both transplanted and spontaneous murine tumours. *Br. J. Cancer* 72, 1474–1478.

Hu, J.-G., Wang, X.-F., Zhou, J.-S., Wang, F.-C., Li, X.-W., and Lü, H.-Z. (2010). Activation of PKC-alpha is required for migration of C6 glioma cells. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* 70, 239–245.

Huang, C.-F., Li, G., Ma, R., Sun, S.-G., and Chen, J.-G. (2008). Thrombin-induced microglial activation contributes to the degeneration of nigral dopaminergic neurons in vivo. *Neurosci. Bull.* 24, 66–72.

Huber, J. D., Hau, V. S., Borg, L., Campos, C. R., Egleton, R. D., and Davis, T. P. (2002). Blood-brain barrier tight junctions are altered during a 72-h exposure to lambda-carrageenan-induced inflammatory pain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 283, H1531-1537.

Hutamekalin, P. *et al.* (2008). Effect of nicotine and polyaromatic hydrocarbons on cerebral endothelial cells. *Cell Biol. Int.* 32, 198–209.

- Igarashi, Y. *et al.* (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *261*, 108–112.
- Iiff, J. J., Lee, H., Yu, M., Feng, T., Logan, J., Nedergaard, M., and Benveniste, H. (2013). Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J. Clin. Invest.* *123*, 1299–1309.
- Inoko, A., Itoh, M., Tamura, A., Matsuda, M., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Expression and distribution of ZO-3, a tight junction MAGUK protein, in mouse tissues. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *8*, 837–845.
- Ip, M. S. M., Tse, H.-F., Lam, B., Tsang, K. W. T., and Lam, W.-K. (2004). Endothelial function in obstructive sleep apnea and response to treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *169*, 348–353.
- Ishikawa, T., Bao, J. J., Yamane, Y., Akimaru, K., Frindrich, K., Wright, C. D., and Kuo, M. T. (1996). Coordinated induction of MRP/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *J. Biol. Chem.* *271*, 14981–14988.
- Jaakkola, P. *et al.* (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science* *292*, 468–472.
- Jaeger, C. B., and Blight, A. R. (1997). Spinal cord compression injury in guinea pigs: structural changes of endothelium and its perivascular cell associations after blood-brain barrier breakdown and repair. *Exp. Neurol.* *144*, 381–399.
- Jagodinsky, J. C., and Akgun, U. (2015). Characterizing the binding interactions between P-glycoprotein and eight known cardiovascular transport substrates. *Pharmacol. Res. Perspect.* *3*, e00114.
- Janzer, R. C., and Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* *325*, 253–257.
- Jedlitschky, G., Leier, I., Buchholz, U., Hummel-Eisenbeiss, J., Burchell, B., and Keppler, D. (1997). ATP-dependent transport of bilirubin glucuronides by the multidrug resistance protein MRP1 and its hepatocyte canalicular isoform MRP2. *Biochem. J.* *327 ( Pt 1)*, 305–310.
- Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I., and Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem. Res.* *40*, 2583–2599.
- Jian Liu, K., and Rosenberg, G. A. (2005). Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic. Biol. Med.* *39*, 71–80.
- Jiao, H., Wang, Z., Liu, Y., Wang, P., and Xue, Y. (2011). Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. *J. Mol. Neurosci.* *MN 44*, 130–139.
- Jimison, L. H., Tria, S. A., Khodagholy, D., Gurfinkel, M., Lanzarini, E., Hama, A., Malliaras, G. G., and Owens, R. M. (2012). Measurement of barrier tissue integrity with an organic electrochemical transistor. *Adv. Mater. Deerfield Beach Fla* *24*, 5919–5923.

- Jin, B.-J., Smith, A. J., and Verkman, A. S. (2016). Spatial model of convective solute transport in brain extracellular space does not support a “glymphatic” mechanism. *J. Gen. Physiol.* *148*, 489–501.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Smyth, M. J. (2000). Multiple physiological functions for multidrug transporter P-glycoprotein? *Trends Biochem. Sci.* *25*, 1–6.
- Jonker, J. W., Smit, J. W., Brinkhuis, R. F., Maliepaard, M., Beijnen, J. H., Schellens, J. H., and Schinkel, A. H. (2000). Role of breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 1651–1656.
- Juliano, R. L., and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* *455*, 152–162.
- Kage, K., Tsukahara, S., Sugiyama, T., Asada, S., Ishikawa, E., Tsuruo, T., and Sugimoto, Y. (2002). Dominant-negative inhibition of breast cancer resistance protein as drug efflux pump through the inhibition of S-S dependent homodimerization. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *97*, 626–630.
- Kahles, T., Luedike, P., Endres, M., Galla, H.-J., Steinmetz, H., Busse, R., Neumann-Haefelin, T., and Brandes, R. P. (2007). NADPH oxidase plays a central role in blood-brain barrier damage in experimental stroke. *Stroke J. Cereb. Circ.* *38*, 3000–3006.
- Katsuno, T. *et al.* (2008). Deficiency of zonula occludens-1 causes embryonic lethal phenotype associated with defected yolk sac angiogenesis and apoptosis of embryonic cells. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2465–2475.
- Keaney, J., and Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* *282*, 4067–4079.
- Keller, A. (2013). Breaking and building the wall: the biology of the blood-brain barrier in health and disease. *Swiss Med. Wkly.* *143*, w13892.
- Kempinski, O. (2001). Cerebral edema. *Semin. Nephrol.* *21*, 303–307.
- Kerner, N. A., and Roose, S. P. (2016). Obstructive Sleep Apnea is Linked to Depression and Cognitive Impairment: Evidence and Potential Mechanisms. *Am. J. Geriatr. Psychiatry Off. J. Am. Assoc. Geriatr. Psychiatry* *24*, 496–508.
- Kim, L. J., Martinez, D., Fiori, C. Z., Baronio, D., Kretzmann, N. A., and Barros, H. M. T. (2015). Hypomyelination, memory impairment, and blood-brain barrier permeability in a model of sleep apnea. *Brain Res.* *1597*, 28–36.
- Knowles, H. J., Tian, Y.-M., Mole, D. R., and Harris, A. L. (2004). Novel mechanism of action for hydralazine: induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha, vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by inhibition of prolyl hydroxylases. *Circ. Res.* *95*, 162–169.
- Kodaira, H., Kusuhara, H., Ushiki, J., Fuse, E., and Sugiyama, Y. (2010). Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *333*, 788–796.

Kondo, T., Kinouchi, H., Kawase, M., and Yoshimoto, T. (1996). Astroglial cells inhibit the increasing permeability of brain endothelial cell monolayer following hypoxia/reoxygenation. *Neurosci. Lett.* 208, 101–104.

Krizbai, I., Szabó, G., Deli, M., Maderspach, K., Lehel, C., Oláh, Z., Wolff, J. R., and Joó, F. (1995). Expression of protein kinase C family members in the cerebral endothelial cells. *J. Neurochem.* 65, 459–462.

Kruh, G. D., and Belinsky, M. G. (2003). The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* 22, 7537–7552.

Kusuhara, H., Sekine, T., Utsunomiya-Tate, N., Tsuda, M., Kojima, R., Cha, S. H., Sugiyama, Y., Kanai, Y., and Endou, H. (1999). Molecular Cloning and Characterization of a New Multispecific Organic Anion Transporter from Rat Brain. *J. Biol. Chem.* 274, 13675–13680.

Lai, C.-H., and Kuo, K.-H. (2005). The critical component to establish in vitro BBB model: Pericyte. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 50, 258–265.

Lai, F. M., Udenfriend, S., and Spector, S. (1975). Presence of norepinephrine and related enzymes in isolated brain microvessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 4622–4625.

Lee, E. J., Hung, Y. C., and Lee, M. Y. (1999). Early alterations in cerebral hemodynamics, brain metabolism, and blood-brain barrier permeability in experimental intracerebral hemorrhage. *J. Neurosurg.* 91, 1013–1019.

Lee, G., Babakhanian, K., Ramaswamy, M., Prat, A., Wosik, K., and Bendayan, R. (2007). Expression of the ATP-binding cassette membrane transporter, ABCG2, in human and rodent brain microvessel endothelial and glial cell culture systems. *Pharm. Res.* 24, 1262–1274.

Lee, G., Dallas, S., Hong, M., and Bendayan, R. (2001). Drug transporters in the central nervous system: brain barriers and brain parenchyma considerations. *Pharmacol. Rev.* 53, 569–596.

Lee, S.-W., Kim, W. J., Choi, Y. K., Song, H. S., Son, M. J., Gelman, I. H., Kim, Y.-J., and Kim, K.-W. (2003). SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *Nat. Med.* 9, 900–906.

Lee, Y.-J., Kusuhara, H., Jonker, J. W., Schinkel, A. H., and Sugiyama, Y. (2005). Investigation of efflux transport of dehydroepiandrosterone sulfate and mitoxantrone at the mouse blood-brain barrier: a minor role of breast cancer resistance protein. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 312, 44–52.

Leslie, E. M., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (2001). Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 167, 3–23.

Leslie, E. M., Deeley, R. G., and Cole, S. P. C. (2005). Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 204, 216–237.

Leung, J. W. C., Chung, S. S. M., and Chung, S. K. (2009). Endothelial endothelin-1 over-expression using receptor tyrosine kinase tie-1 promoter leads to more severe vascular

permeability and blood brain barrier breakdown after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 1266, 121–129.

Li, G., Simon, M. J., Cancel, L. M., Shi, Z.-D., Ji, X., Tarbell, J. M., Morrison, B., and Fu, B. M. (2010). Permeability of endothelial and astrocyte cocultures: in vitro blood-brain barrier models for drug delivery studies. *Ann. Biomed. Eng.* 38, 2499–2511.

Li, Y., Chen, J., Zeng, T., Lei, D., Chen, L., and Zhou, D. (2014). Expression of HIF-1 $\alpha$  and MDR1/P-glycoprotein in refractory mesial temporal lobe epilepsy patients and pharmacoresistant temporal lobe epilepsy rat model kindled by coriaria lactone. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 35, 1203–1208.

Liebner, S. *et al.* (2008). Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 183, 409–417.

Lim, D. C., and Pack, A. I. (2014). Obstructive sleep apnea and cognitive impairment: addressing the blood-brain barrier. *Sleep Med. Rev.* 18, 35–48.

Linton, K. J., and Higgins, C. F. (2007). Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 453, 555–567.

Lippmann, E. S., Al-Ahmad, A., Azarin, S. M., Palecek, S. P., and Shusta, E. V. (2014). A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources. *Sci. Rep.* 4, 4160.

Loe, D. W., Deeley, R. G., and Cole, S. P. (1998). Characterization of vincristine transport by the M(r) 190,000 multidrug resistance protein (MRP): evidence for cotransport with reduced glutathione. *Cancer Res.* 58, 5130–5136.

Löscher, W., and Potschka, H. (2002). Role of multidrug transporters in pharmacoresistance to antiepileptic drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301, 7–14.

Mark, K. S., and Davis, T. P. (2002). Cerebral microvascular changes in permeability and tight junctions induced by hypoxia-reoxygenation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282, H1485-1494.

Mathiisen, T. M., Lehre, K. P., Danbolt, N. C., and Ottersen, O. P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 58, 1094–1103.

Maxwell, P. H., and Ratcliffe, P. J. (2002). Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13, 29–37.

McAllister, M. S., Krizanac-Bengez, L., Macchia, F., Naftalin, R. J., Pedley, K. C., Mayberg, M. R., Marroni, M., Leaman, S., Stanness, K. A., and Janigro, D. (2001). Mechanisms of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study. *Brain Res.* 904, 20–30.

McCaffrey, G., Staatz, W. D., Sanchez-Covarrubias, L., Finch, J. D., Demarco, K., Laracuate, M.-L., Ronaldson, P. T., and Davis, T. P. (2012). P-glycoprotein trafficking at the blood-brain barrier altered by peripheral inflammatory hyperalgesia. *J. Neurochem.* 122, 962–975.

- Meyer, J., Mischeck, U., Veyhl, M., Henzel, K., and Galla, H. J. (1990). Blood-brain barrier characteristic enzymatic properties in cultured brain capillary endothelial cells. *Brain Res.* *514*, 305–309.
- Mi, H., Haerberle, H., and Barres, B. A. (2001). Induction of astrocyte differentiation by endothelial cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 1538–1547.
- Morken, T. S., Nyman, A. K. G., Sandvig, I., Torp, S. H., Skranes, J., Goa, P. E., Brubakk, A.-M., and Widerøe, M. (2013). Brain development after neonatal intermittent hyperoxia-hypoxia in the rat studied by longitudinal MRI and immunohistochemistry. *PloS One* *8*, e84109.
- Moroz, E., Carlin, S., Dyomina, K., Burke, S., Thaler, H. T., Blasberg, R., and Serganova, I. (2009). Real-time imaging of HIF-1alpha stabilization and degradation. *PloS One* *4*, e5077.
- Msall, M. E. (2006). The retina as a window to the brain in vulnerable neonates. *Pediatrics* *117*, 2287–2289.
- Msall, M. E., Phelps, D. L., DiGaudio, K. M., Dobson, V., Tung, B., McClead, R. E., Quinn, G. E., Reynolds, J. D., Hardy, R. J., and Palmer, E. A. (2000). Severity of neonatal retinopathy of prematurity is predictive of neurodevelopmental functional outcome at age 5.5 years. Behalf of the Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. *Pediatrics* *106*, 998–1005.
- Nagata, Y., Kusuhara, H., Hirono, S., Endou, H., and Sugiyama, Y. (2004). Carrier-Mediated Uptake of H<sub>2</sub>-Receptor Antagonists by the Rat Choroid Plexus: Involvement of Rat Organic Anion Transporter 3. *Drug Metab. Dispos.* *32*, 1040–1047.
- Naik, P., and Cucullo, L. (2012). In vitro blood-brain barrier models: current and perspective technologies. *J. Pharm. Sci.* *101*, 1337–1354.
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Kawaguchi, H., Shimizudani, T., Shimono, T., Kittel, A., Tanaka, K., and Niwa, M. (2009). A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem. Int.* *54*, 253–263.
- Nakagawa, S., Deli, M. A., Nakao, S., Honda, M., Hayashi, K., Nakaoke, R., Kataoka, Y., and Niwa, M. (2007). Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* *27*, 687–694.
- Natah, S. S., Srinivasan, S., Pittman, Q., Zhao, Z., and Dunn, J. F. (2009). Effects of acute hypoxia and hyperthermia on the permeability of the blood-brain barrier in adult rats. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* *107*, 1348–1356.
- Nies, A. T., Jedlitschky, G., König, J., Herold-Mende, C., Steiner, H. H., Schmitt, H.-P., and Keppler, D. (2004). Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* *129*, 349–360.
- Nishitsuji, K., Hosono, T., Nakamura, T., Bu, G., and Michikawa, M. (2011). Apolipoprotein E regulates the integrity of tight junctions in an isoform-dependent manner in an in vitro blood-brain barrier model. *J. Biol. Chem.* *286*, 17536–17542.

- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* *161*, 653–660.
- Noé, B., Hagenbuch, B., Stieger, B., and Meier, P. J. (1997). Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 10346–10350.
- Nourhaghighi, N., Teichert-Kuliszewska, K., Davis, J., Stewart, D. J., and Nag, S. (2003). Altered expression of angiopoietins during blood-brain barrier breakdown and angiogenesis. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *83*, 1211–1222.
- Oby, E., and Janigro, D. (2006). The blood-brain barrier and epilepsy. *Epilepsia* *47*, 1761–1774.
- Ogunshola, O. O. (2011). In vitro modeling of the blood-brain barrier: simplicity versus complexity. *Curr. Pharm. Des.* *17*, 2755–2761.
- Ogunshola, O. O., and Al-Ahmad, A. (2012). HIF-1 at the blood-brain barrier: a mediator of permeability? *High Alt. Med. Biol.* *13*, 153–161.
- Ohtsuki, S., and Terasaki, T. (2007). Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm. Res.* *24*, 1745–1758.
- O’Kane, R. L., Viña, J. R., Simpson, I., Zaragoza, R., Mokashi, A., and Hawkins, R. A. (2006). Cationic amino acid transport across the blood-brain barrier is mediated exclusively by system y<sup>+</sup>. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *291*, E412-419.
- Orlowski, M., Sessa, G., and Green, J. P. (1974). Gamma-glutamyl transpeptidase in brain capillaries: possible site of a blood-brain barrier for amino acids. *Science* *184*, 66–68.
- Pan, W., Yu, Y., Cain, C. M., Nyberg, F., Couraud, P. O., and Kastin, A. J. (2005). Permeation of growth hormone across the blood-brain barrier. *Endocrinology* *146*, 4898–4904.
- Paolinelli, R. *et al.* (2013). Wnt activation of immortalized brain endothelial cells as a tool for generating a standardized model of the blood brain barrier in vitro. *PLoS One* *8*, e70233.
- Paschaki, M., Lin, S.-C., Wong, R. L. Y., Finnell, R. H., Dollé, P., and Niederreither, K. (2012). Retinoic acid-dependent signaling pathways and lineage events in the developing mouse spinal cord. *PLoS One* *7*, e32447.
- Patabendige, A., Skinner, R. A., and Abbott, N. J. (2013). Establishment of a simplified in vitro porcine blood-brain barrier model with high transendothelial electrical resistance. *Brain Res.* *1521*, 1–15.
- Penn, J. S., Henry, M. M., Wall, P. T., and Tolman, B. L. (1995). The range of PaO<sub>2</sub> variation determines the severity of oxygen-induced retinopathy in newborn rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *36*, 2063–2070.

- Perek, N., Le Jeune, N., Denoyer, D., and Dubois, F. (2005). MRP-1 protein expression and glutathione content of in vitro tumor cell lines derived from human glioma carcinoma U-87-MG do not interact with <sup>99m</sup>Tc-glucarate uptake. *Cancer Biother. Radiopharm.* *20*, 391–400.
- Persidsky, Y., Ramirez, S. H., Haorah, J., and Kanmogne, G. D. (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* *1*, 223–236.
- Persidsky, Y., Stins, M., Way, D., Witte, M. H., Weinand, M., Kim, K. S., Bock, P., Gendelman, H. E., and Fiala, M. (1997). A model for monocyte migration through the blood-brain barrier during HIV-1 encephalitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *158*, 3499–3510.
- Petito, C. K. (1979). Early and late mechanisms of increased vascular permeability following experimental cerebral infarction. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *38*, 222–234.
- Petty, M. A., and Wettstein, J. G. (2001). Elements of cerebral microvascular ischaemia. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *36*, 23–34.
- Phillips, S. A., Olson, E. B., Morgan, B. J., and Lombard, J. H. (2004). Chronic intermittent hypoxia impairs endothelium-dependent dilation in rat cerebral and skeletal muscle resistance arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *286*, H388-393.
- Plateel, M., Teissier, E., and Cecchelli, R. (1997). Hypoxia dramatically increases the nonspecific transport of blood-borne proteins to the brain. *J. Neurochem.* *68*, 874–877.
- Polotsky, V. Y., Savransky, V., Bevans-Fonti, S., Reinke, C., Li, J., Grigoryev, D. N., and Shimoda, L. A. (2010). Intermittent and sustained hypoxia induce a similar gene expression profile in human aortic endothelial cells. *Physiol. Genomics* *41*, 306–314.
- Prabhakarandian, B., Shen, M.-C., Nichols, J. B., Mills, I. R., Sidoryk-Wegrzynowicz, M., Aschner, M., and Pant, K. (2013). SyM-BBB: a microfluidic Blood Brain Barrier model. *Lab. Chip* *13*, 1093–1101.
- Prat, A., Biernacki, K., Wosik, K., and Antel, J. P. (2001). Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* *36*, 145–155.
- Rahman, N. A., Rasil, A. N. H. M., Meyding-Lamade, U., Craemer, E. M., Diah, S., Tuah, A. A., and Muharram, S. H. (2016). Immortalized endothelial cell lines for in vitro blood-brain barrier models: A systematic review. *Brain Res.* *1642*, 532–545.
- Rappa, G., Lorico, A., Flavell, R. A., and Sartorelli, A. C. (1997). Evidence that the multidrug resistance protein (MRP) functions as a co-transporter of glutathione and natural product toxins. *Cancer Res.* *57*, 5232–5237.
- Rascher, G., Fischmann, A., Kröger, S., Duffner, F., Grote, E.-H., and Wolburg, H. (2002). Extracellular matrix and the blood-brain barrier in glioblastoma multiforme: spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *104*, 85–91.
- Reese, T. S., and Karnovsky, M. J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* *34*, 207–217.

- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., De Haas, M., Van Deemter, L., Wijnholds, J., Balzarini, J., and Borst, P. (2003a). Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol. Pharmacol.* *63*, 1094–1103.
- Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., and Borst, P. (2003b). The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9244–9249.
- Rock, R. B., and Peterson, P. K. (2006). Microglia as a pharmacological target in infectious and inflammatory diseases of the brain. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* *1*, 117–126.
- Ronaldson, P. T., and Davis, T. P. (2015). Targeting transporters: promoting blood-brain barrier repair in response to oxidative stress injury. *Brain Res.* *1623*, 39–52.
- Rosenberg, G. A. (2012). Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *32*, 1139–1151.
- Roux, F., Durieu-Trautmann, O., Chaverot, N., Claire, M., Mailly, P., Bourre, J. M., Strosberg, A. D., and Couraud, P. O. (1994). Regulation of gamma-glutamyl transpeptidase and alkaline phosphatase activities in immortalized rat brain microvessel endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* *159*, 101–113.
- Rubin, L. L., Hall, D. E., Porter, S., Barbu, K., Cannon, C., Horner, H. C., Janatpour, M., Liaw, C. W., Manning, K., and Morales, J. (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* *115*, 1725–1735.
- Ruchoux, M.-M., Brulin, P., Brillault, J., Dehouck, M.-P., Cecchelli, R., and Bataillard, M. (2002). Lessons from CADASIL. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *977*, 224–231.
- Ryan, S., Taylor, C. T., and McNicholas, W. T. (2005). Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome. *Circulation* *112*, 2660–2667.
- Saez, J. C., Berthoud, V. M., Branes, M. C., Martinez, A. D., and Beyer, E. C. (2003). Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol. Rev.* *83*, 1359–1400.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J. D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell* *11*, 4131–4142.
- Sakakibara, A., Furuse, M., Saitou, M., Ando-Akatsuka, Y., and Tsukita, S. (1997). Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell Biol.* *137*, 1393–1401.
- Sandoval, K. E., and Witt, K. A. (2008). Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol. Dis.* *32*, 200–219.

- Sano, Y. *et al.* (2010). Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an *in vivo* blood-brain barrier function. *J. Cell. Physiol.* 225, 519–528.
- Santaguida, S., Janigro, D., Hossain, M., Oby, E., Rapp, E., and Cucullo, L. (2006). Side by side comparison between dynamic versus static models of blood-brain barrier *in vitro*: a permeability study. *Brain Res.* 1109, 1–13.
- Saunamäki, T., Himanen, S.-L., Polo, O., and Jehkonen, M. (2009). Executive dysfunction in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *Eur. Neurol.* 62, 237–242.
- Savettieri, G. *et al.* (2000). Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *Neuroreport* 11, 1081–1084.
- Schiera, G., Sala, S., Gallo, A., Raffa, M. P., Pitarresi, G. L., Savettieri, G., and Di Liegro, I. (2005). Permeability properties of a three-cell type *in vitro* model of blood-brain barrier. *J. Cell. Mol. Med.* 9, 373–379.
- Schinkel, A. H., and Jonker, J. W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55, 3–29.
- Schneeberger, E. E., and Lynch, R. D. (2004). The tight junction: a multifunctional complex. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 286, C1213–1228.
- Schoch, H. J., Fischer, S., and Marti, H. H. (2002). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain J. Neurol.* 125, 2549–2557.
- Schuetz, J. D., Connelly, M. C., Sun, D., Paibir, S. G., Flynn, P. M., Srinivas, R. V., Kumar, A., and Fridland, A. (1999). MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nat. Med.* 5, 1048–1051.
- Seelig, A., Blatter, X. L., and Wohnsland, F. (2000). Substrate recognition by P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein MRP1: a comparison. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 38, 111–121.
- Semenza, G. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 64, 993–998.
- Sforza, E., Roche, F., Thomas-Anterion, C., Kerleroux, J., Beauchet, O., Celle, S., Maudoux, D., Pichot, V., Laurent, B., and Barthélémy, J. C. (2010). Cognitive function and sleep related breathing disorders in a healthy elderly population: the SYNAPSE study. *Sleep* 33, 515–521.
- Sharom, F. J. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* 50, 161–178.
- Siddharthan, V., Kim, Y. V., Liu, S., and Kim, K. S. (2007). Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res.* 1147, 39–50.

Simpson, I. A., Carruthers, A., and Vannucci, S. J. (2007). Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1766–1791.

Sin, D. D., Fitzgerald, F., Parker, J. D., Newton, G., Floras, J. S., and Bradley, T. D. (1999). Risk factors for central and obstructive sleep apnea in 450 men and women with congestive heart failure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 160, 1101–1106.

Smith, J. P., and Drewes, L. R. (2006). Modulation of monocarboxylic acid transporter-1 kinetic function by the cAMP signaling pathway in rat brain endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 281, 2053–2060.

Sobue, K. *et al.* (1999). Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. *Neurosci. Res.* 35, 155–164.

Stamatovic, S. M., Shaku, P., Keep, R. F., Moore, B. B., Kunkel, S. L., Van Rooijen, N., and Andjelkovic, A. V. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 25, 593–606.

Steiner, E., Enzmann, G. U., Lyck, R., Lin, S., Rüegg, M. A., Kröger, S., and Engelhardt, B. (2014). The heparan sulfate proteoglycan agrin contributes to barrier properties of mouse brain endothelial cells by stabilizing adherens junctions. *Cell Tissue Res.* 358, 465–479.

Stewart, P. A., and Wiley, M. J. (1981). Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: a study using quail--chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.* 84, 183–192.

Sweet, D. H., Chan, L. M. S., Walden, R., Yang, X.-P., Miller, D. S., and Pritchard, J. B. (2003). Organic anion transporter 3 (Slc22a8) is a dicarboxylate exchanger indirectly coupled to the Na<sup>+</sup> gradient. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 284, F763–F769.

Takeshita, Y., Obermeier, B., Coteleur, A., Sano, Y., Kanda, T., and Ransohoff, R. M. (2014). An in vitro blood-brain barrier model combining shear stress and endothelial cell/astrocyte co-culture. *J. Neurosci. Methods* 232, 165–172.

Tao-Cheng, J. H., and Brightman, M. W. (1988). Development of membrane interactions between brain endothelial cells and astrocytes in vitro. *Int. J. Dev. Neurosci. Off. J. Int. Soc. Dev. Neurosci.* 6, 25–37.

Tarbell, J. M. (2010). Shear stress and the endothelial transport barrier. *Cardiovasc. Res.* 87, 320–330.

Thanabalasundaram, G., Pieper, C., Lischper, M., and Galla, H.-J. (2010). Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain Res.* 1347, 1–10.

Thomsen, L. B., Burkhart, A., and Moos, T. (2015). A Triple Culture Model of the Blood-Brain Barrier Using Porcine Brain Endothelial cells, Astrocytes and Pericytes. *PloS One* 10, e0134765.

- Tilling, T., Engelbertz, C., Decker, S., Korte, D., Hüwel, S., and Galla, H.-J. (2002). Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures. *Cell Tissue Res.* 310, 19–29.
- Tong, X. K., and Hamel, E. (1999). Regional cholinergic denervation of cortical microvessels and nitric oxide synthase-containing neurons in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 92, 163–175.
- Tontsch, U., and Bauer, H. C. (1991). Glial cells and neurons induce blood-brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res.* 539, 247–253.
- Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J., and Terasaki, T. (2011). Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J. Neurochem.* 117, 333–345.
- Ueno, M., Nakagawa, T., Huang, C. –, Ueki, M., Kusaka, T., Hosomi, N., Kanenishi, K., Onodera, M., Wu, B., and Sakamoto, H. (2009). The expression of P-glycoprotein is increased in vessels with blood-brain barrier impairment in a stroke-prone hypertensive model. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 35, 147–155.
- Vandenhoute, E., Dehouck, L., Boucau, M.-C., Sevin, E., Uzbekov, R., Tardivel, M., Gosselet, F., Fenart, L., Cecchelli, R., and Dehouck, M.-P. (2011). Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes. *Curr. Neurovasc. Res.* 8, 258–269.
- Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D. W. (2009). Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum. Genomics* 3, 281–290.
- Vaucher, E., Tong, X. K., Cholet, N., Lantin, S., and Hamel, E. (2000). GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow. *J. Comp. Neurol.* 421, 161–171.
- Venneti, S., Wiley, C. A., and Kofler, J. (2009). Imaging microglial activation during neuroinflammation and Alzheimer's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* 4, 227–243.
- Verges, S., Rupp, T., Villien, M., Lamalle, L., Troprés, I., Poquet, C., Warnking, J. M., Estève, F., Bouzat, P., and Krainik, A. (2016). Multiparametric Magnetic Resonance Investigation of Brain Adaptations to 6 Days at 4350 m. *Front. Physiol.* 7, 393.
- Veszelka, S., Pásztói, M., Farkas, A. E., Krizbai, I., Ngo, T. K. D., Niwa, M., Abrahám, C. S., and Deli, M. A. (2007). Pentosan polysulfate protects brain endothelial cells against bacterial lipopolysaccharide-induced damages. *Neurochem. Int.* 50, 219–228.
- Vu, K., Weksler, B., Romero, I., Couraud, P.-O., and Gelli, A. (2009). Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot. Cell* 8, 1803–1807.
- Wagner, E. F., and Risau, W. (1994). Oncogenes in the study of endothelial cell growth and differentiation. *Semin. Cancer Biol.* 5, 137–145.

- Wang, G., Hazra, T. K., Mitra, S., Lee, H. M., and Englander, E. W. (2000). Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl<sub>2</sub> in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic Acids Res.* *28*, 2135–2140.
- Wang, G. L., and Semenza, G. L. (1993). Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *J. Biol. Chem.* *268*, 21513–21518.
- Wang, Y., Tang, Z., Xue, R., Singh, G. K., Liu, W., Lv, Y., and Yang, L. (2012). Differential response to CoCl<sub>2</sub>-stimulated hypoxia on HIF-1 $\alpha$ , VEGF, and MMP-2 expression in ligament cells. *Mol. Cell. Biochem.* *360*, 235–242.
- Watanabe, T., Dohgu, S., Takata, F., Nishioku, T., Nakashima, A., Futagami, K., Yamauchi, A., and Kataoka, Y. (2013). Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. *Biol. Pharm. Bull.* *36*, 492–495.
- Weidenfeller, C., Svendsen, C. N., and Shusta, E. V. (2007). Differentiating embryonic neural progenitor cells induce blood-brain barrier properties. *J. Neurochem.* *101*, 555–565.
- Weksler, B. B. *et al.* (2005). Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 1872–1874.
- Wielinga, P. R., van der Heijden, I., Reid, G., Beijnen, J. H., Wijnholds, J., and Borst, P. (2003). Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J. Biol. Chem.* *278*, 17664–17671.
- Wilhelm, I., Fazakas, C., and Krizbai, I. A. (2011). In vitro models of the blood-brain barrier. *Acta Neurobiol. Exp. (Warsz.)* *71*, 113–128.
- Wilhelm, I., and Krizbai, I. A. (2014). In vitro models of the blood-brain barrier for the study of drug delivery to the brain. *Mol. Pharm.* *11*, 1949–1963.
- Williams, E. J., Williams, G., Howell, F. V., Skaper, S. D., Walsh, F. S., and Doherty, P. (2001). Identification of an N-cadherin motif that can interact with the fibroblast growth factor receptor and is required for axonal growth. *J. Biol. Chem.* *276*, 43879–43886.
- Winkler, E. A., Bell, R. D., and Zlokovic, B. V. (2011). Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat. Neurosci.* *14*, 1398–1405.
- Wolburg, H., Neuhaus, J., Kniesel, U., Krauss, B., Schmid, E. M., Ocalan, M., Farrell, C., and Risau, W. (1994). Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J. Cell Sci.* *107* ( Pt 5), 1347–1357.
- Wong, A. D., Ye, M., Levy, A. F., Rothstein, J. D., Bergles, D. E., and Searson, P. C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front. Neuroengineering* *6*, 7.
- Wuest, D. M., and Lee, K. H. (2012). Optimization of endothelial cell growth in a murine in vitro blood-brain barrier model. *Biotechnol. J.* *7*, 409–417.
- Wuest, D. M., Wing, A. M., and Lee, K. H. (2013). Membrane configuration optimization for a murine in vitro blood-brain barrier model. *J. Neurosci. Methods* *212*, 211–221.

Xia, X., and Kung, A. L. (2009). Preferential binding of HIF-1 to transcriptionally active loci determines cell-type specific response to hypoxia. *Genome Biol.* *10*, R113.

Xiao-Dong, L., Zhi-Hong, Y., and Hui-Wen, Y. (2008). Repetitive/temporal hypoxia increased P-glycoprotein expression in cultured rat brain microvascular endothelial cells in vitro. *Neurosci. Lett.* *432*, 184–187.

Xue, Q., Liu, Y., Qi, H., Ma, Q., Xu, L., Chen, W., Chen, G., and Xu, X. (2013). A novel brain neurovascular unit model with neurons, astrocytes and microvascular endothelial cells of rat. *Int. J. Biol. Sci.* *9*, 174–189.

Yaggi, H. K., Concato, J., Kernan, W. N., Lichtman, J. H., Brass, L. M., and Mohsenin, V. (2005). Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death. *N. Engl. J. Med.* *353*, 2034–2041.

Yamane, Y., Furuichi, M., Song, R., Van, N. T., Mulcahy, R. T., Ishikawa, T., and Kuo, M. T. (1998). Expression of multidrug resistance protein/GS-X pump and gamma-glutamylcysteine synthetase genes is regulated by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* *273*, 31075–31085.

Yang, F., Zhou, L., Wang, D., Wang, Z., and Huang, Q.-Y. (2015). Minocycline ameliorates hypoxia-induced blood-brain barrier damage by inhibition of HIF-1 $\alpha$  through SIRT-3/PHD-2 degradation pathway. *Neuroscience* *304*, 250–259.

Yang, S.-J., Pyen, J., Lee, I., Lee, H., Kim, Y., and Kim, T. (2004). Cobalt chloride-induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation in rat C6 glioma cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* *37*, 480–486.

Yao, Y., Chen, Z.-L., Norris, E. H., and Strickland, S. (2014). Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity. *Nat. Commun.* *5*, 3413.

Yeh, W.-L., Lu, D.-Y., Lin, C.-J., Liou, H.-C., and Fu, W.-M. (2007). Inhibition of hypoxia-induced increase of blood-brain barrier permeability by YC-1 through the antagonism of HIF-1 $\alpha$  accumulation and VEGF expression. *Mol. Pharmacol.* *72*, 440–449.

Yeon, J. H., Na, D., Choi, K., Ryu, S.-W., Choi, C., and Park, J.-K. (2012). Reliable permeability assay system in a microfluidic device mimicking cerebral vasculatures. *Biomed. Microdevices* *14*, 1141–1148.

Youdim, K. A., Qaiser, M. Z., Begley, D. J., Rice-Evans, C. A., and Abbott, N. J. (2004). Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* *36*, 592–604.

Zehendner, C. M., Librizzi, L., Hedrich, J., Bauer, N. M., Angamo, E. A., de Curtis, M., and Luhmann, H. J. (2013). Moderate hypoxia followed by reoxygenation results in blood-brain barrier breakdown via oxidative stress-dependent tight-junction protein disruption. *PLoS One* *8*, e82823.

Zenker, D., Begley, D., Bratzke, H., Rübtsamen-Waigmann, H., and von Briesen, H. (2003). Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. *J. Physiol.* *551*, 1023–1032.

Zhang, Z., McGoron, A. J., Crumpler, E. T., and Li, C.-Z. (2011). Co-culture based blood-brain barrier in vitro model, a tissue engineering approach using immortalized cell lines for drug transport study. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 163, 278–295.

Zhao, R., Raub, T. J., Sawada, G. A., Kasper, S. C., Bacon, J. A., Bridges, A. S., and Pollack, G. M. (2009). Breast cancer resistance protein interacts with various compounds in vitro, but plays a minor role in substrate efflux at the blood-brain barrier. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 37, 1251–1258.

Zhu, Y., Fenik, P., Zhan, G., Mazza, E., Kelz, M., Aston-Jones, G., and Veasey, S. C. (2007). Selective loss of catecholaminergic wake active neurons in a murine sleep apnea model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 10060–10071.

del Zoppo, G. J., and Hallenbeck, J. M. (2000). Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.* 98, 73–81.

## Synthèse de mes travaux effectués durant ma thèse

### Article Publié

- Hypoxic Stress Induced by Hydralazine Leads to a Loss of Blood-Brain Barrier Integrity and an increase in Efflux Transporter Activity. **M.Chatard**, C.Puech, F.Roche, N.Perek ; Plos One, 2016.

### Articles soumis

- Hydralazine is the best mimetic agent of hypoxia to study the impact of hypoxic stress on blood-brain barrier model. **M.Chatard**, C.Puech, N.Perek, F.Roche. *soumis dans la revue Cellular Physiology and Biochemistry (en révision)*
- Blood-brain barrier cells progressively lose tight junction protein expression after repetitive hypoxic stress and set up defense mechanisms by increasing ABC transporter activities. **M.Chatard**, S.Palle, F.Roche, N.Perek. *soumis dans la revue Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism.*

### Communications affichées

- Congrès du sommeil, Lille 2014 : Conséquences d'une hypoxie chimique sur un modèle de barrière hémato-encéphalique (BHE) in vitro. **Chatard M**, Perek N et Roche F. **Bourse voyage SFRMS jeune chercheur.**
- Congrès de Physiologie et de Biologie Intégrative, Strasbourg 2015 : Effects of hypoxia/normoxia cycles on membrane integrity in rodent in vitro blood-brain barrier model. **Chatard M**, Perek N et Roche F.
- Journée de l'EDSIS 488, 2015 : Effets d'inductions répétées de HIF 1 $\alpha$  sur l'intégrité membranaire d'un nouveau modèle in vitro de barrière hémato-encéphalique (BHE). **Chatard M**, Roche F, Perek N.
- Journée de l'Académie Française de Médecine, Mai 2016, Saint-Etienne : « Conséquences de stress hypoxiques répétés sur l'intégrité d'un modèle in vitro de BHE. **M.Chatard**, C.Puech, N.Perek, F.Roche ».
- Congrès The American Physiological Society and European Physiological Society, Juin 2016, Dublin : « In vitro studies of impact of repeated hypoxic stress on transendothelial transport mediated efflux pumps Pgp and MRP-1 of blood-brain barrier co-culture model. **M.Chatard**, C.Puech, N.Perek, F.Roche ».

## Communications orales

- Early Career Physiologists' Symposium du Congrès The American Physiological Society and European Physiological Society, Juin 2016, Dublin : « Impact of repeated hypoxic stress on transendothelial transport mediated efflux pumps P-glycoprotein (Pgp) and MRP-1 on blood-brain barrier co-culture model. **M.Chatard**, C.Puech, N.Perek, F.Roche ».
- 18th International Conference on Cerebral Vascular Biology and Medicine, Septembre 2016, Londres : « An original and suitable induction method of repeated hypoxic stress by hydralazine to investigate the integrity of an in vitro blood-brain barrier model. **M.Chatard**, C.Puech, N.Perek, F.Roche ». **Prix de la meilleure communication orale.**



## ABSTRACT

The blood-brain barrier (BBB) is the essential structure of the central nervous system (CNS), located at the level of brain capillaries. The BBB is responsible for the maintenance of cerebral homeostasis and its protection. Indeed, diseases affecting the CNS are often related to a disorder at the BBB's site. One of the several factors which can alter the homeostasis of the CNS, is hypoxia because the brain is one of the the first consumer of oxygen of the body. Several studies showed that acute hypoxia (mimic transient brain ischemia or stroke), could alter BBB permeability. However, some disorders are related to intermittent hypoxia, particularly sleep related breathing disorders, such as sleep apnea syndrome. This intermittent hypoxia does not seem to be innocent on the brain structure and function, since studies in humans have demonstrated that these patients suffer from cognitive disorders. The challenge in the study of such pathologies is represented by a better understanding of mechanisms leading to this alteration, in order to develop adequate therapeutic strategies. Nevertheless, few studies have focused, to date, on the impact of intermittent hypoxia on the BBB, due to the complexity of the brain structure *in vivo*. In this regard, *in vitro* BBB model appear to be suitable tools for the study of BBB in pathologies conditions. The aim of this thesis was to set up an *in vitro* BBB model suitable for the study of BBB's integrity after repeated hypoxic stress exposure.

Our proposed *in vitro* model is a contact co-culture model composed of mouse immortalized cerebral endothelial cells and rat immortalized astrocytes. Indeed, several studies showed the importance of interactions between astrocytes and endothelial cells in the establishment of the BBB barrier phenotype. We have developed a murine model in order to be in line with studies carried out in mice in the laboratory. This model was characterized in terms of TEER, membrane permeability, tight junction proteins and efflux transporters. This model meets the expected criteria for an *in vitro* BBB model and it is fast to set up.

The cellular impact of intermittent hypoxia is difficult to investigate *in vitro* because it is rapidly reverted. Therefore, we have set up an alternative induction method of hypoxic stress by a chemical agent, hydralazine, which is reproducible, controllable and reversible, in order to study the cellular and molecular mechanisms induced by activation of an hypoxic pathway at the BBB level. This method was validated by comparison with physical hypoxia exposure of the same BBB model. Results showed that HIF-1 $\alpha$  induction (hypoxia factor) was similar between induction by hydralazine or using physical hypoxia. Then we studied the impact of repeated hypoxic stress on BBB's integrity during 24 hours exposure. Our results showed that repeated hypoxic stress progressively altered the paracellular pathway of endothelial cells by decreasing the expression of tight junction proteins in our model. Moreover, transcellular pathway was also affected because the activity of efflux transporters was gradually increased.

This work presents an alternative induction method of hypoxia which is controllable and reproducible over time. In addition, it is the first *in vitro* study that investigates the consequences of repeated hypoxic stress on the integrity of BBB. This work allowed to bring us primary answers on cellular and molecular mechanisms potentially involved in pathologies related to repeated hypoxic stress.

**Key words** : blood-brain barrier, hydralazine, repeated hypoxia, *in vitro* model, integrity