



HAL
open science

Découverte de nouveaux récepteurs capables de médier la transcytose à travers la barrière hémato-encéphalique

Céline Cegarra

► **To cite this version:**

Céline Cegarra. Découverte de nouveaux récepteurs capables de médier la transcytose à travers la barrière hémato-encéphalique. Neurosciences. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP5052 . tel-04090118

HAL Id: tel-04090118

<https://theses.hal.science/tel-04090118v1>

Submitted on 5 May 2023

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

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

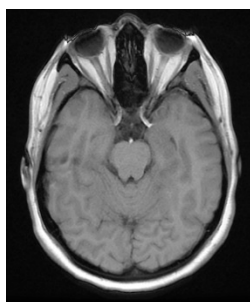


Université Paris Cité

Sanofi

Ecole doctorale Médicament-Toxicologie-Chimie-Imageries N°563

UMR_S1144 Optimisation thérapeutique en Neuropsychopharmacologie (OPteN)



*Découverte de nouveaux récepteurs
capables de médier la transcytose à
travers la barrière hémato-encéphalique*

Par Céline Grassart Cegarra



Thèse de doctorat spécialité : Neurosciences

Dirigée par : Pr Xavier Declèves et travaux supervisés par : Dr Dominique Lesuisse

Présentée le 06 juillet 2022, devant le jury composé de :

Directeur de thèse : Pr Xavier Declèves, PU-PH, Université Paris Cité

Rapporteurs : Pr Fabien Gosselet, PU, Université d'Artois
Pr Guilhem Bousquet, PU-PH, Université Sorbonne Paris Nord

Examineurs : Dr Julie Guignot, PhD, CR, Université Paris Cité
Dr Pierre Lafaye, PhD-HDR, Institut Pasteur
Dr Dominique Lesuisse, PhD-HDR, Sanofi

Illustration : coupe transversale de cerveau humain vue en IRM

Remerciements

Je remercie le personnel de l'Université Paris Cité, de la Validation des Acquis de l'Expérience (VAE) doctorale et de l'école doctorale, d'avoir accepté mon dossier et de m'avoir aidée dans mes démarches administratives.

Je remercie Transitions-Pro Ile de France d'avoir financé ma VAE doctorale.

Je remercie Laurent Sovet pour son accompagnement du descriptif de mon parcours professionnel.

Je remercie Xavier Declèves d'avoir accepté de superviser mon doctorat en VAE.

Je remercie les membres du jury : Julie Guignot, Fabien Gosselet, Guilhem Bousquet, Pierre Lafaye d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie Laurent et Isabel pour les relectures de mes articles.

Je remercie Nicolas Basse pour ses conseils et son soutien dans le cadre d'un mentorat dédié à la rédaction de ce doctorat.

Je remercie l'équipe BBB de Sanofi : Valérie, Catarina et Minh pour leur aide dans les travaux, leur soutien sans faille, les bons moments au labo et en voyage. Je remercie Minh de m'avoir formée aux techniques de la BHE.

Je remercie tous les collègues de la neuro pour leur soutien à toutes les étapes de mon parcours : Carmen, Philippe, Mati, Valérie et Carine pour mon CV. Werner pour tous nos échanges et pour avoir partagé mon bureau toutes ces années. Elizabeth, Patricia, Anne, Sylvie, Irène et Werner pour les derniers instants de la neuro.

Je remercie tous les copains qui rendent la vie sympathique et agréable au labo : Alex, Valérie, Catarina, Carine, Stéphanie, Werner.

Je remercie très chaleureusement Dominique qui m'a proposé de rejoindre son équipe en 2016 et qui m'a permis d'évoluer énormément sur les plans personnel et professionnel. J'ai découvert un sujet passionnant en travaillant sur la BHE, qu'avec de la volonté on peut tout faire, qu'il y a toujours une solution. J'ai vraiment aimé travailler avec Dominique et je la remercie du fond du cœur de m'avoir soutenue plus qu'à plein temps dans cette démarche de doctorat et dans la rédaction.

Enfin, je voudrais remercier mon mari, mon amour, sans son soutien absolu je n'y serai pas arrivée. Merci de m'avoir remis sur pieds tant de fois et de m'avoir laissé beaucoup de temps ces dernières années en prenant tout en charge à la maison.

Publications

Publiées

Non-Human Primate Blood Brain Barrier and *In vitro* Brain Endothelium: From Transcriptome to the Establishment of a New Model

Catarina Chaves; Tuan-Minh Do; Céline Cegarra; Valérie Roudières; Sandrine Tolou; Gilbert Thill; Corinne Rocher; Michel Didier; Dominique Lesuisse

Pharmaceutics

doi:10.3390/pharmaceutics12100967

Exploring ITM2A as a new potential target for brain delivery

Céline Cegarra; Catarina Chaves; Catherine Déon; Tuan-Minh Do; Bruno Dumas; André Frenzel; Philipp Kuhn; Valérie Roudières; Jean-Claude Guillemot; Dominique Lesuisse

Fluids and Barriers of the CNS

doi.org/10.1186/s12987-022-00321-3

Soumise

Journal ciblé : Plos One

Integrins and brain delivery of antibodies

Céline Cegarra; Béatrice Cameron; Catarina Chaves; Tarik Dabdoubi; Tuan-Minh Do; Bruno Genêt; Valérie Roudières; Patricia Tchepikoff; Yi Shi; Dominique Lesuisse

Discovery of new receptors mediating transcytosis across the blood-brain barrier

Abstract

The blood-brain barrier is extremely selective to protect the brain from xenobiotics in systemic circulation. These physiological properties are linked to the cerebral microvascular endothelial cells. This brain protection is a major drawback to treat cerebral pathologies with biotherapeutics and specifically with antibodies. The best current strategy to cross the blood-brain barrier with antibodies is the "Trojan horse" strategy, making use of receptors mediating transcytosis across the blood-brain barrier. A common drawback of these receptors mediating transcytosis is that they are ubiquitous.

The objective of the work presented here was to find new receptors mediating transcytosis through the blood brain barrier.

We have established and characterized new *in vitro* blood-brain barrier models with primary microvascular cerebral endothelial cells from non-human primates. Then we experimented two different strategies to find new receptors mediating transcytosis.

Firstly, we used the results of a transcriptomic and proteomic study which led us to explore the ITM2A target. The low expression of this protein in mice prevented us to demonstrate a potential "Trojan horse" property. We were able to highlight some pitfalls of transcriptomic studies and the challenge of validating new receptor-mediating transcytosis targets at the blood brain barrier.

Secondly, we immunized mice with cerebral microvascular endothelial cells from primates. The resulting immune library was screened in our *in vitro* models to select transcytosed antibodies. The targets of our antibodies were deconvoluted to identify their receptor. Among these, we have identified a subfamily of beta1 integrins. This is the first report of anti-beta1 antibodies able to perform transcytosis. Thus, we have demonstrated the possibility of implementing this innovative strategy, and highlighted improvements to be done to generate even more relevant results.

Key words: Blood Brain Barrier, transcytosis, antibodies, *in vitro* models, ITM2A, integrins

Découverte de nouveaux récepteurs capables de médier la transcytose à travers la barrière hémato-encéphalique

Résumé

La barrière hémato-encéphalique est extrêmement sélective pour protéger le cerveau des xénobiotiques présents dans la circulation systémique. Ces propriétés physiologiques sont liées aux cellules endothéliales microvasculaires cérébrales qui la constituent. Cette protection du cerveau peut être un obstacle lorsque l'on veut soigner des pathologies cérébrales avec des biothérapeutiques et notamment des anticorps. Une stratégie répandue pour traverser la barrière hématoencéphalique avec des anticorps est la technique du « cheval de Troie ». Elle utilise des récepteurs qui ont la capacité de médier la transcytose à travers la barrière hémato-encéphalique. Leur inconvénient commun est qu'ils sont ubiquitaires.

L'objectif des travaux présentés ici est de trouver de nouveaux récepteurs capables de médier la transcytose à travers la barrière hémato-encéphalique.

Nous avons établi et caractérisé de nouveaux modèles de barrière hémato-encéphalique *in vitro* avec des cellules primaires endothéliales microvasculaires cérébrales de primates non humains. Puis nous avons expérimenté deux stratégies différentes pour trouver de nouveaux récepteurs médiant la transcytose.

Avec la première stratégie, nous avons utilisé les résultats d'une étude transcriptomique et protéomique qui nous ont conduit à explorer la cible ITM2A. Cette protéine étant finalement peu exprimée chez la souris, nous n'avons pas pu mettre en évidence un potentiel d'utilisation comme « cheval de Troie ». Cette étude nous a permis de mettre en évidence certains écueils liés aux études transcriptomiques et la difficulté de valider de nouvelles cibles capables de médier la transcytose.

Avec la seconde étude, nous avons immunisé des souris avec des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de primates pour obtenir une banque immune que nous avons criblée dans nos modèles *in vitro* pour sélectionner les anticorps transcytosés. Ensuite, nous avons déconvolué les cibles des anticorps pour retrouver leurs récepteurs. Nous avons identifié une sous-famille d'intégrines beta1. Ceci est le premier exemple d'anticorps anti-intégrine beta1 capables de médier la transcytose. Ainsi, nous avons démontré la possibilité de mise en œuvre de cette stratégie innovante, tout en mettant en évidence les points d'amélioration pour aboutir à des résultats encore plus pertinents.

Mots clés : Barrière hémato-encéphalique, transcytose, anticorps, modèles *in vitro*, ITM2A, intégrines

Table des matières

1	Introduction.....	17
1.1	La barrière hémato-encéphalique.....	17
1.1.1	Mise en évidence.....	17
1.1.2	Structure.....	21
1.1.3	Propriétés physiques de la BHE.....	30
1.1.4	Mécanismes de passage de la BHE.....	33
1.1.5	Les modèles <i>in vitro</i> de BHE.....	38
1.1.6	Biothérapeutiques : les anticorps.....	50
1.2	Stratégies d'administration de molécules dans le compartiment cérébral.....	55
1.2.1	Administration intracérébrale.....	56
1.2.2	Administration intranasale.....	58
1.2.3	Ultrasons focalisés.....	58
1.2.4	Ajout de charges positives sur les biothérapeutiques.....	60
1.2.5	Transcytose d'anticorps via les RMT.....	60
1.3	Stratégies utilisées pour découvrir de nouveaux mécanismes pour franchir la BHE.....	66
1.3.1	Omique.....	67
1.3.2	Phage display.....	95
1.3.3	Immunisation.....	104
2	Objectif : application de différentes stratégies pour identifier de nouveaux récepteurs capables de médier la transcytose à travers la BHE.....	110
3	Travaux expérimentaux.....	111
3.1	Cellules endothéliales et modèles de BHE <i>in vitro</i>	112
3.1.1	Introduction.....	112
3.1.2	Matériels et Méthodes.....	112
3.1.3	Résultats.....	119
3.1.4	Discussion.....	138
3.1.5	Publication.....	143

3.2	Approche transcriptomique via un consortium européen IMI COMPACT : Etude d'ITM2A	169
3.3	Approche par immunisation : Découverte d'une nouvelle famille de récepteurs médiant la transcytose : les intégrines	189
4	Discussion Générale	264
4.1	Objectifs.....	264
4.2	Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales primaires et modèles de BHE <i>in vitro</i>	264
4.3	Stratégie transcriptomique	267
4.4	Stratégie immunisation	268
4.5	Conclusions	270
5	Références	272

Table des illustrations

Figure 1 : Illustration de la mise en évidence d'une BHE	18
Figure 2 : Cerveau d'une souris injectée en intraveineux avec HRP	19
Figure 3: Moulage en cire du réseau vasculaire constituant la BHE	20
Figure 4: Composants de la BHE.....	21
Figure 5 : Image de microscopie confocale d'un microvaisseau de rat entouré de pieds astrocytaires	27
Figure 6: Structure anatomique de la BHE.	23
Figure 7: Jonctions de la BHE avec la lame basale des microvaisseaux cérébraux.....	25
Figure 8 : Représentation schématique de la membrane basale	29
Figure 9 : Méthode de mesure du TEER.	31
Figure 10: Mécanisme de passage de la BHE.....	37
Figure 11: Schéma d'un dispositif Transwell®.	39
Figure 12 : Evolution du TEER au cours d'une culture	40
Figure 13 : Modèles de BHE <i>in vitro</i> sur des Transwell®.....	43
Figure 14: Schéma des modèles de BHE <i>in vitro</i> tridimensionnel.....	44
Figure 15: Modèle Hydrogel.....	45
Figure 16 : Sphéroïdes auto-assemblés.	46
Figure 17: Modèle de BHE dynamique <i>in vitro</i>	47
Figure 18 : Une plaque OrganoPlate à trois voies	48
Figure 19 : Schéma de l'assemblage des chaînes d'un anticorps.....	51
Figure 20: Schéma d'un anticorps monospécifique	52
Figure 21 : La diversité des formats d'anticorps bispécifiques.....	54
Figure 22 : Représentation schématique d'un VHH et d'un VNAR	55
Figure 23: Schéma des normes actuelles de traitements pour les patients atteints de tumeurs cérébrales.....	57
Figure 24 : Représentation schématique des différents dispositifs développés pour une ouverture de la BHE dans des applications cliniques avec des ultrasons pulsés de basse intensité.....	59
Figure 25: Plusieurs constructions de protéines ou anticorps thérapeutiques avec un anticorps anti-TFRC	62
Figure 26 :Modèle de circulation d'anticorps thérapeutiques anti A β entre le sang et le cerveau .	65
Figure 27 : Isolement et tri de différentes populations cellulaires par immunopanning.	72
Figure 28 :Analyse transcriptomiques de cellules endothéliales originaires de tissus différents....	75
Figure 29: Analyse transcriptomique par RNA-seq de cellules issues de résections chirurgicales cultivées <i>in vitro</i> pendant 3 semaines	76

Figure 30 : Sélection de cellules endothéliales de souris transgéniques en vue d'une analyse transcriptomique par RNAseq.....	78
Figure 31: Schéma du processus d'identification et de quantification des protéines génériques composant l'unité neuro-vasculaire. MRM: multiple-reaction monitoring; MS, mass spectrometry; SRM, selected reaction monitoring	84
Figure 32: Représentation schématique de la stratégie de quantification des protéines	88
Figure 33: Présentation schématique du biopanning.....	97
Figure 34: Protocole d'enrichissement d'une librairie de phages de sdAb de llama en anticorps sélectifs des cellules endothéliales cérébrovasculaires humaines	99
Figure 35 : Schéma du clonage par expression d'anticorps soustractifs.	105
Figure 36 : Cellules endothéliales primaires humaines.....	121
Figure 37 : Cellules endothéliales primaires humaines produites par Brainplotting™.....	122
Figure 38 : RT-qPCR de l'ARNm de marqueurs de types cellulaires des cellules endothéliales primaires microvasculaires cérébrales humaines provenant de différentes sources.	123
Figure 39 : Cellules primaires endothéliales commerciales à P0J5.	124
Figure 40 : RT-qPCR de l'ARNm de marqueurs de types cellulaires des cellules endothéliales primaires cérébrales humaines commerciales au cours de la culture.....	125
Figure 41: Immunofluorescence de ZO-1 des cellules primaires endothéliales commerciales. ...	125
Figure 42: Etapes d'isolement des cellules endothéliales microvasculaires Macaca Fascicularis.	126
Figure 43 : Cellules endothéliales de singes à P1D7.....	127
Figure 44 : Mesure du TEER au cours du temps dans un modèle de BHE Macaca fascicularis <i>in vitro</i> sur Transwell®.	127
Figure 45 : Amplification des marqueur endothéliaux dans des cellules de différentes espèces.	128
Figure 46 : Etapes d'isolement des cellules endothéliales microvasculaires de souris.....	128
Figure 47: Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de souris observées après 7 jours de culture P0J7	129
Figure 48 : RT-qPCR de l'ARNm de marqueurs de types cellulaires des cellules endothéliales primaires microvasculaires cérébrales de souris.	129
Figure 49 : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de souris.	130
Figure 50: Représentation d'un modèle de « pulse-chase ».....	131
Figure 51 : Ratio de « pulse-chase »	132
Figure 52 : Représentation d'un modèle de transcytose.....	133
Figure 53 : Modèle de BHE <i>in vitro</i> primates de PharmaCo-Cell®.....	134
Figure 54: Modèle de BHE <i>in vitro</i> humaine de Brainplotting™.	135
Figure 55 : Ratio de Papp pour un anticorps anti-TFRC dans trois modèles de BHE <i>in vitro</i>	135

Figure 56 : Représentation du modèle dynamique de BHE <i>in vitro</i> de Mimetas.....	137
Figure 57: Evaluation de l'étanchéité des cellules hCMEC/D3 dans le modèle Mimetas.....	138
Figure 58 : Comparaison entre les expositions cérébrales de 7 anticorps mesurées <i>in vivo</i> et les Papp mesurés <i>in vitro</i> chez le rat.....	140
Figure 59 : Etude de franchissement de la BHE avec 6 anticorps différents <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	141
Figure 60 : Comparaison des résultats des anticorps FC5-IgG, FC5-Fc, IGF1R5-Fc et control (A20.1-Fc, IgG)	142

Liste des tableaux

Tableau 1: Etudes transcriptomiques publiées sur les cellules endothéliales	80
Tableau 2: Etudes protéomiques publiées sur les cellules endothéliales	94
Tableau 3: Etudes d'affichage par des phages ou des levures identifiant des peptides ou des fragments d'anticorps permettant un adressage cérébral.	103
Tableau 4 : Etude combinatoire d'immunisation suivie d'une hybridation soustractive. Identifications de protéines enrichies sur la BHE.....	108

Liste des abréviations

AAV : Adeno-Associated Virus

ABC : pompes à efflux de la superfamille des cassettes de liaison ATP

ALCAM: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule

AMT : Transcytose Médiée par Adsorption

ANGPT : Angiopeptine

ARBEC: Adult Rat Brain microvascular Endothelial Cell

BACE: Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme

BCRP : Protéine de Résistance au Cancer du Sein

BEC : Brain Endothelial Cell

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BMEC : Cellules Endothéliales Microvasculaires Cérébrales

BRETIGEA : BRain cEll Type specific Gene Expression Analysis

BSA : Bovine Serum Albumin

β FGF : β Facteur de Croissance Basique des Fibroblastes

Cav1: Cavéoline

CD: Cluster Differentiation

CH: Constant Heavy

CL: Constant Light

CLDN5: Claudin 5

CNS: Central Nervous System

CNV : Complexe Neuro-Vasculaire

COMPACT: Collaboration on the Optimisation of Macromolecular Pharmaceutical Access to Cellular Targets

COS: cells being CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material

CYP : Cytochrome P

DEG : Expression Différentielle des Gènes

EBM: Endothelial Basal Medium

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting

FcRn : Récepteur Fc Néonatal

GDNF : Facteur Neurotrophique Dérivé de la Glie

GEO: Gene Expression Omnibus

GFAP: Glial Fibrillary Acidic Protein

GFP: Green Fluorescent Protein

GTEEx: Genotype-Tissue Expression

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

hCMEC/D3: Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell

HEK: Human Embryonic Kidney

HPA: Human Protein Atlas

HRP : HorseRadish Peroxidase

HUVEC : Cellules Endothéliales de la Veine Ombilicale Humaine

ICAM : InterCellular Adhesion Molecule

Ig : Immunoglobuline

IGFR : Facteur de Croissance Analogue à l'Insuline

IHC: ImmunoHistoChemistry

IM2PACT: Investigating mechanisms and models predictive of accessibility of therapeutics into the brain

IMI : Innovative Medicines Initiative

INSR : Récepteur à l'INSuline

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

ITM2A : InTegral Membrane protein 2A

JACOP: Junction-Associated Coiled-coil Protein

JAM: Molecules d'Adhésion Jonctionnelle

KO: Knock-Out

LAT1: Large neutral Amino acid Transporter

LBP: Laminin Binding Protein

LC-MS/ MRM: Liquid-Chromatography-tandem Mass-Spectrometry/ Multiple-Reaction-Monitoring

LCR: Liquide Céphalo Rachidien

LDL: Low-Density Lipoprotein

LPS: LipoPolySaccharide

LRP: Low density lipoprotein Receptor-related Protein

mAb: monoclonal Antibody

MDCK: Madin-Darby Canin Kidney

NBB: Netherlands Brain Bank

NGF: Nerve growth Factor

NGS: Next Generation Sequencing

NHP: Primate Non-Humain

P0D0 : Passage 0 Day *in vitro* 0

P1 : Post-birth 1

P_{app} : Perméabilité apparente

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PC_R: *Pulse-chase* Ratio

PDGFR β : Récepteur du Facteur de Croissance Dérivé des Plaquettes

PECAM: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule

P-gp: P-glycoprotéine

PODXL : Podocalyxin Like

RBE4 : lignée cellulaire Cérébrale Endothéliale de Rat

RMT : Récepteur Médiant la Transcytose

RT-qPCR : Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction

SAGE: Serial Analysis of Gene Expression

scFv : Single-Chain Variable Fragment

SdAb : Single domain Antibody

SLC : Transporteurs de nutriments

SNC : Système Nerveux Central

SSH : Hybridation par Suppression Soustractive

TEER : Trans-Endothelial Electrical Resistance

TFRC : Récepteur de la Transferrine

TLCK: Tosyl-L-lysyl-Chloromethane Hydrochloride

UCP2: UnCoupling Protein 2

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule

VH: Variable Heavy

VHH: Single Variable domain on a Heavy chain

VIP: Peptide Intestinal Vasoactif

VL: Variable Light

VNAR: Variable New Antigen Receptor

WB: Western Blot

ZO: Zona Occludens

1 Introduction

En 2002, Pardridge alertait déjà sur la nécessité de développer le passage de biothérapeutiques à travers la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). En effet, seulement 2% des molécules développées pour les pathologies du cerveau franchissent la BHE (1). Hormis quelques exceptions que nous détaillerons plus loin, il n'y a pas de biothérapeutiques capables de traverser facilement la BHE. Le rôle physiologique de cette barrière est de protéger le cerveau de substances toxiques qui pourraient circuler dans le sang mais elle empêche également les molécules thérapeutiques d'atteindre leur cible en cas de pathologies cérébrales. Nous allons dans un premier temps détailler brièvement la BHE et son fonctionnement. Nous ferons ensuite un état des lieux des stratégies utilisées jusqu'à présent pour trouver de nouveaux récepteurs capables de médier la transcytose à travers la BHE. Cette introduction donnera les éléments permettant de comprendre le travail réalisé dans le département Tissue Barriers de Sanofi dirigé par Dominique Lesuisse pour essayer de découvrir de nouveaux récepteurs capables de médier la transcytose (RMT). Ce projet technologique a été initié chez Sanofi afin de répondre à un besoin médical non satisfait qui permettrait de faire entrer des biothérapeutiques dans le cerveau pour traiter des pathologies cérébrales.

1.1 La barrière hémato-encéphalique

1.1.1 Mise en évidence

Paul Ehrlich a travaillé à la fin du XIX^{ème} siècle sur une chimiothérapie ciblée à l'aide de colorant cytotoxique pour éradiquer le trypanosome responsable de la maladie du sommeil en Afrique (2). C'est dans ce contexte que dès 1885, il avait rapporté que plusieurs colorants hydrosolubles injectés en périphérie ne coloraient pas le cerveau et la moelle épinière. Il avait alors attribué cette observation à une faible affinité du tissu nerveux pour le colorant. D'autres auteurs avaient un peu plus tard confirmé ces observations. En 1898, Biedl et Kraus avaient montré que les acides choliques (acides biliaires) qui provoquent des convulsions et le coma lorsqu'ils sont injectés dans le cerveau, ne sont pas toxiques lorsqu'ils sont injectés dans le système circulatoire. En 1900, Lewandowsky avait rapporté des résultats similaires avec le ferrocyanure de potassium et également conclu qu'il y avait une perméabilité limitée de la périphérie vers le cerveau. Il avait attribué le terme « bluthirnschranke » soit barrière hémato-encéphalique à ce phénomène. En 1913, l'élève de Ehrlich : Edwin Goldmann a montré que le colorant bleu trypan soluble dans l'eau injecté dans le liquide céphalorachidien (LCR) d'un jeune lapin, a coloré tous les types de cellules dans la moelle épinière, le tronc cérébral ou le cerveau, ainsi que les nerfs optiques, les sclères et les bulbes olfactifs mais n'a pas réussi à pénétrer dans la périphérie (2). Dans la Figure 1, il représente une vue d'ensemble du système nerveux central (SNC) d'un jeune lapin injecté avec 0,5 ml d'une

solution bleu trypan de 0,5% dans le « cul-de-sac » lombaire. La Figure 1 A est une vue dorsale et la Figure 1 B est une vue ventrale.

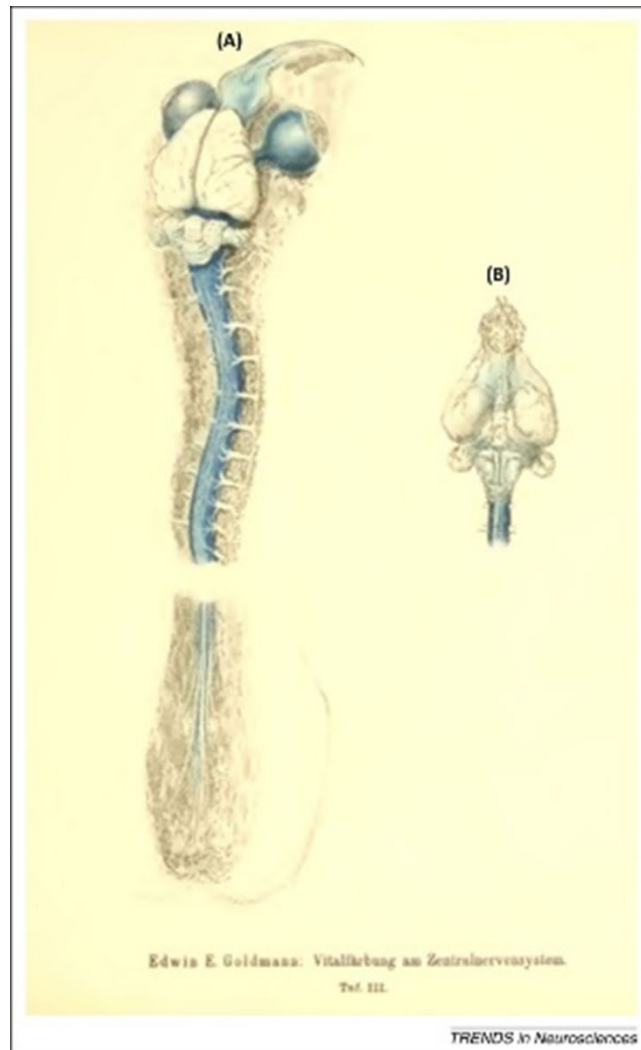


Figure 1 : Illustration de la mise en évidence d'une BHE en 1913 par Edwin Goldman (2). A : vue dorsale du cerveau, des globes oculaires et de la moelle épinière B : Vue ventrale du cerveau et du tronc cérébral.

Goldmann n'a pas effectué d'injections de colorant dans les ventricules cérébraux ou le parenchyme cérébral (2). Il contredit la conclusion de Ehrlich d'une affinité de liaison inférieure du système nerveux central pour ces colorants, et soutient l'hypothèse de Lewandowsky de l'existence d'une BHE. En 1967, Reese et Karnovsky ont utilisé la microscopie électronique à haute résolution pour démontrer que la peroxydase de raifort (HRP, 40 kDa) ne pouvait pas pénétrer dans le cerveau. Le produit de la réaction n'est présent que dans les vaisseaux sanguins. Les auteurs font l'hypothèse de la présence de jonctions serrées entre les cellules vasculaires cérébrales (3). Dans la Figure 2 une tranche de cerveau de souris de 50 μm , est observée à un grossissement de 175 et incubée avec le substrat de la peroxydase. La surface du cortex est vers le haut. Seul le réseau vasculaire est coloré, HRP ne pénètre pas dans le parenchyme.

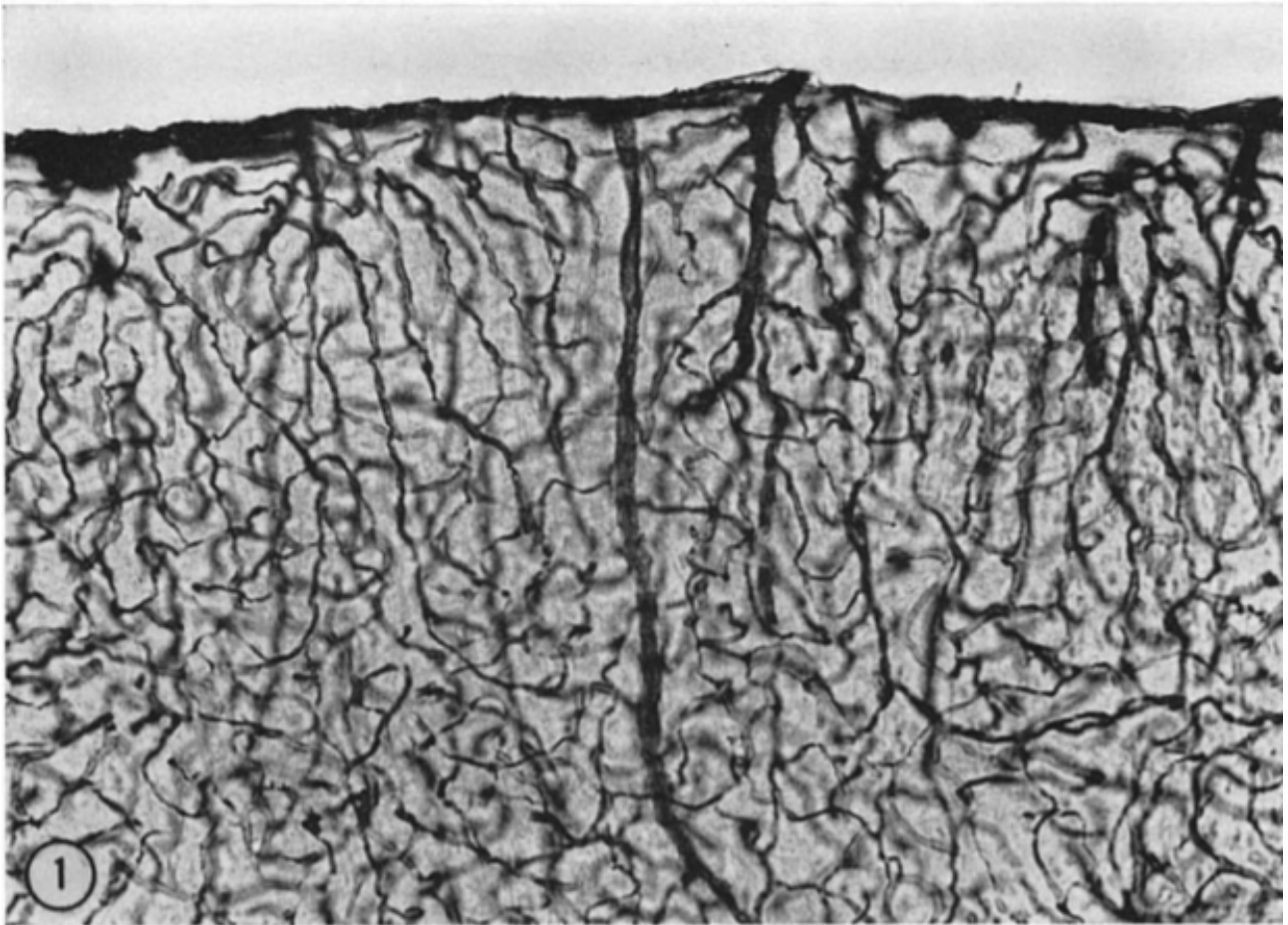


Figure 2 :Cerveau d'une souris injectée en intraveineux avec HRP (3).

Le cerveau humain adulte pèse en moyenne 1,5 kg pour un volume de 1200 cm³. La surface des microvaisseaux est de 100 à 200 cm² par g de tissu, ce qui correspond à une surface totale de 15 à 25 m². Par comparaison, la surface de l'intestin est de 300 à 400 m², le poumon est de 100 m² et la peau de 2 m². La longueur totale des microvaisseaux est de 600 km dans le cerveau humain adulte. La lumière capillaire encadrée par les jonctions serrées forment une membrane continue et imperméable qui constitue la BHE au niveau de l'endothélium vasculaire (4,5). Ce réseau sanguin est visualisé dans la Figure 3.

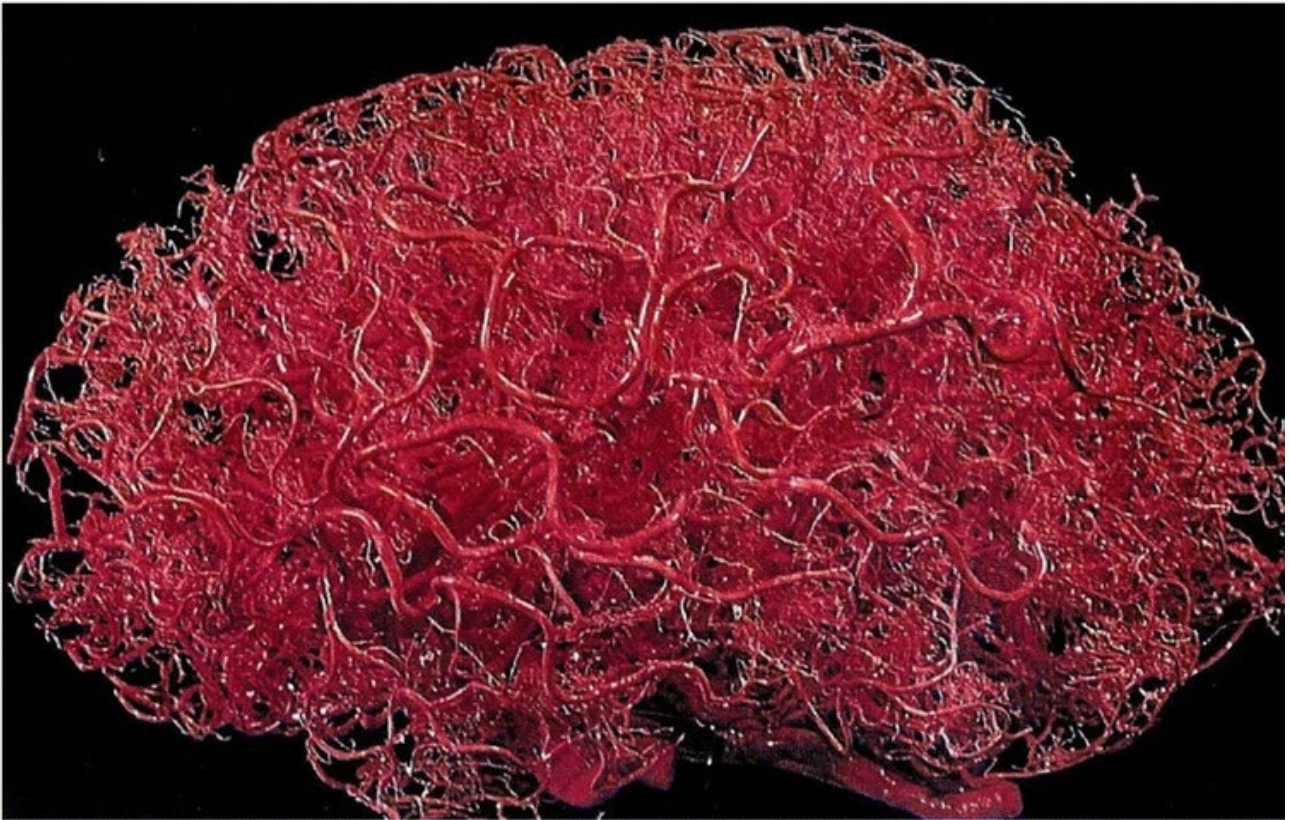


Figure 3: Moulage en cire du réseau vasculaire constituant la BHE image du domaine public réalisée par Pete Gaillard (6).

Le cerveau humain est composé de 100 milliards de neurones et autant de cellules gliales. Les neurones, les astrocytes, la microglie et les péricytes représentent près de 80% du volume cérébral. L'espace extracellulaire occupe 15% du volume cérébral, et le système vasculaire cérébral près de 3%. Les capillaires du cerveau ont un diamètre de 7 à 10 μm et la distance intercapillaire moyenne est d'environ 40 μm . Par conséquent, le corps cellulaire d'un neurone est généralement à 10 à 20 μm du capillaire le plus proche. Le cerveau a besoin d'un environnement local étroitement régulé pour que les cellules fonctionnent. Le cerveau peut rapidement augmenter le flux sanguin et l'apport d'oxygène dans les régions activées, c'est le couplage neurovasculaire. Le maintien de l'homéostasie et la protection contre des agents pathogènes constituent un défi majeur car la surface de microvascularisation est très grande (15 à 25 m^2). Les concentrations d'eau, d'ions, d'acides aminés, d'hormones et de neurotransmetteurs fluctuent dans le sang en fonction de l'apport et de la dépense énergétique. Ces variations ne doivent pas avoir lieu dans le cerveau sinon l'activité neuronale serait incontrôlée. Le cerveau étant contenu dans un volume fixe dans le crâne, et une réponse inflammatoire entraînant une augmentation de la pression intracrânienne ou un œdème cérébral, le transport des cellules immunitaires doit également être régulé. Enfin, l'entrée de toxines et d'agents pathogènes, tels que les bactéries et les virus circulant dans le sang, peut entraîner la mort des cellules neuronales. Elle est donc proscrite. Par conséquent, le passage de la lumière des capillaires vers le parenchyme doit être parfaitement régulé. C'est la BHE qui est

responsable du maintien de l'homéostasie du cerveau en régulant l'environnement chimique, le transport des cellules immunitaires et l'entrée des xénobiotiques (4) (7).

1.1.2 Structure

La BHE est constituée de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées. Ces cellules sont associées à plusieurs types cellulaires qui forment le complexe neurovasculaire (CNV) (8): une cellule endothéliale enroulée sur elle-même et entourée de péricytes et de pieds astrocytaires comme schématisé dans la Figure 4. Nous allons détailler chaque type cellulaire dans les paragraphes suivants.

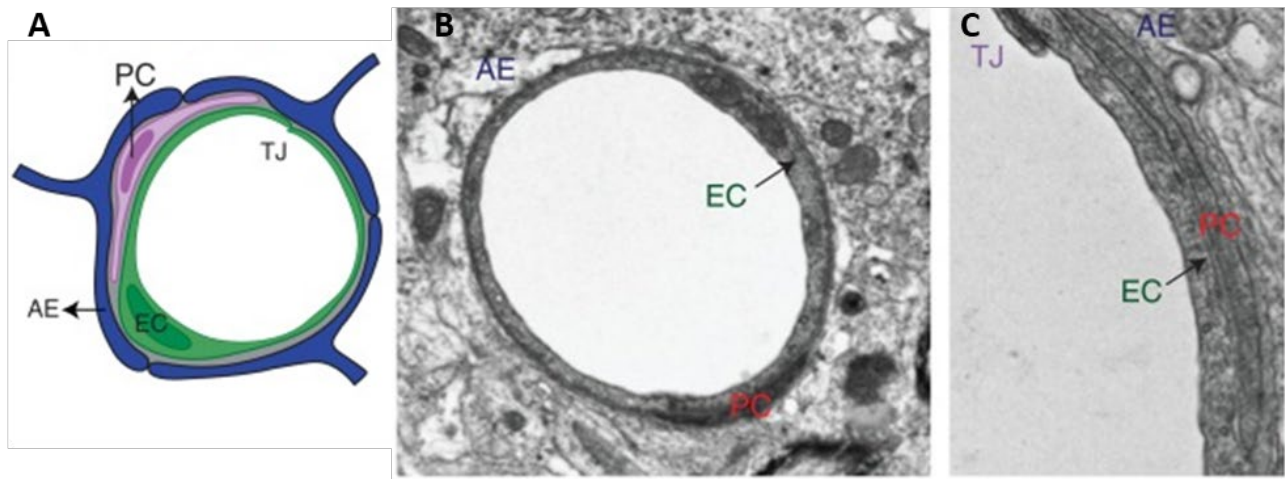


Figure 4: Composants associés à la BHE. (A) Représentation schématique des types cellulaires au sein d'un complexe neurovasculaire. (B) Microscopie électronique d'une coupe transversale d'un vaisseau du SNC illustrant une relation entre les cellules endothéliales (CE), les péricytes (PC) et les astrocytes. (C) Image de microscopie électronique agrandie des CE illustrant une relation entre les CE (avec jonctions serrées [TJ]), les PC, les membranes basales (BM) et les pieds terminaux des astrocytes (AE) (9).

1.1.2.1 La BHE

1.1.2.1.1 Cellules endothéliales

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins cérébraux. Ils représentent environ 85 % de la longueur des vaisseaux cérébraux et couvrent une surface de près de 12 m² chez l'homme. Les plus petits vaisseaux de la BHE sont constitués d'une seule cellule endothéliale qui fait des jonctions serrées sur elle-même. Contrairement aux capillaires systémiques qui sont très perméables, les capillaires cérébraux présentent un faible taux de flux trans-endothélial ce qui restreint l'entrée de la plupart des molécules dérivées du sang dans le cerveau. Cependant, il y a des transporteurs spécialisés et des récepteurs dans l'endothélium du cerveau qui facilitent le transport à travers la BHE (7). Je les détaillerai ci-dessous. Les cellules endothéliales cérébrales montrent des profils transcriptomiques différents selon qu'il s'agit de veines, artères ou capillaires. Par exemple, les capillaires sont LAMA1 (Laminin alpha 1, un des composant principal de la laminine) négatifs comparés aux veines et artères qui sont LAMA1 positives (10). Les cellules endothéliales cérébrales

sont des cellules polarisées avec des compartiments membranaires luminaux et abluminaux distincts. Ainsi, les mouvements entre le sang et le cerveau sont étroitement contrôlés grâce à des propriétés de transport cellulaire régulées (9,11). Contrairement à d'autres organes, les cellules endothéliales cérébrales présentent des taux plus faibles de pinocytose ou de transport par vésicules non spécifiques (12). La surface face au sang, ou surface luminale, est recouverte par le glycocalyx, un revêtement semblable à un gel composé de glycoprotéines, de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes (13). La membrane des cellules endothéliales orientée vers le cerveau ou abluminale est intégrée dans une membrane basale (BM) riche en protéines servant d'échafaudage cellulaire essentiel pour les interactions avec les cellules voisines (14). Les cellules endothéliales et les péricytes sécrètent les protéines de la matrice extracellulaire qui composent la membrane basale endothéliale. Il s'agit d'un réseau réticulé composé de collagène de type IV, de laminines $\alpha 4$ et $\alpha 5$, de nidogène, de protéoglycanes de sulfate d'héparane et de quelques glycoprotéines. Une caractéristique unique des microvaisseaux du système nerveux central est la présence d'une deuxième membrane basale, appelée membrane basale parenchymateuse, qui est sécrétée par les astrocytes. La membrane basale parenchymateuse est moléculairement distincte de la membrane basale endothéliale. Elle est composée de laminines $\alpha 1$ et $\alpha 2$ à la surface du cerveau et avec des laminines $\alpha 2$ aux espaces périvasculaires. Au niveau capillaire, l'espace périvasculaire fusionne avec la membrane basale endothéliale, tandis qu'au niveau des veinules post-capillaires, il y a un petit espace périvasculaire entre ces deux membranes basales. La configuration tridimensionnelle et les composants de ces membranes basales hébergent des signaux spécifiques pour la croissance cellulaire et la survie pendant le développement et le maintien ultérieur de la BHE, tout en apportant un soutien physique au système vasculaire (15). La monocouche de cellules endothéliales est gainée par des cellules murales (péricytes dans les capillaires et cellules musculaires vasculaires lisses dans les artérioles et les artères) et par les pieds astrocytaires (7).

1.1.2.1.2 Jonctions serrées

Les propriétés d'étanchéité de la BHE sont amenées par la présence de jonctions particulières sur les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales. Ce sont les jonctions serrées qui sont maintenues parallèles à la lumière du vaisseau grâce à des protéines spécifiques. Cette structure est visible au microscope électronique (Figure 6).

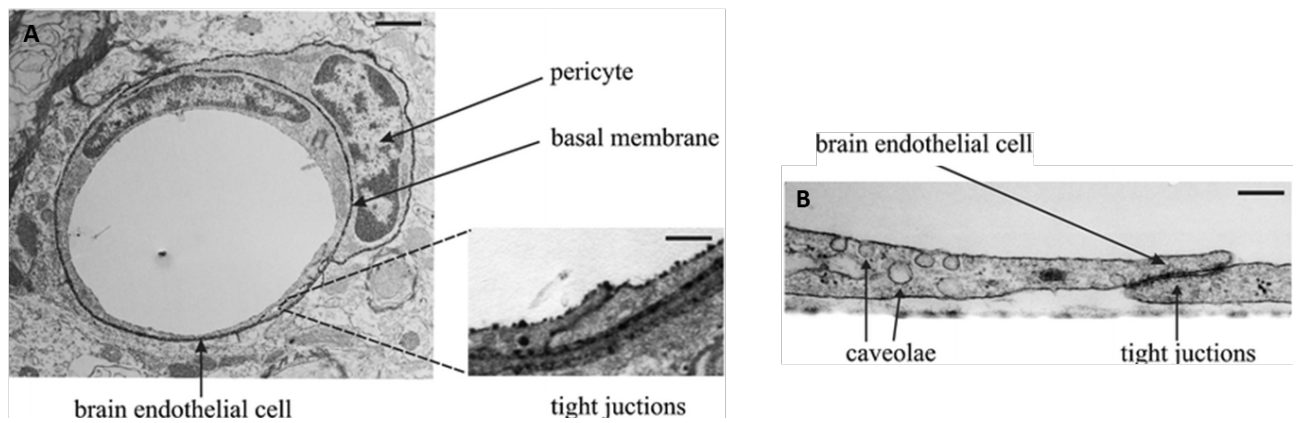


Figure 5: Structure anatomique de la BHE. (A) Ultrastructure d'une cellule endothéliale primaire de cerveau de rat en culture vue au microscope électronique (B) Région agrandie : détails morphologiques. Echelles A : 1µm, région agrandie : 500 nm ; B : 500 nm (16).

En plus d'exprimer des protéines de jonction adhérente (AJ) conventionnelles telles que la VE-cadhérine (Vascular Endothelial cadhérine) et la PECAM (Platelet endothelial cell adhesion molecule ou Cluster Differentiation (CD)31), les cellules endothéliales des microvaisseaux cérébraux adjacentes sont cousues ensemble par des jonctions serrées, réduisant le transport paracellulaire entre les cellules voisines. Les jonctions serrées sont formées par des interactions entre les protéines transmembranaires, les claudines, les occludines et les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAM), qui sont liées au cytosquelette par des protéines adaptatrices telles que ZO-1 et la cinguline (17).

Les claudines sont une classe de tétraspanines de plus de 25 membres qui sont caractérisées par un enchaînement typique d'acides aminés W...GLW...C...C dans la première boucle extracellulaire. Des preuves *in vitro* suggèrent que les claudines sont essentielles à la formation de la barrière paracellulaire. L'expression des claudines est suffisante pour former des brins de jonctions serrées dans les fibroblastes, et la perturbation des claudines diminue les propriétés de barrière paracellulaire des cellules rénales madin-Darby canin kidney (MDCK1). Il a été démontré que la claudine 5 (CLDN5) est fortement exprimée par les cellules endothéliales du système nerveux central, et les souris dépourvues de CLDN5 présentent une BHE perméable. D'autres claudines, dont CLDN12 et CLDN3, ont été identifiées sur la BHE (9).

L'occludine est une tétraspanine exprimée par les cellules épithéliales et les cellules endothéliales du système nerveux central. Si les interactions homotypiques entre occludines sont perturbées, l'étanchéité de la barrière est impactée. L'occludine est fortement enrichie dans les cellules endothéliales du système nerveux central par rapport aux cellules endothéliales périphériques ce qui indique qu'elle peut être un composant important de la barrière. Cependant, les souris déficientes en occludine ont une barrière épithéliale normale et une BHE fonctionnelle. Ces souris

ont une calcification du système nerveux central suggérant que l'occludine régule spécifiquement le flux de calcium à travers la BHE (9).

Les JAM sont des membres de la superfamille des immunoglobulines qui forment des interactions homotypiques au niveau des jonctions serrées dans les cellules épithéliales et les cellules endothéliales. Les JAM régulent l'extravasation des leucocytes ainsi que la perméabilité paracellulaire. En particulier, JAM4 a été identifié sur la BHE chez la souris (9).

Les complexes d'adhésion transmembranaire sont liés au cytosquelette par une série d'adaptateurs cytoplasmiques, notamment ZO-1, ZO-2, Cingulin et JACOP (junction-associated coiled-coil protein). De plus, les jonctions serrées interagissent avec les jonctions adhérentes basales, qui relient toutes les cellules endothéliales et sont constituées de molécules d'adhésion endothéliale vasculaire et de PECAM1, et sont liées au cytosquelette par des caténines. Beaucoup des protéines de jonctions serrées identifiées, y compris CLDN5, CLDN 12, ZO-1 et ZO2, semblent être exprimées par les cellules endothéliales dans tous les tissus. Ainsi, une question majeure est de savoir pourquoi seules les cellules endothéliales du système nerveux central forment cette barrière étanche et non les cellules endothéliales des autres tissus. L'analyse transcriptionnelle comparant les cellules endothéliales du système nerveux central aux cellules endothéliales périphériques suggère que plusieurs adaptateurs cytoplasmiques, y compris JACOP et MPP7, ainsi que les molécules tricellulaires des jonctions serrées, LSR et marveld2, sont enrichis sur la BHE. Ces molécules peuvent être critiques pour la formation de cette barrière (9). L'expression spécifique de l'occludine au niveau de la BHE est bien documentée, cependant, l'enrichissement de Jam4 et marveld2 dans les cellules endothéliales du système nerveux central est une découverte nouvelle. Marveld2 scelle les jonctions serrées aux points de rencontre de trois cellules. Les cellules endothéliales des capillaires de la BHE forment des jonctions serrées avec des cellules endothéliales adjacentes, ainsi que des jonctions intracellulaires lorsqu'elles se replient sur elles-mêmes pour former le tube du vaisseau. Ainsi, les adhérences tripartites au niveau de la BHE pourraient être l'interface entre les brins de jonctions serrées intercellulaire et intracellulaire (18). Les différentes jonctions présentes sur la BHE sont représentées dans le schéma suivant (Figure 7).

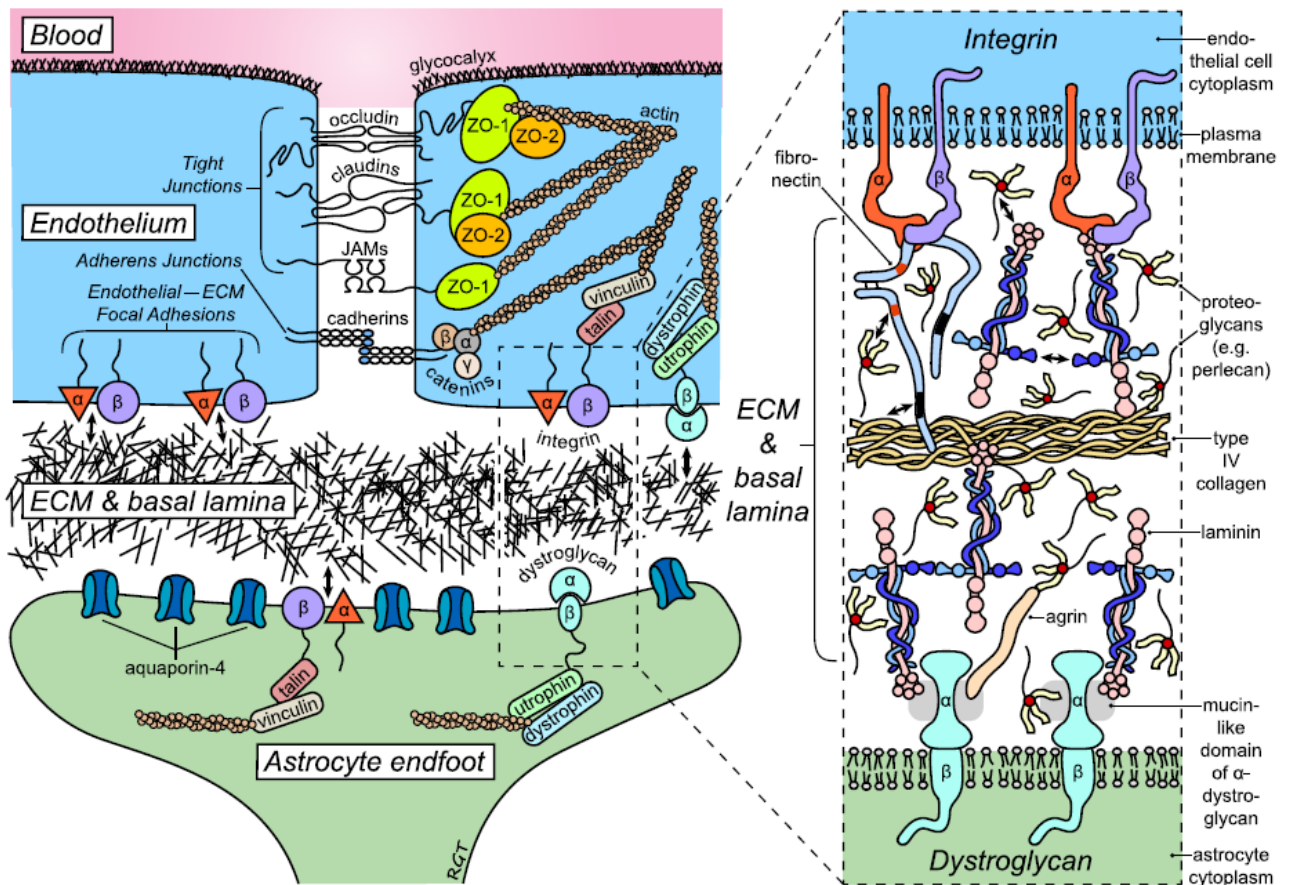


Figure 6: Jonctions de la BHE avec la lame basale des microvaisseaux cérébraux(19).

Les interactions des cellules endothéliales (et des astrocytes) avec les composants de la matrice extracellulaire et la lame basale sont facilitées par les intégrines, des récepteurs hétérodimériques $\alpha\beta$. Les intégrines se lient de manière extracellulaire aux laminines et à la fibronectine pour attacher la matrice extracellulaire au cytosquelette. Le dystroglycane, un complexe de sous-unités α et β qui se lient aux laminines, à l'agrine et au perlecan fournit des liens supplémentaires entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette (19).

1.1.2.2 Complexe neurovasculaire

Les cellules endothéliales cérébrales qui constituent la BHE sont associées à d'autres types cellulaires. Cet ensemble constitue le CNV.

1.1.2.2.1 Péricytes

Le mot péricyte vient de « péri » qui signifie « autour » et « cyte » du latin, qui a des origines du grec « kytos » (cellule), illustrant une cellule encerclant un vaisseau sanguin. C'est au 20^{ème} siècle que le scientifique allemand Karl Wilhelm Zimmermann a renommé péricyte les cellules de Rouget décrites au 19^{ème} siècle par un scientifique français, Charles-Marie Benjamin Rouget, comme une population de cellules contractiles dans de petits vaisseaux sanguins. Les péricytes ont de longs prolongements autour des parois des vaisseaux sanguins et sont dispersés dans tous les tissus. Ils encerclent les cellules endothéliales et communiquent avec elles le long des vaisseaux sanguins

par signalisation paracrine et contact physique (20). Dans le cerveau, le rapport des cellules endothéliales aux péricytes est d'environ 1 :3 comparé à 1 :100 en périphérie (17), ce qui démontre l'importance des péricytes cérébraux. Les péricytes participent au développement, à la maturation et à la perméabilité des vaisseaux sanguins, tout en contribuant à leur architecture. Ils régulent le flux sanguin et affectent la coagulation. Les péricytes collaborent avec les astrocytes, les neurones et les cellules endothéliales, formant le complexe neurovasculaire, pour réguler le maintien de l'intégrité fonctionnelle de la BHE. Par exemple, la signalisation de la sous-unité β du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF β), exprimée par les péricytes est indispensable à la formation et à la maturation de la BHE. En outre, les péricytes remplissent plusieurs fonctions immunitaires et contribuent à l'élimination des sous-produits cellulaires toxiques. Ils ont une activité phagocytaire directe dans le cerveau. Les péricytes cérébraux diffèrent de ceux de la périphérie par leurs origines embryonnaires. Alors que les péricytes des organes cœlomiques sont dérivés du mésoderme, les péricytes cérébraux sont d'origine neuroectodermique et des études récentes ont montré qu'une sous-population de péricytes dans le cerveau embryonnaire peut provenir de progéniteurs hématopoïétiques (20). Des lignées de souris transgéniques établies par Hartmann et al mettent en évidence par imagerie à haute résolution, des populations de péricytes avec des différences structurelles selon les vaisseaux auxquels ils sont associés (21). Les souris transgéniques délétées pour *Pdgfr β* $-/-$ meurent au stade embryonnaire. En générant des souris *Pdgfr β* F7/F7 avec une population péricytaire diminuée de 50 à 60%, Daneman et al ont démontré que le nombre de péricytes détermine la perméabilité relative des vaisseaux du système nerveux central pendant le développement. La perméabilité de la BHE est inversement corrélée au nombre de péricytes (22). Des démonstrations de perméabilité ont également été réalisées dans des souris transgéniques *Pdgfr β* $-/-$ par Mihajlica et al avec des petites molécules et ils sont arrivés aux mêmes conclusions (23). Une autre étude des cellules endothéliales de souris appauvries en péricytes (*Pdgfr β* *ret/ret*) met en évidence un basculement du phénotype artère vers veine et un rôle inattendu de *Angpt2* (angiopeptin 2, antagoniste de Tie2). En effet, alors que ces souris présentent une expression forte mais hétérogène d'ANGPT2 comparées à des souris normales qui en expriment très peu, les régions sans péricyte où la BHE est la plus perméable sont dépourvues en *Angpt2*. Donc, malgré un rôle évident des péricytes dans la fonction cérébrale, leurs interactions avec les cellules endothéliales ne sont pas élucidées (24). Cette revue met en garde sur la méconnaissance des péricytes et de leurs fonctions associées. Les marqueurs couramment utilisés des péricytes du système nerveux central comprennent le *PDGFR β* et le protéoglycane de sulfate de chondroïtine NG2 (codé par *CSPG4*). Cependant, aucun des deux marqueurs n'est spécifique des péricytes car ils sont également exprimés par les fibroblastes et les cellules progénitrices d'oligodendrocytes, respectivement, et à des niveaux inférieurs dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Beaucoup de fonctions proposées pour les péricytes ont été déterminées dans des

études qui se sont appuyées sur ces marqueurs (en particulier *PDGFRβ*) pour leur identification. Par conséquent, de nombreuses conclusions tirées de ces études peuvent ne pas être spécifiques des péricytes. Des études de séquençage ont identifié d'autres marqueurs potentiels des péricytes, notamment *KCNJ8* et *ABCC9*, bien que ces marqueurs soient rarement utilisés pour identifier les péricytes (25).

1.1.2.2.2 Astrocytes

Les astrocytes sont impliqués dans de multiples processus dans le cerveau, notamment la régulation de la concentration d'ions et d'eau, la clairance des neurotransmetteurs, la prolifération des cellules souches, le contrôle du nombre de synapses et le maintien de l'intégrité de la BHE. Morphologiquement, les astrocytes sont généralement en forme d'étoile avec des prolongements émanant du corps cellulaire, avec un diamètre global d'environ 140 μm dans le cerveau humain. Les astrocytes interagissent avec les cellules endothéliales microvasculaires grâce à des pieds astrocytaires qui s'enroulent autour du capillaire (Figure 5). Dans cette figure, les noyaux des cellules sont colorés en bleu (TOPRO3), les prolongements astrocytaires en jaune (GFAP) et la glycoprotéine P (P-gp) utilisée comme marqueur luminal de la membrane des cellules endothéliales microvasculaires est colorée en violet. Un astrocyte peut entrer en contact avec plusieurs capillaires (4).

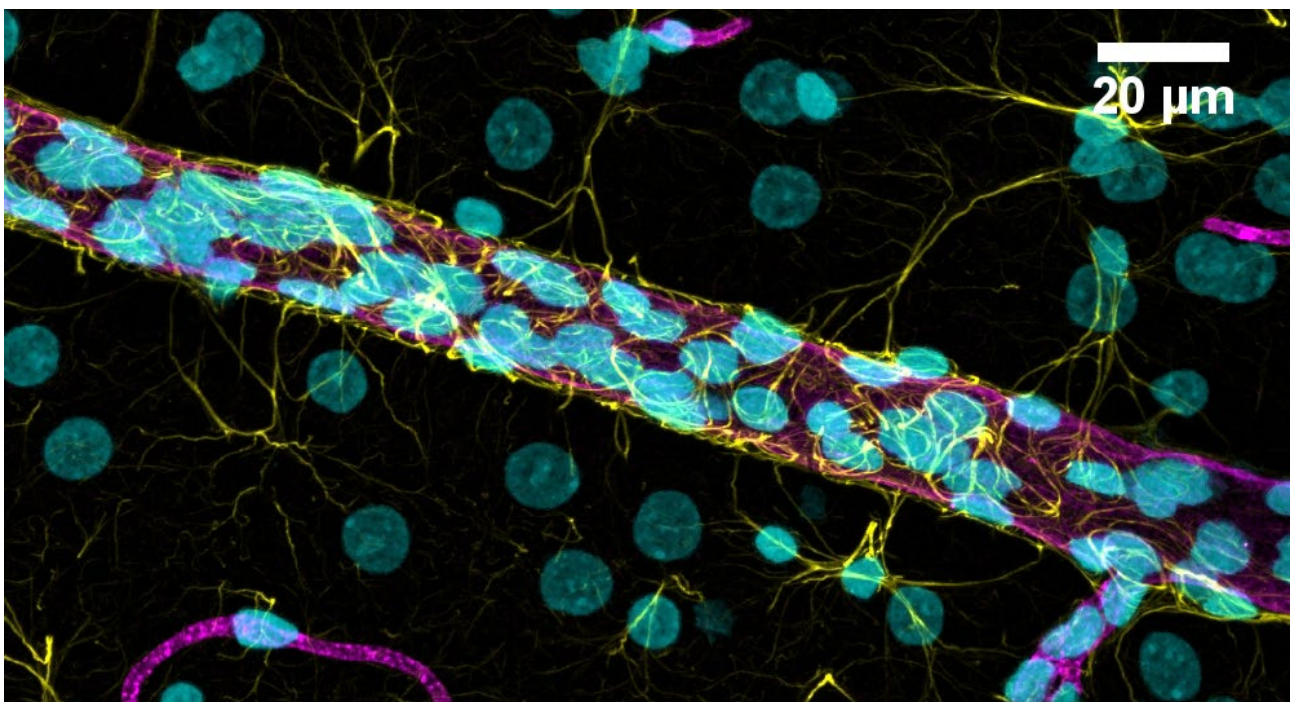


Figure 7 : Image de microscopie confocale d'un microvaisseau de rat entouré de pieds astrocytaires L'image est fournie par Dr. Bruno Saubaméa (Plateforme d'imagerie cellulaire, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes)

Les astrocytes forment des contacts avec les microvaisseaux et les synapses entre les neurones, et jouent un rôle important dans l'adaptation du transport de l'oxygène et du glucose à l'activité

neuronale grâce à la régulation du flux sanguin local. Les astrocytes participent à la formation de la BHE en améliorant la formation de jonctions serrées, en modulant l'expression et la polarisation des transporteurs, et en promouvant des systèmes enzymatiques spécialisés. Plusieurs facteurs dérivés des astrocytes, y compris le facteur neurotrophique dérivé glial (GDNF), le facteur de croissance basique des fibroblastes (β FGF) et ANGPT1 sont connus pour induire des caractéristiques de BHE dans les cellules endothéliales (4). Les astrocytes sont en étroite relation avec l'endothélium et les cellules murales. Ces cellules gliales sont largement présentes dans tout le système nerveux central et jouent un rôle de soutien qui régule le microenvironnement neuronal en contrôlant l'équilibre des neurotransmetteurs et des électrolytes, la formation des synapses et l'élimination des débris axonaux. De plus, ils ont des prolongements qui recouvrent les vaisseaux sanguins et les synapses neuronales, favorisant un lien direct entre les circuits neuronaux et le système vasculaire. Plusieurs études *in vitro* ont montré qu'avec une co-culture d'astrocytes et de cellules endothéliales, les protéines des complexes jonctionnels sont régulées à la hausse entre les cellules endothéliales adjacentes. Cela contribue à une augmentation de l'intégrité de la barrière. La sécrétion de Sonic Hedgehog, d'acide rétinoïque et d'ANGPT1 par les astrocytes soutient les propriétés de barrière des cellules endothéliales cérébrales. D'autre part, l'interaction des astrocytes avec les cellules endothéliales est également très importante, avec des facteurs sécrétés par les cellules endothéliales comme LIF1 qui favorisent la différenciation astrocytaire (15). Le facteur Wnt sécrété par les astrocytes est essentiel au maintien de l'intégrité de la BHE. Guérit et al ont utilisé des souris transgéniques Knock-Out (KO) pour le gène *Evi* spécifiquement dans les astrocytes qui permet la sécrétion de Wnt. Ils n'ont pas observé de changements significatifs dans la morphologie des vaisseaux en ce qui concerne la densité et la ramification des vaisseaux ainsi que dans la distribution de la matrice extracellulaire, malgré la diminution de l'expression des gènes cibles de la voie Wnt dans les cellules endothéliales. Les souris ont présenté un œdème cérébral léger et une extravasation accrue du traceur fluorescent à l'âge de 10 et 40 semaines, partiellement corrélés avec une régulation négative des gènes de jonction comme VE-cadhérine / *Cdh5* et zonula occludens-1 (*ZO1*) / *Tjp1* à 40 semaines, alors que la morphologie et la fonction de la jonction n'étaient pas affectées. La fréquence d'expression des vésicules endothéliales et de la cavéolin-1 (*Cav-1*) a été significativement augmentée chez les souris KO *Evi*. Les souris transgéniques de 40 semaines ont montré une BHE perméable avec une couverture altérée des capillaires cérébraux par les pieds astrocytaires, mis en évidence par un marquage aquaporine-4 (*Aqp4*). De plus, la microscopie électronique a révélé un gonflement important des extrémités astrocytaires chez les souris transgéniques, suggérant un rôle cellulaire autonome des facteurs Wnt astrocytaires via une voie autocrine (26). L'identification des facteurs sécrétés par les astrocytes qui régulent la fonction de la BHE suggère que les astrocytes matures modulent et maintiennent la barrière une fois qu'elle est formée (9).

1.1.2.2.3 Membrane basale

Les cellules endothéliales, les astrocytes et les péricytes contribuent à la formation de la membrane basale en sécrétant les molécules de la matrice extracellulaire. La membrane basale est principalement composée de protéines structurales telles que le collagène de type IV, la laminine et la fibronectine, et contient également des molécules d'adhésion cellulaire et des protéines de signalisation. Les membranes basales maintiennent les membres du CNV en place et régulent la communication intercellulaire. Les interactions entre les membranes basales et leurs cellules associées sont rendues possibles par deux types de récepteurs transmembranaires matriciels : les dystroglycanes et les intégrines. Leurs ligands de la matrice extracellulaire sont : laminine, fibronectine, collagène de type IV, nidogène, ostéonectine, glycosaminoglycanes (GAG), agrin et perlécane. La liaison au ligand conduit à l'activation de divers facteurs de croissance et cascades de signalisation qui contrôlent la croissance, la différenciation, la migration et la survie des cellules pendant le développement et le maintien de la BHE. La membrane basale de la BHE est schématisée dans la Figure 8.

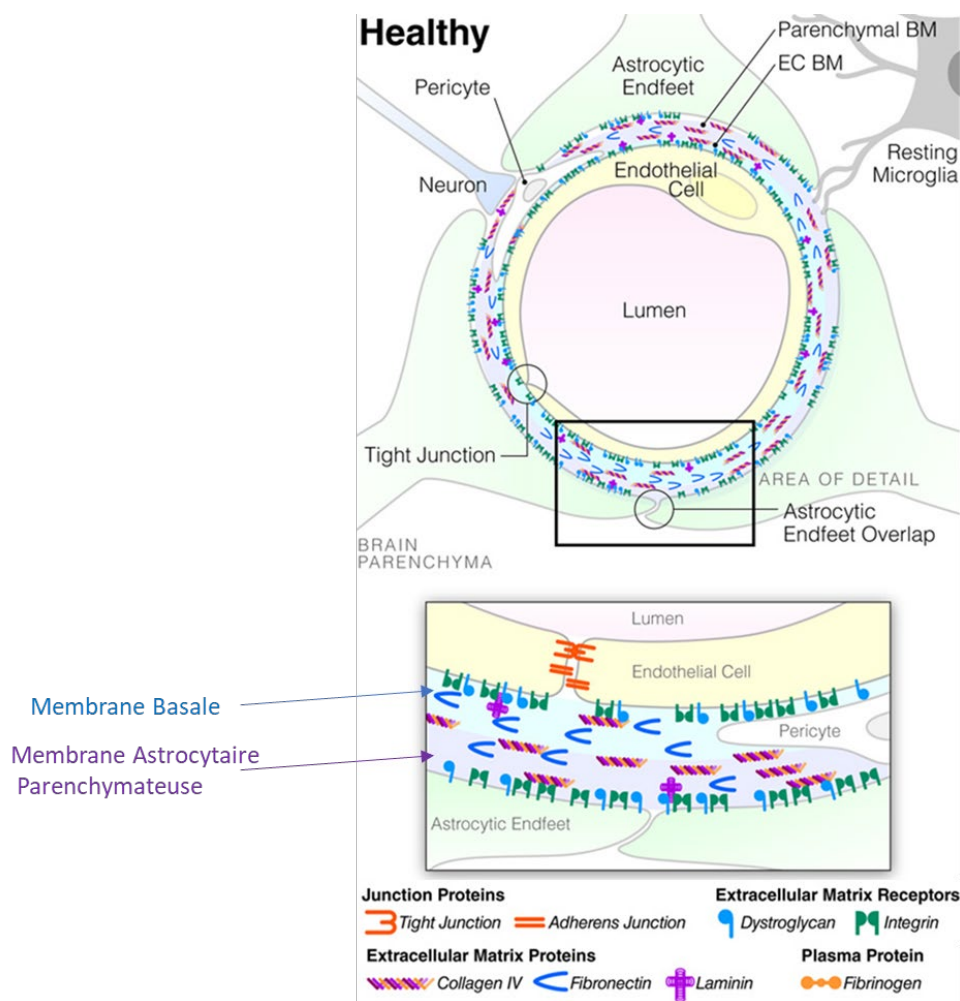


Figure 8 : Représentation schématique de la membrane basale (27).

Les microvaisseaux sains dans le cerveau se composent de cellules endothéliales spécialisées avec des jonctions serrées, de leur membrane basale (bleu) et astrocytaire parenchymateuse (violet) composée de protéines de la matrice extracellulaire, et d'une couverture de pieds astrocytaires (27).

1.1.3 Propriétés physiques de la BHE

1.1.3.1 Polarité de la BHE

Les cellules endothéliales de la BHE sont polarisées, elles n'expriment pas les mêmes récepteurs, canaux, transporteurs sur la partie exposée au flux sanguin (luminale) que sur celle tournée vers le parenchyme cérébral (abluminale). La membrane luminale est plus étudiée grâce à des marquages spécifiques depuis les vaisseaux sanguins. Les RMT y sont présents et les études de cette membrane sont répertoriées dans cette revue récente de Stanimirovic (28). Bien que les jonctions serrées et la transcytose réduite limitent indistinctement le transport des ions et des molécules, la sélectivité de la BHE est liée à l'expression polarisée de plusieurs classes de transporteurs de nutriments (SLC) et de pompes d'efflux. L'expression différentielle de ces transporteurs sur les membranes lumineales et ablumineales des cellules endothéliales microvasculaires du cerveau, régule l'absorption des nutriments dans le système nerveux central et l'élimination des déchets. Les pompes d'efflux de la superfamille des cassettes de liaison ATP (ABC) constituent une autre classe de transporteurs polarisés. Les petites molécules lipophiles, si elles sont substrats de ces pompes, diffusent généralement à travers les cellules endothéliales périphériques mais sont activement renvoyées dans le sang par les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (17).

1.1.3.2 TEER

Les deux paramètres les plus couramment utilisés pour l'évaluation quantitative de la fonction de barrière sont la résistance électrique transendothéliale (TEER) et la perméabilité. Les mesures de TEER peuvent être effectuées en temps réel et n'endommagent pas les cellules. Dans le test classique de Transwell® (qui sera détaillé plus loin), une monocouche cellulaire est cultivée sur un insert de membrane, avec des milieux de chaque côté. Une tension (ou un courant) est appliquée entre les électrodes placées dans les compartiments apical et basolatéral, et l'impédance est calculée sur la base du courant résultant et normalisée à la surface Figure 9. Cette figure schématise la mesure de la résistance dans un système de voltohmètre utilisant des électrodes baguettes. Les électrodes (E1, E2) de chaque côté de la monocouche de cellules sur un filtre poreux sont utilisées pour déterminer la résistance électrique. Les valeurs TEER à travers les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines ne peuvent pas être facilement mesurées *in vivo*. Les valeurs de TEER à travers les cellules endothéliales de cerveau de rat et de grenouille ont été mesurées dans un intervalle de 1 200 à 1 900 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. En revanche, les cellules endothéliales périphériques ont un TEER d'environ 10 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Les valeurs de TEER pour les cellules endothéliales

microvasculaires cérébrales (BMEC) primaires sont très variables, chutant rapidement après seulement 1 à 2 passages (17). Les expériences avec des microvaisseaux à la surface du cerveau de rat ont déterminé que la résistance moyenne des microvaisseaux veineux était de $800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ et la résistance moyenne des microvaisseaux artériels de $2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$, avec une moyenne globale de $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (29). Les mesures de TEER ont été largement utilisées pour caractériser les jonctions serrées. Les mesures de TEER effectuées à travers des cellules cultivées sur Transwell® donnent des résistances bien inférieures aux valeurs de 1 500 à 2 000 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ rapportées pour les mesures *in vivo*. Les valeurs supérieures à 150–200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ sont considérées comme appropriées pour étudier le transport des solutés et des médicaments. Même si la comparaison quantitative avec les mesures *in vivo* est difficile, les mesures de TEER permettent toujours une évaluation qualitative des conditions qui induisent les propriétés de la BHE. Par exemple, le rôle important des astrocytes dans l'induction des propriétés de la BHE est démontré par l'augmentation des valeurs TEER observée par co-culture de cellules endothéliales avec des astrocytes ou dans des milieux conditionnés par les astrocytes. De même, l'augmentation du TEER observée dans les modèles tri-culture fournit une preuve supplémentaire du rôle des péricytes dans l'induction des propriétés de la BHE (4).

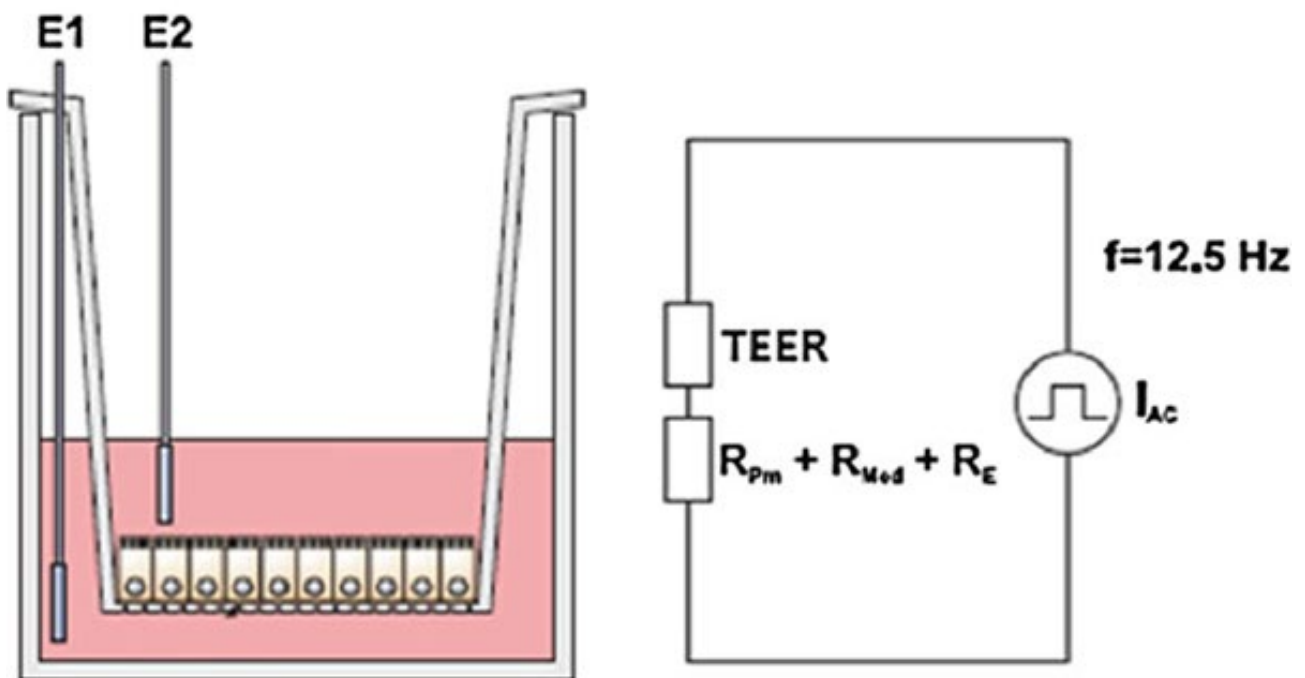


Figure 9 : Méthode de mesure du TEER. R_{Med} : Résistance du milieu de culture cellulaire dans les deux compartiments, R_{pm} : Résistance de la membrane des inserts et R_E : Résistance de l'interface électrode-milieu ; I_{AC} , courant alternatif (30).

Une étude récente de mesure de TEER sur des cellules endothéliales de différentes espèces montre que le TEER n'est pas forcément corrélé à la perméabilité de la BHE mais plutôt à la taille des cellules qui la constitue. Cela confirme que ce paramètre est une mesure relative de la

perméabilité de la BHE (31). Dans une revue, Vigh et al présentent les configurations, les électrodes et les instruments utilisés pour mesurer le TEER à travers les microvaisseaux cérébraux et dans les modèles de BHE *in vitro*. Ces travaux mettent en évidence les difficultés de mesures de TEER *in vivo*. Les auteurs soulignent l'influence de paramètres physiques et techniques souvent négligés tels que la température, la viscosité, la densité de courant générée par différents types d'électrodes, la taille de surface, la circonférence et la porosité de la membrane de l'insert (32). Il est plus juste de se fier à une évolution du TEER dans un modèle au cours d'une culture de cellules endothéliales qu'à une mesure seuil absolue.

1.1.3.3 Contraintes de cisaillement

La pression artérielle exerce une force normale à la paroi d'un vaisseau qui impose une contrainte circonférentielle sur le vaisseau, tandis que le flux sanguin entraîne une contrainte de cisaillement, parallèle à l'endothélium dans le sens du flux sanguin. La contrainte de cisaillement est une force tangentielle appliquée à l'endothélium vasculaire générée par le flux sanguin. Elle a un rôle modulateur critique de l'expression des jonctions serrées et des transporteurs (33). Ces contraintes jouent un rôle important dans la régulation de la morphologie et de la fonction des cellules endothéliales ainsi que dans la médiation d'un large éventail de processus de signalisation et de transport entre le système vasculaire et les tissus environnants. Ces stress participent à la régulation de la BHE. Les valeurs moyennes temporelles typiques de la contrainte de cisaillement sont dépendantes du diamètre des capillaires (4). Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales exposées à une contrainte de cisaillement physiologique deviennent plus plates et plus grandes et présentent une augmentation du nombre de vésicules d'endocytose, des microfilaments et des fosses recouvertes de clathrine, ressemblant ainsi plus étroitement à celui du phénotype de la BHE *in vivo*. Ces forces mécaniques guident la physiologie et le développement de chaque système organique. En tant que tissu le plus mou du corps humain, le cerveau possède un microenvironnement biomécanique particulier. Dans des conditions physiologiques, la pression intracrânienne est maintenue entre 0,05 et 0,1 kPa, elle augmente à 0,3–0,5 kPa lors de la toux ou des éternuements. Le flux sanguin circulatoire dans le cerveau génère une contrainte de cisaillement qui s'applique à l'endothélium vasculaire et se transmet aux neurones et aux cellules gliales autour des capillaires cérébraux. La gamme de force de cisaillement est de 10 à 70 dynes/cm² dans la circulation artérielle et de 2,8 à 95,5 dynes/cm² dans la circulation capillaire. La large gamme de flux dans les capillaires est en partie due au couplage neurovasculaire et aux différentes demandes métaboliques. Il a été rapporté que les forces de cisaillement étaient comprises entre 5 et 23 dynes/cm² dans les vaisseaux capillaires du réseau vasculaire cérébral humain, tandis que les forces de cisaillement moyennes sont comprises entre 20 et 40 dynes/cm² dans les capillaires cérébraux de modèles de rongeurs. Cependant, les valeurs de contraintes de

cisaillement appliquées dans les recherches varient considérablement selon le modèle *in vitro* utilisé (34). Bien que ces effets aient été largement documentés dans les cellules endothéliales périphériques, la réponse des cellules endothéliales microvasculaires du cerveau à la contrainte de cisaillement semble unique. Contrairement à ce que décrit Wang et al (34), Jamieson et al décrivent que les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) s'allongent dans le sens de l'écoulement alors que les cellules endothéliales microvasculaires du cerveau restent arrondies. D'autres caractéristiques physiques des capillaires, telles que le degré de courbure des vaisseaux, se sont avérées provoquer un allongement et un alignement des HUVEC mais pas des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales immortalisées, fournissant une preuve supplémentaire de leur phénotype unique. De nombreux détails sur le phénotype des cellules endothéliales microvasculaires du cerveau restent à résoudre (17). La contrainte de cisaillement peut également réguler positivement les gènes associés aux protéines jonctionnelles et aux transporteurs (4). Les contraintes de cisaillement sont un paramètre à prendre en compte pour relativiser les résultats obtenus dans des modèles statiques de BHE *in vitro*.

1.1.4 Mécanismes de passage de la BHE

La BHE permet une sélection des molécules qui entrent et sortent du cerveau. Les différents types cellulaires décrits ci-dessus sont arrangés de façon particulière pour une étanchéité quasi-totale de la BHE. Cette propriété est liée aux jonctions serrées mais également à l'absence de fenestrations, à un métabolisme différent, et aux transporteurs d'efflux des cellules endothéliales (35). Cependant, il existe plusieurs voies de passage à travers la BHE qui sont bien définies.

Les différents mécanismes permettant de franchir la BHE sont illustrés à la Figure 10 (36,37).

1.1.4.1 Transport passif

Les petites molécules hydrophiles peuvent utiliser la voie paracellulaire (Figure 10-A), mais cette voie est minoritaire en raison des jonctions serrées entre les cellules endothéliales cérébrales (38). Les petites molécules lipophiles telles que les benzodiazépines ou les inhibiteurs de la cholinestérase utilisent la diffusion passive transcellulaire à travers les membranes lipidiques (Figure 10-B) (39). Dans les deux cas précédents, il s'agit d'un transport passif qui ne nécessite pas d'énergie et qui est conditionné à un gradient de concentration entre le sang et le cerveau.

1.1.4.2 Transporteurs

Des protéines de transport liées à la membrane favorisent l'influx dans le cerveau de substances essentielles, telles que les acides aminés, les sucres, les vitamines, les électrolytes, les nucléosides, les acides biliaires, éventuellement des protéines (Figure 10-C) (40). Les transporteurs de nutriments (SLC) en sont une large partie, mais d'autres également tels les canaux ioniques ou

les pompes. Le transport peut être soit passif et lié au gradient électrochimique soit actif et lié à un échange avec un autre soluté.

1.1.4.3 *Transport vésiculaire*

Il existe ensuite trois types de transport vésiculaires : La diapédèse (Figure 10-G) et l'endocytose en phase fluide (Figure 10-H) ou pinocytose sont utilisées par les cellules, les virus ou les particules (41). Les protéines plasmatiques solubles telles que l'albumine ou les Immunoglobulines (Ig) G utilisent cette transcytose en phase fluide ou en masse. C'est la voie principale de transfert à travers les cellules endothéliales vers les tissus en périphérie, mais elle est très limitée à travers une BHE saine (42). Ce transport n'est pas spécifique et entraîne tous les solutés présents dans le fluide au moment de l'invagination. Le deuxième transport vésiculaire est destiné aux molécules chargées, polycationiques, qui peuvent se lier à la membrane plasmique et conduire à un processus d'endocytose appelé la transcytose médiée par adsorption (AMT) (Figure 10-F). Les histones ou agglutinines de germe de blé et également l'albumine cationisée utilisent ce mécanisme (42).

1.1.4.4 *Transcytose*

Enfin, la transcytose médiée par les récepteurs (RMT) (Figure 10-E) est un processus endogène spécifique permettant le transport cérébral de protéines telles que l'insuline, le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF), la transferrine, les protéines 1 et 2 liées aux récepteurs des lipoprotéines de basse densité (LRP1 et 2). Ce transport peut être dépendant de l'affinité de la molécule pour le récepteur et de la disponibilité du récepteur. C'est un transport saturable. Le transport actif est directionnel et peut être classé en transport d'influx et en transport d'efflux.

L'AMT et le RMT utilisent des processus d'endocytose et d'exocytose de vésicules formées par invagination de la membrane plasmique apicale. Ces vésicules peuvent être recouvertes soit de clathrine, soit de cavéoline (43).

1.1.4.4.1 *Transcytose médiée par les clathrines*

La clathrine est un hexamère d'environ 650 kDa constitué de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères de tailles comprises entre 100 et 150 nm (44). Plusieurs protéines jouent un rôle dans la biogenèse des vésicules recouvertes de clathrine au niveau de la membrane plasmique (45). AP2 (46), un complexe protéique constitué d'adaptines, facilite la formation de fosses revêtues de clathrine. La GTPase dynamine permet à la fosse de se libérer de la membrane plasmique (47), conduisant à la formation de vésicules recouvertes de clathrine. La couche de clathrine est ensuite éliminée par l'ATPase HSC70 (48) et la vésicule non revêtue fusionne avec des endosomes précoces pour entrer dans la voie de tri endosomal (43). Le pourcentage de la membrane plasmique recouverte de clathrine a été estimé à 2% de sa surface totale et varie selon le type cellulaire (49). Il a été démontré que de multiples RMT tels que TFRC (50), InsR (51) et CDC50A, utilisent une

transcytose médiée par la clathrine (52,53) bien que certains de ces RMT aient aussi parfois été associés à un transport médié par les cavéolines.

1.1.4.4.2 Transcytose médiée par les cavéolines

Les cavéoles sont des invaginations sphériques de la membrane plasmique plus petites que les vésicules recouvertes de clathrine. La cavéoline-1 (VIP21) est une phosphoprotéine de 22 kDa qui représente le principal constituant des cavéoles. La famille des cavéolines comprend trois isoformes: la cavéoline-1, 2 et 3 (54). Les cavéolines 1 et 2 sont trouvées au niveau des microvaisseaux cérébraux et plus particulièrement la cavéoline-1 (55), qui a été détectée dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, dans les péricytes et les astrocytes. Les cavéoles se forment dans des régions riches en cholestérol, en sphingolipides et en cavéoline-1 (56). Ce serait leur composition lipidique riche en cholestérol, qui leur conférerait des propriétés biophysiques particulièrement fluides. Cela leur permet de répondre aux modifications de la membrane plasmique et à une modulation dynamique du trafic intracellulaire (57). Dans les cellules endothéliales de la BHE, les cavéoles ne sont pas internalisées de manière constitutive (58). Les cavéoles sont associées à des acteurs protéiques tels que la N-ethylmaleimide Sensitive Factor (NSF), « *Soluble NSF Attachment Protein (SNAP)* » ou encore les protéines de fusion « *vesicle SNAP Receptor (vSNARE)* », impliqués dans le détachement des vésicules de la membrane plasmique et la fusion à des compartiments intra-cellulaires (59). La cavéoline-1 pourrait être associée à des récepteurs comme ceux du facteur de croissance endothéliale vasculaire (Flk-1) (60), du cholestérol, des acides gras, des lipoprotéines de haute densité (HDLs) (61,62), de la leptine (63) ou des immunoglobulines G (64). Il a été démontré que la cavéoline-1 régule l'expression de l'occludine et de ZO-1 dans un modèle de BHE *in vitro* (65). De nombreuses études, rapportant des BHE dysfonctionnelles dues à une transcytose accrue, ont incriminé les vésicules de cavéoline comme les principales contributrices des fuites (66–69). La génération de souris transgéniques déficientes pour la cavéolin-1 dans l'organisme entier (70,71) ou sur des types cellulaires ciblés (72) permettront de mieux comprendre ce mécanisme (43).

Les transporteurs d'influx aident les composés à pénétrer dans le cerveau, tandis que les transporteurs d'efflux déplacent les composés hors du cerveau. Plusieurs transporteurs actifs sont impliqués dans le passage des médicaments à travers la BHE.

1.1.4.5 Efflux

La plupart des transporteurs d'efflux sont situés au niveau de la membrane luminale (face au sang) de la BHE (73,74). Les principaux sont la P-gp, la protéine de résistance au cancer du sein (BCRP) et les protéines associées à la multirésistance 1-9 (MRP-1-9) (Figure 10-D) dont les propriétés sont d'effluer certains xénobiotiques (75,76). Un efflux beaucoup plus rapide du cerveau vers le sang a

été observé pour les anticorps, comparé à l'albumine probablement dû au récepteur Fc néonatal (FcRn, Figure 10-D) (77). Paradoxalement, des expériences utilisant des IgG marquées chez des souris déficientes en FcRn n'ont montré aucune différence majeure dans les rapports d'aire sous la courbe cerveau/plasma par rapport aux souris sauvages, suggérant que FcRn ne contribue pas de manière significative au transport de la BHE chez les souris (78).

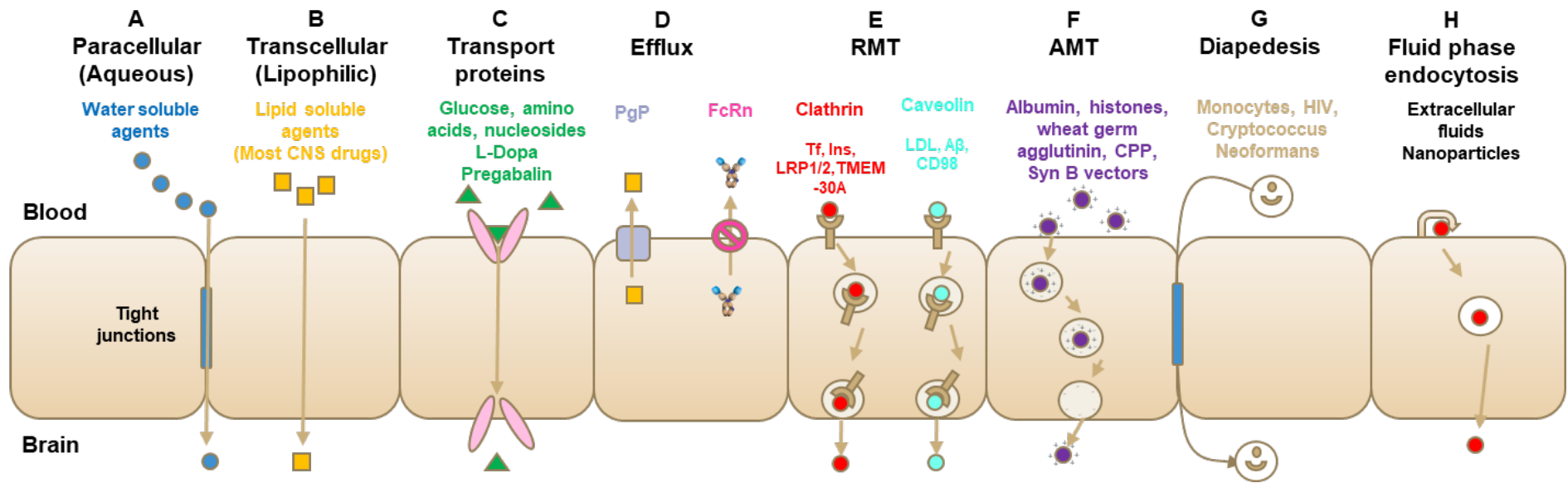


Figure 10: Mécanisme de passage de la BHE. A : Passage paracellulaire, B : Passage transcellulaire, C : Transporteurs de solutés, D : Transporteurs d'efflux, E : Récepteurs médiant la transcytose, F : Transcytose médiée par adsorption, G : Diapédèse, H : Pinocytose (37)

Nous allons maintenant détailler comment il est possible de développer des modèles de BHE *in vitro* rassemblant les caractéristiques propres aux cellules endothéliales microvasculaires cérébrales.

1.1.5 Les modèles *in vitro* de BHE

1.1.5.1 Isolement des cellules endothéliales

Plusieurs protocoles ont été établis pour produire des cellules endothéliales primaires (79–90). Ils sont majoritairement basés sur une dissociation mécanique puis enzymatique du tissu, suivi par une centrifugation sur gradient de densité afin de séparer les microcapillaires les plus denses des lipides qui sont moins denses. La mise en culture peut se faire après une éventuelle filtration des microcapillaires en présence ou non de la puromycine. Cet antibiotique, substrat de la P-gp, permet de ne maintenir en vie que les cellules exprimant la P-gp à savoir les cellules endothéliales (91). Il ne modifie pas l'expression des gènes (92).

Il faut noter l'immense difficulté à trouver des sources de cellules endothéliales primaires humaines, nous y reviendrons un peu plus loin au cours de notre travail. Pour pallier cette difficulté l'équipe de Pierre-Olivier Couraud en 2005 a généré une lignée cellulaire stable à partir de cellules endothéliales cérébrales humaines nommée hCMEC/D3 (93). Il existe d'autres lignées de cellules endothéliales cérébrales humaines telles que : hBMEC, TY10 et BB19 (94). La lignée cellulaire endothéliale microvasculaire cérébrale humaine hCMEC/D3, la lignée cellulaire endothéliale de rat RBE4 et la lignée cellulaire endothéliale microvasculaire cérébrale de souris bEnd.3 ont la plus grande fréquence d'utilisation. Depuis l'introduction de la lignée cellulaire hCMEC/D3 dans la recherche universitaire et industrielle, plus d'une centaine d'articles ont été publiés les utilisant. Bien que la monocouche hCMEC/D3 affiche des valeurs de TEER modérées ($\sim 50 \Omega \cdot \text{cm}^2$), cette lignée cellulaire présente des caractéristiques des cellules endothéliales de la BHE et est devenue un modèle couramment utilisé pour les études sur la BHE *in vitro*. Cette lignée cellulaire est capable de garder un phénotype endothélial jusqu'à 35 passages, y compris l'expression et la distribution de protéines des jonctions serrées, des transporteurs et des récepteurs endothéliaux de la BHE. Toutes ces propriétés les rendent utilisables en routine. bEnd.3 et bEnd.5 sont des lignées cellulaires immortalisées dérivées de souris disponibles dans le commerce et largement utilisées. Les cellules bEnd.3 semblent développer une barrière plus étroite que bEnd.5 en raison de niveaux d'expression plus élevés des protéines de jonctions serrées - claudine-5, occludine et ZO-1. Les cellules bEnd.3 se développent rapidement et conservent le phénotype endothélial sur plusieurs passages. RBE4 est l'une des lignées de cellules endothéliales de cerveau de rat immortalisées les mieux caractérisées et les plus utilisées dans la modélisation de la BHE malgré le fait qu'elle ne parviennent pas à former les jonctions serrées, entraînant ainsi une perméabilité paracellulaire

élevée (95). Qu'on utilise des lignées ou des cellules primaires, la culture modifie le phénotype des cellules endothéliales au cours du temps (96).

Plusieurs groupes se sont orientés vers la production de cellules endothéliales dérivées d'iPSC à la suite de la première publication de Lippmann (97). Ils ont établi un protocole de différenciation de cellules pluripotentes en cellules endothéliales (98) (99). Cependant, le phénotype n'est pas totalement endothélial, ne présente pas certains marqueurs comme PECAM1 par exemple et ressemble plus à un phénotype épithélial (100).

Il existe une grande diversité de modèles de BHE *in vitro* liée à la source de cellules utilisées, au nombre de types cellulaires représentés, à la condition statique ou dynamique.

1.1.5.2 Modèle de Transwell®

Pour permettre des études sur le transport des médicaments, des progrès dans la configuration de la culture ont été réalisés, aboutissant à une culture cellulaire sur une membrane filtrante suspendue dans un puits, le système dit Transwell®. Il est représenté sur la Figure 11. Le système Transwell® est un système de diffusion verticale à travers une couche de cellules endothéliales côte à côte. Il est constitué d'une membrane microporeuse semi-perméable sur laquelle les cellules ensemencées sont immergées dans un milieu de culture. Elle sépare les compartiments vasculaires (apical ou luminal) et parenchymateux (basolatéral ou abluminal). Les systèmes de Transwell® sont idéaux pour les études cinétiques linéaires du transport en raison des volumes fixes de chaque compartiment (101).

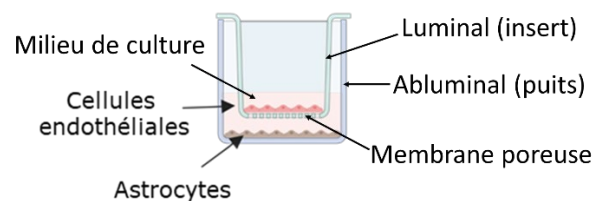


Figure 11: Schéma d'un dispositif Transwell®. Image créée par Biorender.

Les modèles de BHE *in vitro* utilisant des Transwell® sont différents selon les matériaux qui constituent la membrane perméable (102,103). Les membranes en polycarbonate sont translucides et compatibles avec la plupart des fixateurs et colorants organiques mais ne sont pas transparentes à la lumière. Les membranes en PET (polyester) sont transparentes au microscope en contraste de phase ce qui permet de suivre l'évolution de la culture. La taille et la densité des pores doit être prise en compte selon les expériences réalisées. La migration cellulaire n'est pas possible sur des pores inférieurs à 3µm. Certains auteurs mettent en garde sur l'influence des membranes sur les mesures de TEER (32).

Le revêtement utilisé sur ces membranes pour l'adhésion et la prolifération des cellules peut varier d'un modèle à un autre. Le collagène est utilisé, il peut être complété avec de la fibronectine ou d'autres protéines de la matrice extracellulaire (104).

Ces dispositifs peuvent être ensemencés de différentes façons avec des mono-, co- ou tri-cultures. Plusieurs de ces modèles statiques différents sont publiés et ils ont tous leurs propriétés intrinsèques (85,96,105–112).

1.1.5.3 Monocultures vs co ou tri-cultures

La diversité des modèles de BHE *in vitro* vient de la nature des cellules endothéliales utilisées. Elles peuvent provenir d'espèces différentes. Elles peuvent être primaires ou provenir de lignées. L'utilisation est différente. Les cellules endothéliales primaires sont plus délicates à produire selon l'espèce utilisée. Les sources de cerveau humain sont très rares et le temps entre le décès et la mise en culture est primordial. Les sources de cerveau de souris sont beaucoup plus faciles à obtenir mais le rendement de production des cellules endothéliales est assez faible. Le problème majeur, quelle que soit l'espèce, reste la disparition du phénotype en fonction du temps passé en culture, du nombre de passage et de la congélation des cellules (Figure 12) (96) (113).

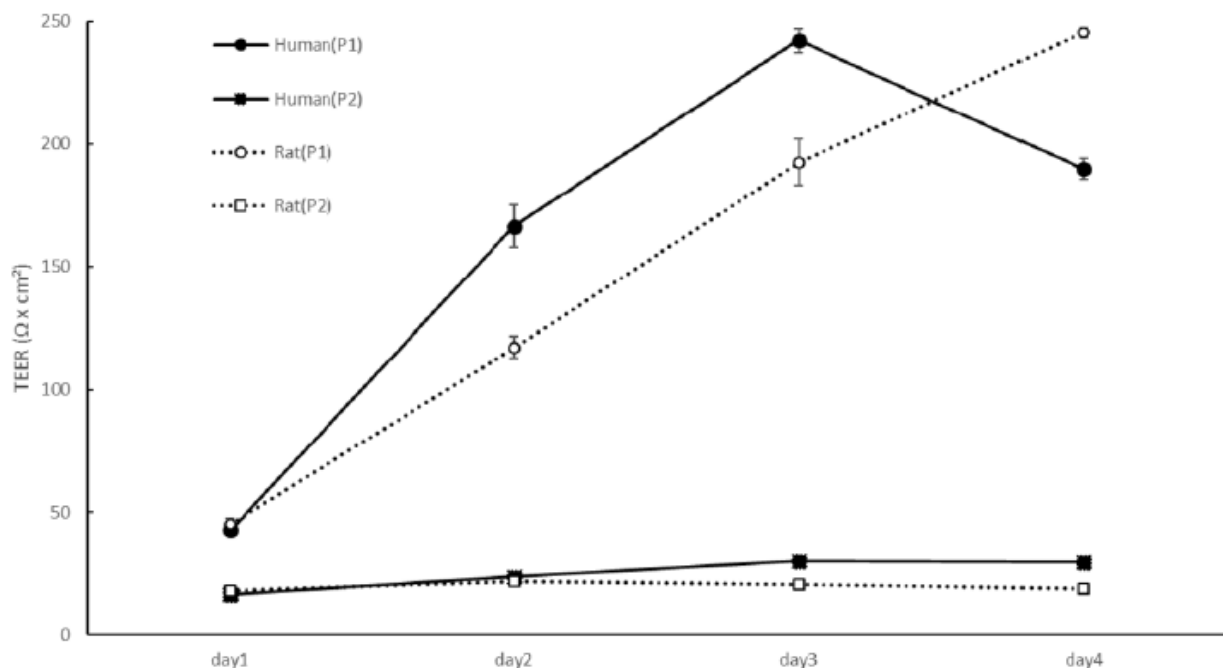


Figure 12 : Evolution du TEER au cours d'une culture de cellules endothéliales primaires cérébrales humaines ou de rat après 1 ou 2 passages (113).

Les cellules endothéliales cérébrales primaires sont produites en quantité limitée mais elles ont un phénotype plus proche de celui des cellules de la BHE *in vivo*. L'utilisation de lignée de cellules endothéliales est plus simple mais elles présentent un phénotype plus éloigné des cellules

endothéliales *in vivo*. Etant disponibles en plus grande quantité, elles vont plus facilement permettre de réaliser des tests de criblage.

Les monocultures endothéliales sont les modèles de BHE *in vitro* les plus simples. Dans de tels modèles, des cellules endothéliales cérébrales de différentes espèces comme murine, porcine, singe, rat, bovin et humain sont cultivées sur une membrane semi-perméable, à travers laquelle, la perméabilité est évaluée. Ces cellules sont généralement cultivées sur des membranes de Transwell® recouvertes de collagène I de queue de rat ou de protéines de membrane basale telles que le collagène IV, la fibronectine, la laminine (4). Les principaux avantages des modèles de BHE en monocultures sont leur fabrication simple et leurs coûts modérés, ce qui rend le criblage à haut débit réalisable. Cependant, en l'absence d'autres composants cellulaires de la BHE, en particulier les astrocytes et les péricytes, les modèles donnent des valeurs TEER relativement faibles. Plus important encore, l'expression de protéines comme la P-gp, contribuant à conférer le phénotype BHE, peut être perturbée. Ces changements provoquent des anomalies significatives de la perméabilité de la BHE (114).

Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sont souvent co-cultivées avec des astrocytes et / ou des péricytes pour induire des propriétés de BHE. Les astrocytes sont généralementensemencés dans le compartiment inférieur d'un puits de Transwell®, soit sur le côté opposé de la membrane des cellules endothéliales soit sur le fond de la boîte pour fournir des facteurs sécrétés. Les milieux conditionnés par les astrocytes sont également couramment utilisés dans les systèmes Transwell®, car les facteurs solubles sécrétés par les astrocytes, tels que le β FGF et le GDNF, augmenteraient les propriétés des jonctions serrées (115). Différents modèles de BHE *in vitro* ont été développés pour prendre en compte l'effet des astrocytes sur la fonction BHE. Les astrocytes peuvent être cultivés sur le côté opposé de la membrane semi-perméable pour interagir avec les cellules endothéliales. Ou bien, des astrocytes ou un milieu conditionné par des astrocytes contenant du matériel soluble sont incorporés au fond des puits permettant aux facteurs solubles d'induire leurs effets. La dernière approche a montré une meilleure réponse de perméabilité. Les cellules endothéliales de rongeurs co-cultivées avec des cellules gliales de rongeurs sont la combinaison la plus largement utilisée. Les modèles de BHE *in vitro* qui sont co-cultivés avec des astrocytes présentent de bonnes propriétés de barrière avec un coefficient de corrélation de 0,98 par rapport aux données *in vivo* d'une série de petites molécules (116). La co-culture modifie l'expression de plus de 50 gènes impliqués dans le métabolisme et la régulation des protéines, la structure et la motilité cellulaire (114). Les résultats obtenus semblent meilleurs avec des astrocytes plutôt qu'avec des milieux conditionnés (117). Dans cette autre étude, la culture la plus efficace pour augmenter les valeurs TEER et l'expression des jonctions serrées, est le modèle de co-culture en contact de cellules endothéliales avec des astrocytes. Ces résultats confirment

l'importance de la communication cellulaire avec les astrocytes dans l'induction et le maintien de l'intégrité de la BHE. Ils ont également montré que la co-culture de cellules endothéliales avec des péricytes a donné des valeurs de TEER plus élevées par rapport à une monocouche de cellules endothéliales, confirmant ainsi la communication des péricytes avec les cellules endothéliales pour contribuer à l'étanchéité de la barrière (118,119).

Les péricytes sont les voisins les plus proches des cellules endothéliales cérébrales au sein de la BHE *in vivo*. Ils jouent différents rôles dans la réponse immunitaire, la contraction, la phagocytose et l'angiogenèse, en plus de participer à la formation de la membrane basale en synthétisant le collagène IV, la laminine et les glycosaminoglycanes. Les péricytes sont également capables d'altérer la perméabilité paracellulaire en régulant les gènes comme l'occludine et le facteur de croissance TGF- β dans les cellules endothéliales cérébrales. La fonction de perméabilité des modèles de BHE *in vitro* contenant des péricytes a montré une performance supérieure par rapport aux modèles contenant des astrocytes. Les péricytes peuvent également induire les activités fonctionnelles de transporteurs ABC. Néanmoins, plusieurs rapports indiquent que l'effet des astrocytes et des péricytes dans les modèles de co-culture dépend fortement de l'origine des types cellulaires. De plus, un contact direct entre les cellules endothéliales et les péricytes dans les modèles de co-culture est essentiel pour induire des propriétés de la BHE tandis que les astrocytes peuvent agir à distance (114). L'influence des péricytes sur le transport dans le test Transwell® n'est pas bien comprise et peut dépendre de leur stade de différenciation (120).

Les modèles de tri-culture avec des cellules endothéliales ensemencées sur une membrane de Transwell®, soit des astrocytes ou des péricytes sur le côté opposé de la membrane, et le troisième type de cellule ensemencé au fond du puits, ont amélioré les propriétés de la BHE par rapport à des modèles de co-culture (4). Ils sont représentés Figure 13. Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sont cultivées sur le dessus des inserts microporeux semi perméables (Figure 13 a et b) tandis que les astrocytes et les péricytes sont cultivés sous l'insert ou au fond du puits (c et d) dans les conditions de co-culture. Les triples cultures: péricytes, astrocytes et/ou neurones dans différentes configurations (Figure 13 e, f, g et h) ont été investiguées (95). Ce résultat est cependant controversé par Thomsen et al qui présentent des modèles murins de BHE *in vitro* et qui ne mettent pas en évidence d'amélioration des propriétés de la BHE entre la co-culture et la tri-culture (14).

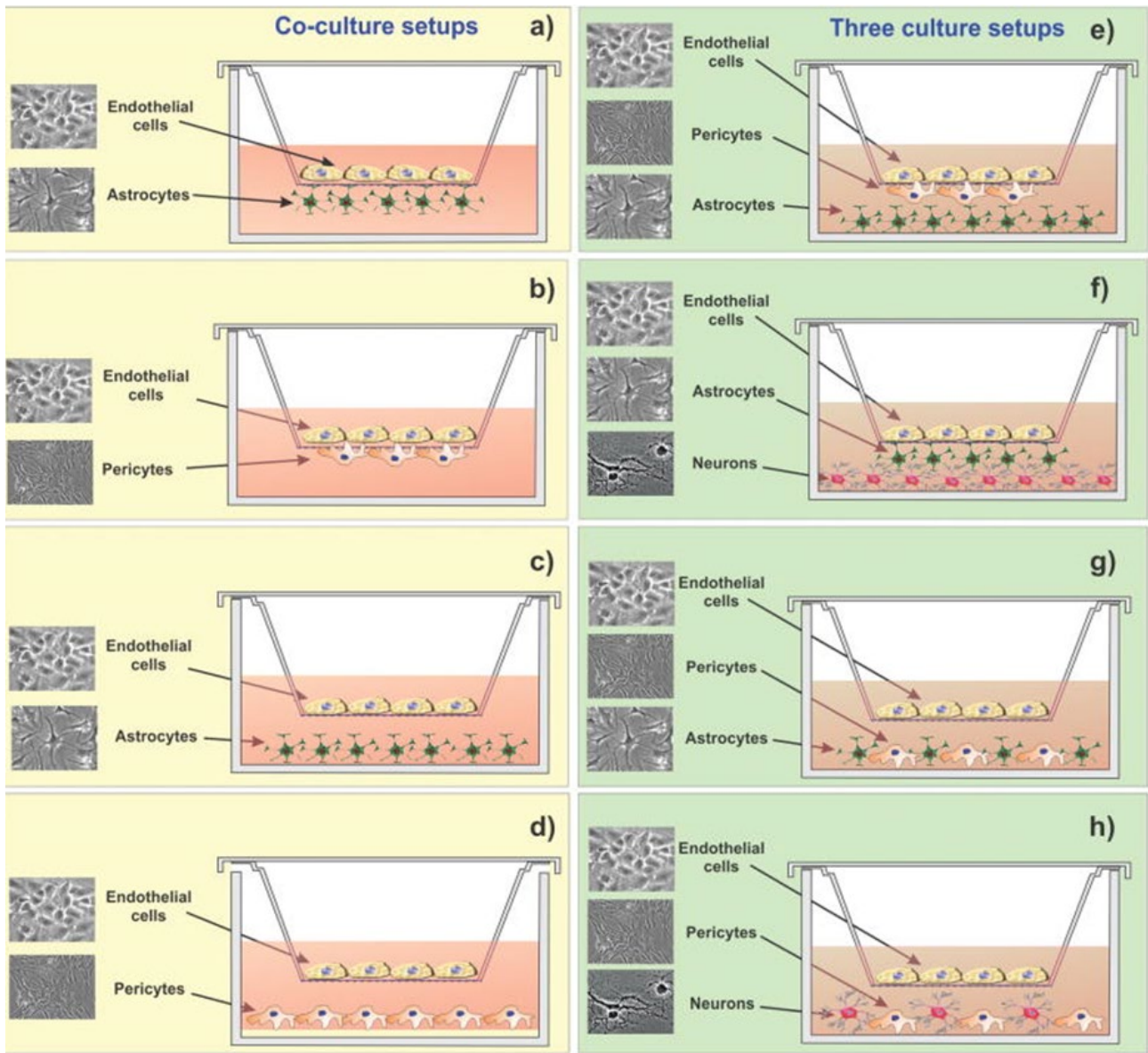


Figure 13 : Modèles de BHE *in vitro* sur des Transwell® utilisant des co-cultures (à gauche) ou des tri-cultures (à droite) (95).

Certains modèles de tri-cultures sont également développés avec des neurones (95). Cette revue de Helms en 2016 répertorie les modèles statiques de BHE *in vitro* (121). En fonction des cellules et des types de culture utilisés, les caractéristiques de chaque modèle peuvent varier.

1.1.5.4 Modèles tridimensionnels

Il existe des limitations inhérentes aux modèles Transwell® décrits plus haut. L'une d'elles est l'absence de structure tridimensionnelle présente *in vivo* (101). Un exemple est illustré Figure 14.

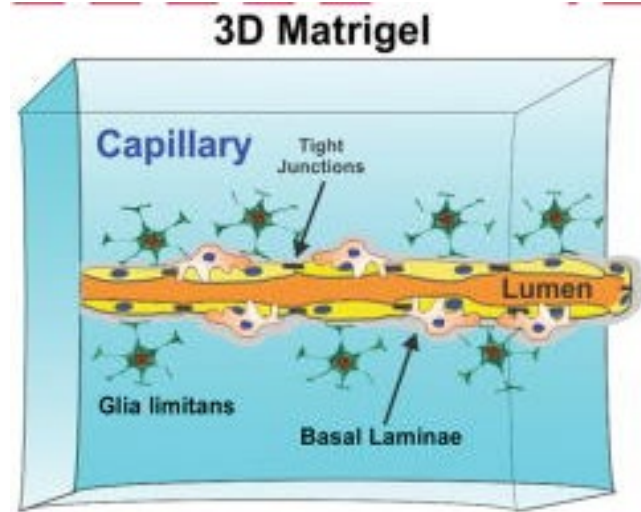


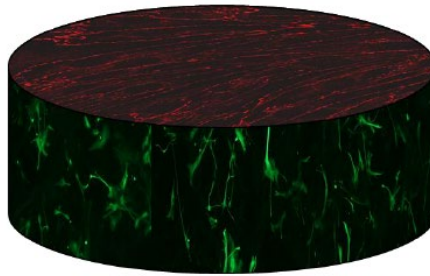
Figure 14: Schéma des modèles de BBE *in vitro* tridimensionnel. Adaptée de (95).

Plusieurs modèles statiques incluent la structure tridimensionnelle existante *in vivo*. Plusieurs de ces modèles tridimensionnels appelés aussi organoïdes, « mini brains » ou « organ-on-a-chip » ont été décrits dans la littérature et sont développés par des entreprises de biotechnologie. Ils utilisent parfois des technologies microfluidiques que nous décrivons dans les modèles dynamiques.

Nous en décrivons plus particulièrement deux que nous connaissons au travers de l'Innovative Medicines Initiative (IMI) Investigating mechanisms and models predictive of accessibility of therapeutics into the brain (IM2PACT). Le premier est le modèle hydrogel (122) dans lequel les cellules sontensemencées sur un gel contenant des astrocytes (Figure 15).

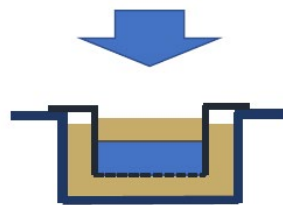
Hydrogel model

Human brain endothelium (ZO-1)



Human astrocytes (GFAP)

Hydrogel model of the BBB developed for Transwell



Transwell®

Figure 15: Modèle Hydrogel des cellules hCMEC/D3 sontensemencées sur un gel contenant des astrocytes (122).

Le second est un modèle de sphéroïdes pour reconstituer une structure tridimensionnelle. Dans ce cas, des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, des astrocytes et des péricytes se sont auto-assemblées en sphéroïdes (Figure 16) (123–125).

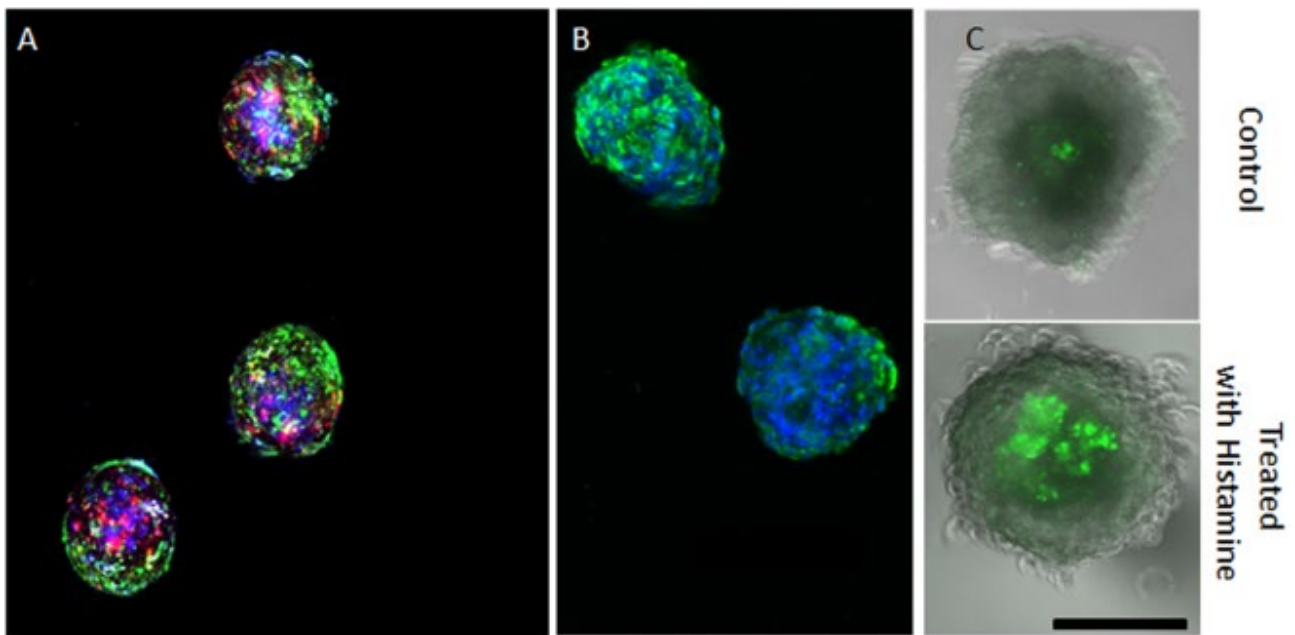


Figure 16 : Sphéroïdes auto-assemblés. Barre d'échelle, 300 μm (126). Neurones (violet), astrocytes (rouge), cellules endothéliales ZO-1 (vert), les noyaux (bleu)

Les sphéroïdes en (Figure 16A, B) montrent une auto-organisation des cellules endothéliales et des péricytes vers l'extérieur tandis que les astrocytes (rouge) et les neurones (violet) sont encapsulés à l'intérieur. La figure montre également des poches vides où il n'y a pas de ZO-1, cela indique que les cellules endothéliales ne recouvrent probablement pas complètement le sphéroïde. L'évaluation de la perméabilité a été effectuée en incubant les sphéroïdes contenant des cellules endothéliales, des péricytes et des astrocytes avec des IgG marquées au FITC (Figure 16C). Le panneau supérieur représente des sphéroïdes avec une barrière de type vasculaire étanche et le panneau inférieur montre des sphéroïdes qui ont été traitées avec de l'histamine pour ouvrir transitoirement la barrière de type vasculaire(126).

Ces modèles 3D marquent une évolution très intéressante du domaine. Pour les compléter, il faut amener une composante supplémentaire : les contraintes de cisaillement que subissent les cellules endothéliales exposées au flux sanguin. C'est l'objectif des modèles de BHE *in vitro* dynamiques.

1.1.5.5 Modèles dynamiques

Un défi difficile à relever avec les modèles de BHE *in vitro* est la fabrication de réseaux vasculaires perfusables de dimension capillaire. La majorité du transport au sein de la BHE se fait dans les capillaires, qui présentent un diamètre moyen d'environ 8 μm chez l'homme. Pourtant, le plus petit microvaisseau reproduit *in vitro* est d'environ 20 à 50 μm , en raison des difficultés à obtenir un ensemencement de cellules endothéliales suffisamment élevé, dans des petits canaux, sans colmatage. Les approches courantes pour surmonter ce problème consistent à stimuler l'angiogenèse capillaire à partir de microvaisseaux plus grands, ou à stimuler l'angiogenèse des

cellules endothéliales intégrées dans une matrice (17). L'exposition de la lignée cellulaire hCMEC/D3 à un flux pulsatile potentialise fortement l'intégrité de la barrière, avec une augmentation de 10 fois des valeurs TEER par rapport aux cultures statiques. La contrainte de cisaillement induit efficacement l'expression des gènes des jonctions serrées dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales primaires de diverses espèces (y compris humaines), améliorant ainsi l'étanchéité de la BHE (95). L'absence d'exposition endothéliale à une contrainte de cisaillement physiologique limite la différenciation de l'endothélium en phénotype de BHE ou le maintien des propriétés BHE des cellules différenciées (101). Beaucoup de modèles utilisent un flux sur des puces (127–131). Nous allons détailler deux modèles dynamiques développés dans l'IMI IM2PACT.

Les modèles dynamiques peuvent nécessiter une pompe, comme dans le modèle de fibre creuse Figure 17

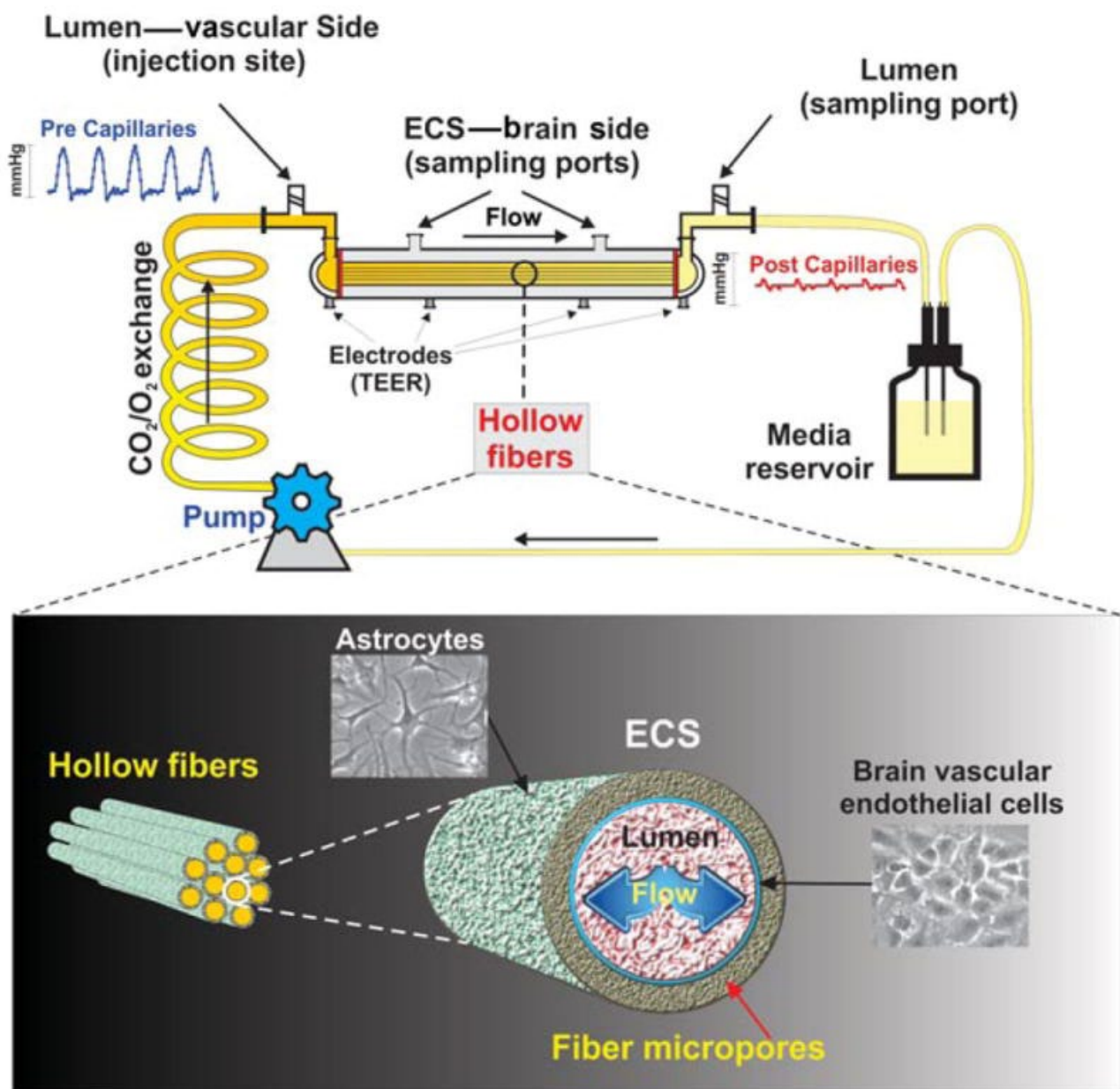


Figure 17: Modèle de BHE dynamique in vitro (DIV-BHE) (132).

Dans ce système, des cellules endothéliales cérébrales sont cultivées dans la lumière de fibres creuses microporeuses de polypropylène enduites de fibronectine, en présence d'astrocytes cultivés sur la surface externe enduite de poly-D-lysine. Le faisceau de fibres creuses est suspendu à l'intérieur d'une chambre étanche. Les capillaires artificiels sont en continuité avec une source de fluide à travers un chemin d'écoulement constitué d'un tube de silicium perméable aux gaz. Des ports positionnés de part et d'autre du module permettent d'accéder aux compartiments luminaux et abluminaux. Les capillaires sont exposés à un flux pulsatile luminal généré par un mécanisme de pompage (132).

L'inconvénient des modèles utilisant des pompes est surtout la difficulté de miniaturisation, l'encombrement dans un incubateur et donc le faible débit de ces modèles difficilement utilisables pour du criblage.

Il existe un modèle dynamique sans pompe développé par Mimetas, « Organoplate » à trois voies. La Figure 18 A est une OrganoPlate à trois voies. La Figure 18 B est un agrandissement d'une puce OrganoPlate à trois voies.

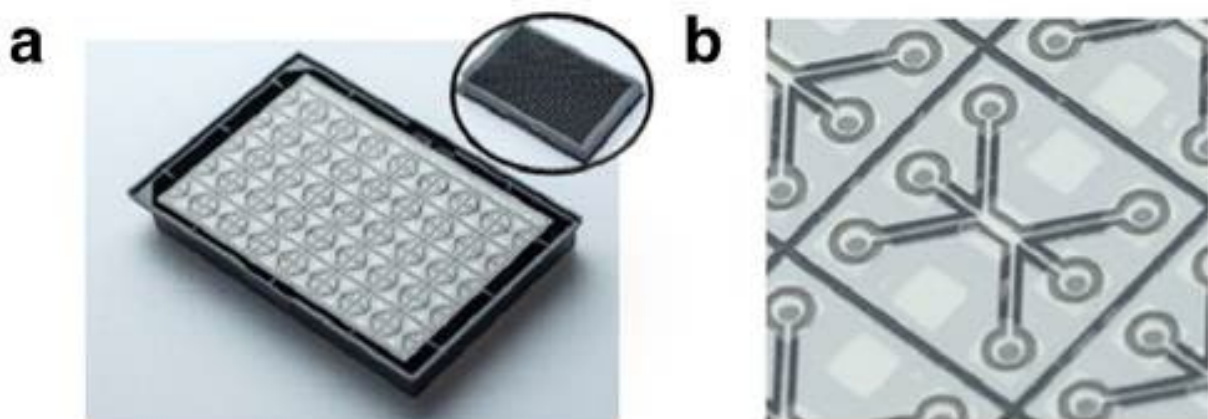


Figure 18 : Une plaque OrganoPlate à trois voies (133).

La plaque combine une plaque de 384 puits sur le dessus avec des canaux microfluidiques sur le fond qui composent 40 puces de culture. Le gel de matrice extracellulaire est ajouté au canal de gel. Deux guides de phase (bords blancs) empêchent le gel de s'écouler dans les canaux de milieu adjacents. Après gélification du collagène (matrice extracellulaire), les cellules endothéliales sont ajoutées à l'un des canaux du milieu et forment une structure de vaisseau. Le microvaisseau a une lumière sur son côté apical qui est perfusée. Ensuite, des astrocytes et des péricytes sont ajoutés à l'autre canal du milieu pour établir une co-culture de BHE. Dans ce modèle, les plaques sont disposées sur une bascule et le liquide circule dans les tubulures de la plaque par gravité. La bascule à lieu 8 fois par minute en moyenne pour reproduire le flux sanguin selon les volumes

indiqués par le constructeur. Le principal inconvénient de ce modèle étant que le flux fait un aller-retour sur les cellules selon l'inclinaison de la bascule ce qui engendre un biais par rapport à ce que les cellules subissent *in vivo*. Ce modèle peut se faire en mono, co ou tri-culture et l'avantage principal est qu'il permet un criblage de composés puisqu'il est miniaturisé en format de plaques 384 (1 plaque offre 40 puces) (133,134). Une revue récente répertorie les modèles de BHE *in vitro* tridimensionnel et dynamique avec flux (135).

Le développement des capillaires perfusables spécifiques du cerveau, en utilisant des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, dans une matrice entourée de connexions physiologiques avec d'autres cellules du complexe neurovasculaire, permet de bénéficier des améliorations des modèles tridimensionnels et dynamiques. Cette ingénierie permet un mimétisme sans précédent du comportement de la BHE dans un environnement contrôlé mais elle est très complexe (17). Plusieurs équipes travaillent ces dispositifs (136,137).

1.1.5.6 IM2PACT objectif : établir un modèle vitro prédictif

IM2PACT est un consortium européen débuté en novembre 2017. Le financement de l'Innovative Medicines Initiative (IMI) au consortium IM2PACT permettra à ce partenariat public-privé, qui comprend des experts internationaux, de faciliter le développement de médicaments pour traiter les troubles neurologiques. Les objectifs sont :

_découvrir et développer des mécanismes de transport cérébral innovants et efficaces,

_établir et caractériser des modèles BHE avec une bonne prévisibilité en matière de santé et de maladie,

_identifier des marqueurs de neurodégénération en reproduisant une BHE altérée dans des conditions pathologiques

_améliorer la compréhension de la BHE en caractérisant des mécanismes physiopathologiques à travers la BHE.

IM2PACT favorisera le développement de traitements innovants dans le cadre de médecine personnalisée. Avec un budget de 18 M€, 9 M€ de financement direct de l'IMI et 9 M€ de financement industriel, IM2PACT noue un large partenariat pour mieux comprendre la BHE. L'entreprise commune IMI 2 est le plus grand partenariat public-privé d'Europe et est financée conjointement par le programme de recherche et d'innovation Horizon 2020 de l'Union européenne et l'industrie pharmaceutique européenne, représentée par la Fédération européenne des industries et associations pharmaceutiques (EFPIA) (138).

Sanofi prend part à ce consortium en tant que leader scientifique. Nous participons également à plusieurs groupes de travail. L'un d'entre eux a pour but de sélectionner parmi cinq modèles *in vitro*

de BHE basés sur des cellules endothéliales humaines dérivées d'iPSC, celui qui reproduirait le mieux une série de données et notamment la transcytose médiée par des récepteurs. Les modèles doivent être faciles à mettre en place et peu coûteux. Ils seront partagés au sein des différentes équipes pour pouvoir tester le plus de molécules possibles dans des conditions homogènes et comparables d'une équipe à l'autre. Le protocole de différenciation d'iPSC de l'université de Würzburg a été sélectionné ainsi qu'un modèle de Transwell® et de sphéroïdes. Il faut maintenant établir des modèles de pathologies cérébrales avec ces cellules dans ces modèles. Il faudra ensuite caractériser le transport de biothérapeutiques à travers ces modèles pour enfin pouvoir établir des modèles mathématiques qui soient reproductibles pour prédire la translabilité *in vitro* à *in vivo*.

Dans le cadre de nos études, tous les modèles *in vitro* de BHE que nous utilisons doivent nous permettre d'évaluer le passage de biothérapeutiques à travers la BHE.

1.1.6 Biothérapeutiques : les anticorps

Les biothérapeutiques sont un nouveau type de molécules thérapeutiques différentes des petites molécules chimiques qui sont largement utilisées. Ce sont des molécules de plus grand poids moléculaire telles que des anticorps, des protéines, des peptides, ou des oligonucléotides. Leurs tailles et leurs propriétés physicochimiques (tel que l'hydrophilie) ne leur permettent pas de traverser la BHE avec les mécanismes non spécifiques décrits plus haut. La façon principale pour les biothérapeutiques de traverser la BHE est par la transcytose. Soit, elle est adsorptive, si sa charge positive est assez élevée, mais ce mode de pénétration non spécifique peut entraîner des effets secondaires et son efficacité est limitée. Soit, elle est médiée par des récepteurs, si on a pu conférer à ce biothérapeutique un élément de reconnaissance spécifique pour un RMT (35). Nous passerons brièvement en revue dans les paragraphes suivants ces récepteurs, et montreront quelques-unes de leurs applications avec des anticorps.

1.1.6.1 Structure d'un anticorps

La structure générale des anticorps a été décrite en 1959 par Porter à la suite des travaux d'Edelman. Ces deux chercheurs ont été associés pour le prix Nobel décerné en 1972. Les anticorps sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines. Ils sont formés de 4 chaînes polypeptidiques (150 000 Da) : deux chaînes lourdes (H pour heavy de 50 000 Da), et deux chaînes légères (L pour light de 25 000 Da) qui sont reliées entre elles par un nombre variable de ponts disulfures assurant une flexibilité de la molécule Figure 19.

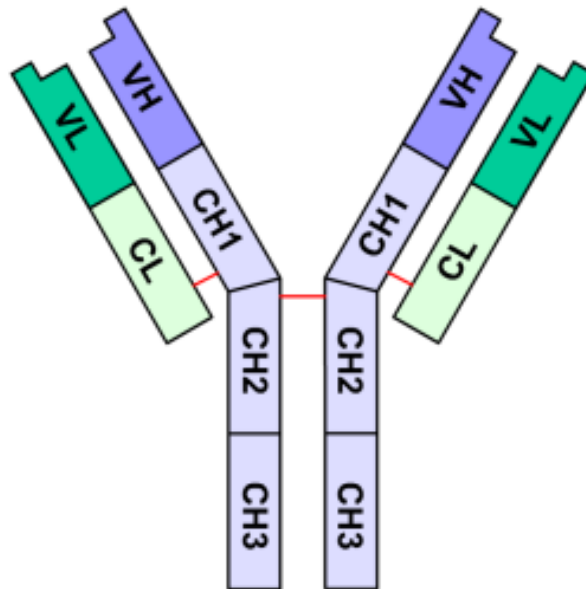


Figure 19 : Schéma de l'assemblage des chaînes d'un anticorps

Ces chaînes forment une structure en Y où chaque chaîne légère constitue pour moitié un bras du Y. Les chaînes légères sont constituées d'un domaine constant et d'un domaine variable. Les chaînes lourdes sont composées d'un domaine variable et de trois ou quatre domaines constants selon l'isotype. Les domaines constants sont caractéristiques de l'espèce et de l'isotype. Chaque chaîne légère en possède un exemplaire noté CL (Figure 20,4). Les chaînes lourdes comportent, selon l'isotype, trois ou quatre domaines constants CH1, CH2, CH3 (Figure 20, 3). Les domaines constants et en particulier le domaine FC ne sont pas impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, mais interviennent dans les fonctions effectrices des anticorps. Il s'agit de l'activation du système du complément ou de l'élimination des complexes immuns (anticorps lié à son antigène) par les cellules immunitaires possédant les récepteurs aux fragments constants (FcγR). De plus, leur interaction avec le FcRn dont nous avons parlé leur confère des propriétés de demi-vies souvent assez longues. Un anticorps possède quatre domaines variables situés aux extrémités des deux « bras ». L'association entre un domaine variable porté par une chaîne lourde (VH) et le domaine variable adjacent porté par une chaîne légère (VL) constitue le site de reconnaissance (ou paratope) de l'antigène. Ainsi, une molécule d'immunoglobuline possède deux sites de liaison à l'antigène, soit un au bout de chaque bras (Figure 20,5).

Le clivage enzymatique spécifique permet d'isoler différents fragments de l'anticorps :

_le fragment Fab. Il a la même affinité pour l'antigène que l'anticorps complet. Le fragment Fab est formé de la chaîne légère en entier (VL+CL) et d'une partie de la chaîne lourde (VH+CH1) (Figure 20, 1). Il est monovalent.

_le fragment Fc : Il est le support des fonctions effectrices de l'anticorps, en particulier sa capacité à être reconnu par des effecteurs de l'immunité ou à activer le complément. Il est constitué des fragments constants des chaînes lourdes (CH2) au-delà de la région charnière (Figure 20, 2). Il ne reconnaît pas l'antigène.

_le fragment Fv. C'est le plus petit fragment gardant les propriétés de l'anticorps que possède l'immunoglobuline. Il est constitué uniquement des régions variables VL et VH (Figure 20, 5). Il est monovalent.

_le fragment F(ab')2. Il correspond à l'association de deux fragments Fab reliés par une petite partie des parties constantes des chaînes lourdes, la région charnière. Il a la même affinité que l'anticorps pour l'antigène. Il est divalent.

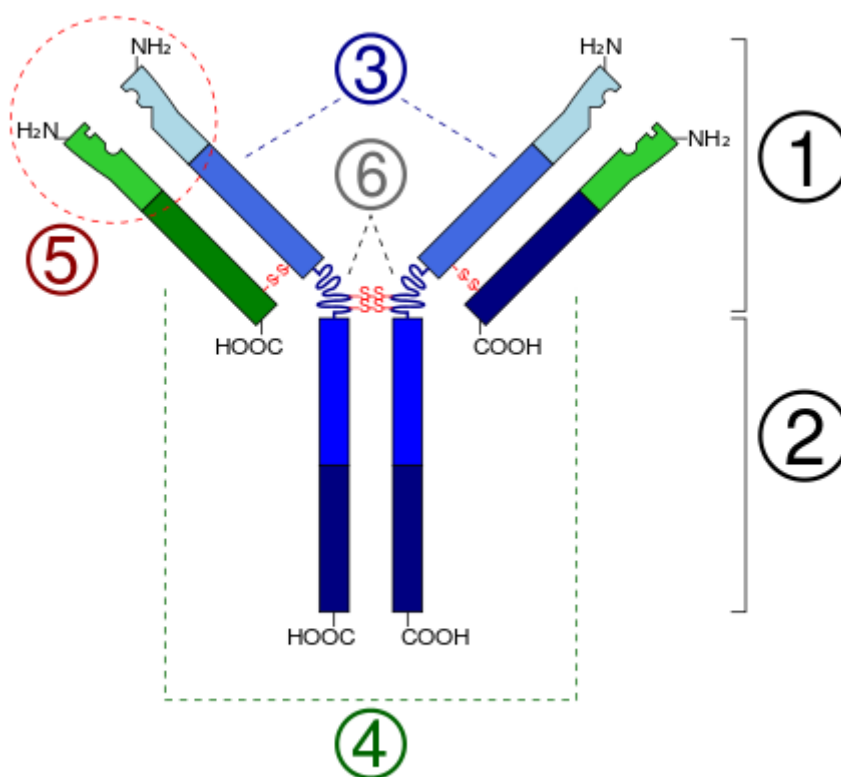


Figure 20: Schéma d'un anticorps monospécifique 1. Fragment Fab 2. Fragment Fc 3. Chaîne lourde (en bleu) avec une région variable (VH) suivie d'une région constante (CH1), une région charnière, et deux autres régions constantes (CH2 and CH3). 4. Chaîne légère (en vert) avec une région variable (VL) et une constante (CL) 5. Paratope 6. Régions charnières (139).

1.1.6.2 Les formats d'anticorps bispécifiques

Les anticorps bispécifiques sont des anticorps qui reconnaissent deux cibles. Par exemple, ils reconnaissent d'une part leur cible thérapeutique et d'autre part la cible du récepteur qui leur

permettra de traverser la BHE. Un très grand nombre de formats bispécifiques existent selon qu'ils sont symétriques ou non, entier ou composés d'un ou de plusieurs fragments, monovalents ou bivalents pour leurs cibles, fusionnés à des protéines, enzymes ou conjugués à des cytotoxiques (Figure 21). Dans le cadre du passage à travers la BHE, les anticorps bispécifiques développés ont des formats différents. Ils sont très bien expliqués dans les revues de Brinckmann et Kontermann (140) et de Stanimirovic (141).

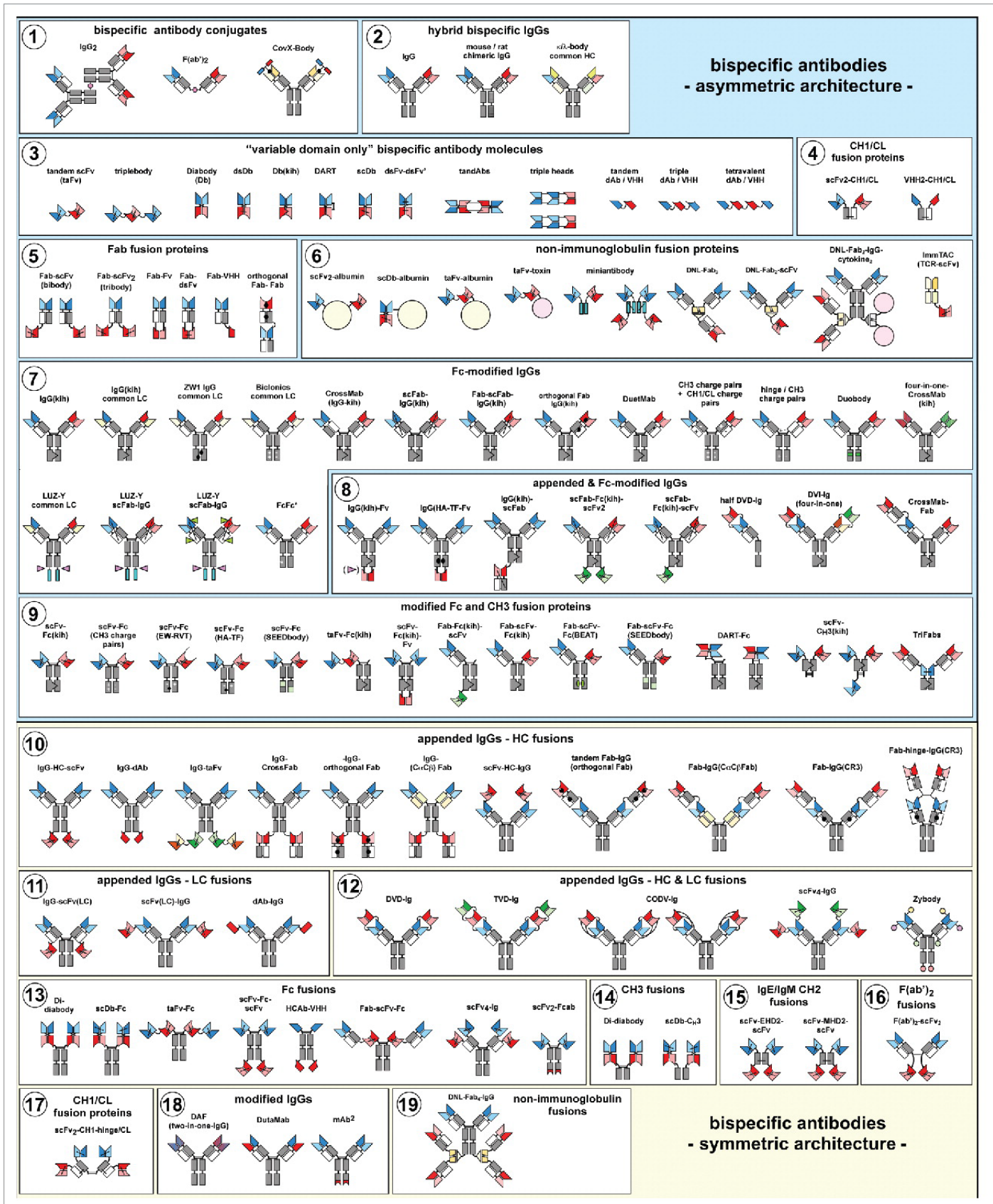


Figure 21 : La diversité des formats d'anticorps bispécifiques.(140).

Au-delà des anticorps conventionnels, il existe des anticorps de camélidés, les Single Variable domain on a Heavy chain (VHH) ou de requin, les Variable New Antigen Receptor (VNAR) qui sont

des fragments d'anticorps à chaîne unique intéressants en raison de leurs plus faibles tailles tout en gardant les propriétés du paratope d'un anticorps. Les VHHs et les VNARs correspondent au domaine variable des anticorps à chaînes lourdes correspondants (Figure 22) (142,143).

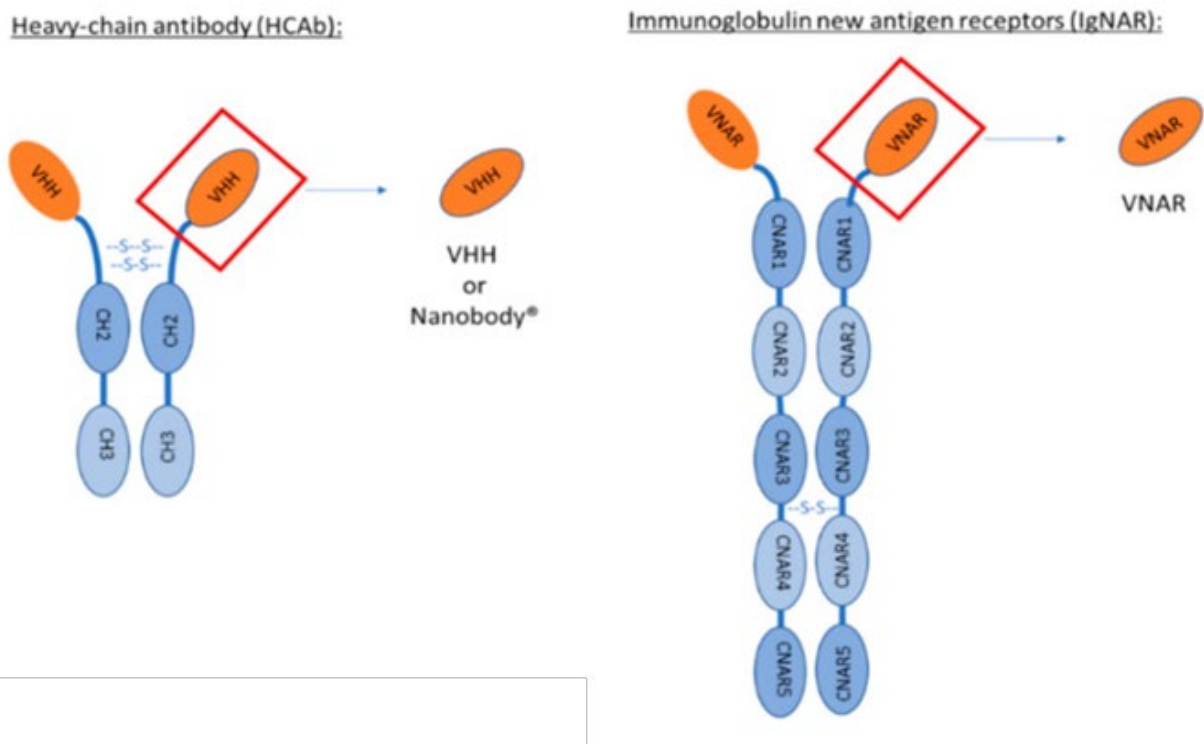


Figure 22 : Représentation schématique d'un anticorps à chaîne lourde trouvé chez les camélidés et d'un récepteur d'antigène d'immunoglobuline trouvé chez les requins (144).

VHH est le domaine variable des IgG2 et IgG3 des chaînes lourdes. VNAR est le domaine variable d'IgNAR (144).

A leur tour ces VHHs et VNARs peuvent être mis à profit dans une variété de formats bispécifiques dans lesquels ils peuvent soit reconnaître la cible thérapeutique soit le récepteur qui les prendra en charge pour traverser la BHE. Une revue récente a fait le point sur les efforts réalisés pour augmenter les expositions cérébrales de ces anticorps à simple domaine (144).

Nous allons à présent passer en revue les stratégies utilisées pour le passage dans le cerveau des biothérapeutiques dans le traitement des pathologies du cerveau.

1.2 Stratégies d'administration de molécules dans le compartiment cérébral

Le ratio tissu/sang pour un anticorps est de l'ordre de 10% à 50% pour les organes périphériques (145). Cependant pour les organes bien protégés comme le cerveau, ce ratio tombe à 0,1% (146). C'est probablement la raison de l'inefficacité de ces traitements dans les pathologies du système nerveux central. La dose de thérapeutiques qui atteint sa cible est trop faible pour médier des effets. Plusieurs biothérapeutiques sont actuellement sur le marché mais ils exercent certainement leur effet en périphérie et seuls ceux qui sont administrés par voie intrathécale

exercent un effet central (37). Aujourd'hui un seul biothérapeutique qui pénètre dans le cerveau a été mis sur le marché pour le traitement de la mucopolysaccharidose (syndrome de Hunter) au Japon en mars 2021. C'est le pabinafusp (IZCARGO®) (147). Il s'agit d'une enzyme lysosomale couplée à un anticorps anti-Récepteur de la Transferrine (TFRC) qui pénètre dans le cerveau par un mécanisme de transcytose que nous verrons plus loin.

Pour pallier le manque d'exposition des biothérapeutiques dans le cerveau, différentes approches sont en cours depuis des années. On peut les classer en cinq grandes catégories : administrer directement dans le système nerveux central, administration intranasale, perméabiliser la BHE par des agents chimiques ou des ultrasons, ajouter des charges positives sur les biothérapeutiques ou enfin à mettre à profit des transporteurs cérébraux spécifiques. Nous détaillerons brièvement ces cinq approches.

1.2.1 Administration intracérébrale

1.2.1.1 Voie intracrânienne

Aujourd'hui, la voie intracrânienne est utilisée pour administrer des médicaments puissants dans le cerveau en quantité suffisante tout en limitant l'exposition périphérique, pour éviter des effets secondaires néfastes. La voie intracérébrale reste une procédure invasive et traumatique, et elle n'est utilisée que dans les cas graves de douleur chronique ou dans les gliomes cérébraux. On peut aussi implanter une matrice polymère biodégradable qui sert de réservoir contenant les agents thérapeutiques. Les avantages de cette procédure sont la libération prolongée et contrôlable du médicament. Le crâne doit être ouvert pour l'implantation. Dans le cas des tumeurs cérébrales, la difficulté à en déterminer avec précision l'étendue est le défi majeur de la résection chirurgicale. Il est peu probable que toutes les cellules tumorales soient retirées par chirurgie, ce qui entraîne une récurrence potentielle. Elle peut être limitée par l'application locale de plaquettes de carmustine dans la cavité de résection accompagnée d'une radiothérapie post-chirurgicale ou une chimiothérapie systémique Figure 23 (148). La pénétration du médicament dépend ensuite de ses caractéristiques physico-chimiques, et l'implant peut ne délivrer qu'une quantité limitée de la molécule (une recharge peut être nécessaire). Par exemple, la plaquette de polymère polyanhydride contenant du BCNU (bis-chloroéthylnitrosourée) (carmustine) est utilisée pour traiter les gliomes récurrents de haut grade. Avec ce dispositif, une libération de médicament pendant 2 mois est possible (101).

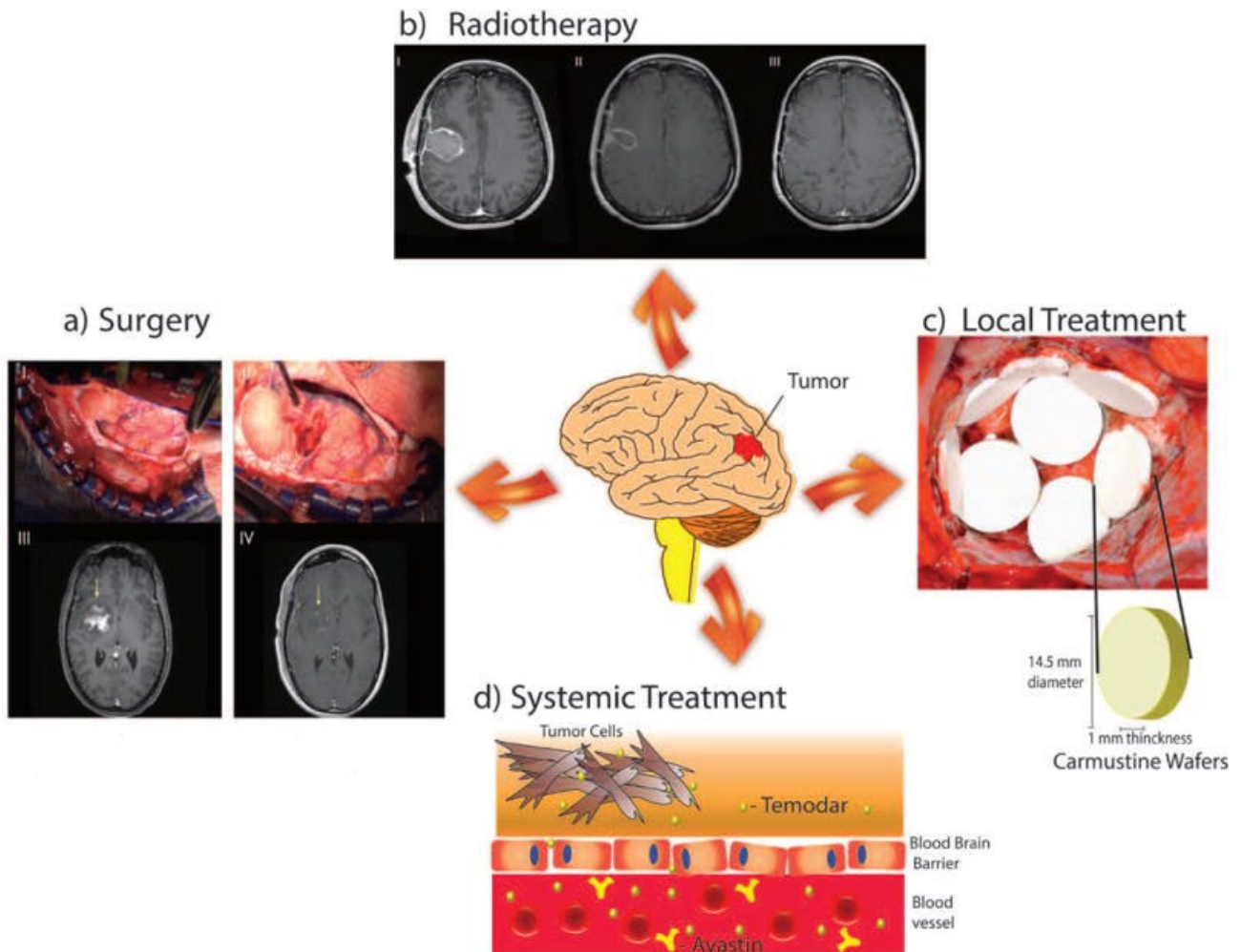


Figure 23: Schéma des normes actuelles de traitements pour les patients atteints de tumeurs cérébrales. a: Chirurgie b: Radiothérapie c: Implantation locale des plaquettes de carmustine, le long des parois de la cavité tumorale d: Traitement administré par voie systémique (148).

Cette voie d'administration est utilisée en dernier recours pour des patients qui n'ont pas d'autres solutions thérapeutiques.

1.2.1.2 Voie intrathécale

L'administration d'agents thérapeutiques par voie intrathécale peut être envisagée pour atteindre le LCR. Dans ce cas les composés atteignent le cerveau en passant par les plexus choroïdes. On peut injecter à plusieurs niveaux du canal spinal soit très haut (intraventriculaire), soit plus bas (cisterna magna) ou encore plus bas au niveau des lombaires. En fonction de ces points d'entrée, les effets cérébraux seront différents, l'injection dans les ventricules donnant la plus grande chance d'accès au cerveau (mais c'est aussi la plus technique) (149). Cependant, cette voie semble plus indiquée pour des désordres qui seraient en surface du cerveau car la pénétration dans le parenchyme profond reste limitée avec la majorité du produit qui est absorbé par l'épendyme (150,151). Ces injections présentent plusieurs types de risques. Ils peuvent être liés à l'administration : atteinte nerveuse, fuites de LCR liée à une brèche durale, hématome secondaire à une brèche vasculaire, ischémie, granulomes. Un traitement anticoagulant est une contre-

indication absolue pour éviter la formation d'hématome. On peut aussi rencontrer des défauts d'asepsie : ces injections peuvent être responsables d'infections nosocomiales sous forme de méningites par exemple. Il faut tenir compte également des erreurs médicamenteuses : car une confusion avec une préparation destinée à la voie intraveineuse peut entraîner un surdosage avec des conséquences qui peuvent aller jusqu'à la mort du patient (152).

1.2.1.3 Approche hyperosmotique

Une solution hyperosmotique produit une perturbation transitoire et réversible de la BHE en rétrécissant des cellules endothéliales et en ouvrant les jonctions serrées. En pratique clinique, la procédure comprend une perfusion intra-artérielle d'une solution hypertonique de mannitol (25%) dans une artère carotide ou vertébrale, suivie d'une administration intra-artérielle de chimiothérapie, pour le traitement des tumeurs cérébrales. Cette stratégie présente les mêmes risques qu'un traitement administré par voie intraveineuse mais elle nécessite plusieurs jours d'hospitalisation avec la pose de cathéter crânien intra-artériel sous anesthésie générale (153). Cette administration a montré son efficacité mais reste lourde à supporter pour les patients.

1.2.2 Administration intranasale

La voie intranasale regroupe en réalité trois grandes voies médicamenteuses permettant d'atteindre le cerveau ; La première est la voie nerveuse olfactive : l'absorption est lente, jusqu'à 24 h, en raison du processus de pinocytose, d'internalisation ou de diffusion simple, puis du passage des neurones olfactifs vers les bulbes olfactifs et ensuite vers le rhinencéphale. La 2^{ème} est la voie de l'épithélium de la muqueuse olfactive (voie olfactive). Elle agit rapidement en quelques minutes. Les substances absorbées dans la lamina propria pénètrent dans le système nerveux central par les espaces entourant le tractus nerveux olfactif. La troisième est la voie de circulation sanguine : les substances sont absorbées par les capillaires sanguins ou la muqueuse respiratoire, ou pénètrent dans la circulation sanguine par la lamina propria de la région olfactive, puis doivent franchir la BHE. La plupart des médicaments de petit poids moléculaire (< 400 Dalton) peuvent être librement transportés dans le cerveau par l'épithélium de la muqueuse nasale. Mais généralement, les médicaments d'un poids moléculaire supérieur à 1000 Dalton montrent une faible capacité à pénétrer cette barrière physiologique (154). Cette voie ne pourra pas être privilégiée pour l'administration d'anticorps dans le cerveau sans formulation dédiée.

1.2.3 Ultrasons focalisés

En clinique sont utilisés les ultrasons focalisés. Ils permettent une ouverture ponctuelle et localisée de la BHE. Différents dispositifs sont utilisés : un dispositif extra crânien d'ultrasons focalisés en hémisphère (ExAblate, NaviFUS) (Figure 24 A), un dispositif extra crânien d'ultrasons focalisés mono-élément (Figure 24 B), un dispositif implantable d'émetteur d'ultrasons non focalisés

(SonoCloud-1) (Figure 24 C) et un dispositif implantable de 9 émetteurs d'ultrasons non focalisés (SonoCloud-9) (Figure 24 D)(155).

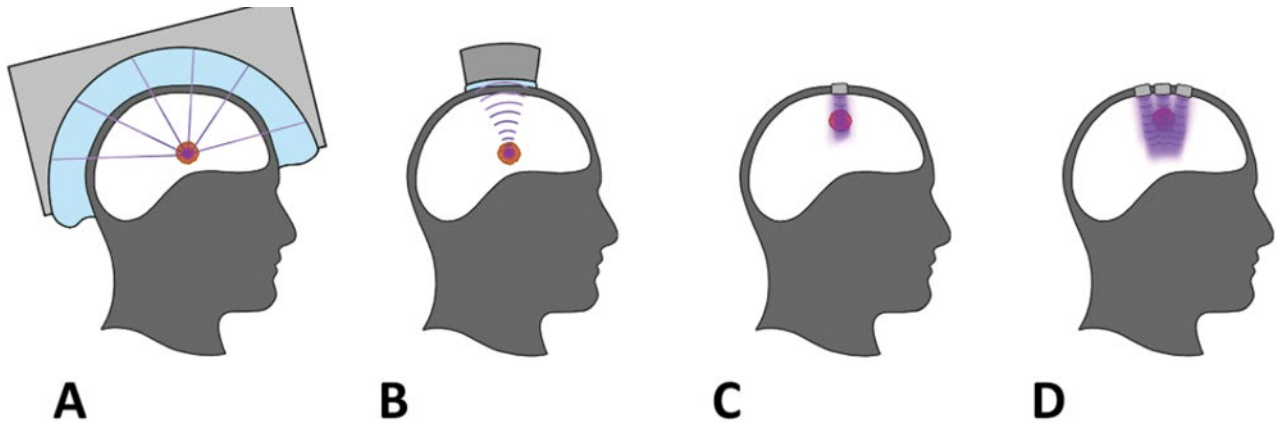


Figure 24 : Représentation schématique des différents dispositifs développés pour une ouverture de la BHE dans des applications cliniques avec des ultrasons pulsés de basse intensité

Ces dispositifs ne sont pas dédiés aux mêmes indications. Les dispositifs extra crâniens sont non invasifs et peuvent se concentrer sur des cibles profondes et variables dans le cerveau. Cependant, ils impliquent le rasage des patients, des procédures immobiles longues (2 à 4 heures), la sonication est limitée à de petits volumes cérébraux (1 à 4 cm³), les lésions superficielles ne peuvent pas être ciblées. Les dispositifs implantables permettent des procédures rapides (4 à 15 mn) et une ouverture de la BHE dans des volumes plus importants (4 à 140 cm³). Cependant ils impliquent une implantation lors d'une intervention chirurgicale de réduction tumorale ou de biopsie. Ainsi, l'utilisation clinique de ces dispositifs pourra être complémentaire, en fonction de l'indication du traitement. Les lésions volumineuses, superficielles et infiltrantes telles que le gliome étendu de haut grade ou le DIPG (diffuse intrinsic pontine glioma) peuvent être de bonnes cibles pour les dispositifs implantables, tandis que les lésions plus petites et profondes, seront plutôt traitées avec des dispositifs extra crâniens (155). Les ultrasons focalisés peuvent être utilisé pour d'autres pathologies cérébrales que les cancers comme la maladie d'Alzheimer. Cette revue, recense les études d'ouverture de la BHE par ultrasons focalisés pour l'administration d'immunothérapie (156). Des essais cliniques de l'ouverture de la BHE par ultrasons focalisés combinés à l'injection de microbulles sont en cours et ont jusqu'à présent démontré l'innocuité de cette procédure. Cependant, si des ultrasons focalisés plus agressifs étaient nécessaires pour obtenir la modulation immunitaire souhaitée, la sécurité devra être soigneusement examinée (156). Il faut imaginer la lourdeur de la mise en place de ces traitements pour des patients.

1.2.4 Ajout de charges positives sur les biothérapeutiques

Les molécules polycationiques peuvent se lier à la membrane plasmique et conduire à un processus d'endocytose appelé AMT. Les histones ou agglutinines de germe de blé utilisent ce mécanisme. L'ajout de charges positives aux protéines permet leur pénétration cérébrale (42). Les IgG ou fragments sont cationisés, ce qui élève leur point isoélectrique au-dessus de 7 et entraîne une exposition cérébrale plus élevée que la protéine native. L'augmentation de l'exposition cérébrale est modeste, d'un facteur 2 à 3 pour une IgG bovine cationisée par rapport à l'IgG bovine native (157). L'amyloïde A β a également été utilisée pour les applications d'imagerie. Il a été démontré que les anti-A β (Fab)₂ modifiés par des polyamines marquent les dépôts amyloïdes dans le cortex et l'hippocampe du cerveau de souris transgéniques Alzheimer après une injection intraveineuse plus efficacement que leurs homologues non chargés (158). Les VHH anti-A β chargés ont été utilisés pour démontrer l'imagerie *in vivo* des dépôts amyloïdes en utilisant la microscopie à deux photons (159). Il y a des mises en garde à ces approches de transcytose adsorptive. La cationisation pourrait altérer l'activité biologique de l'anticorps ou changer sa conformation. Le mode de pénétration par interaction avec des membranes chargées négativement conduira à une distribution aléatoire dans tous les organes et tissus et pourrait entraîner une toxicité et une immunogénicité (37).

1.2.5 Transcytose d'anticorps via les RMT

Nous allons détailler un mode de pénétration cérébrale un peu plus ciblé qui utilise la transcytose d'anticorps via des récepteurs particuliers : les RMT. En 2002, Pardridge, dans une revue consacrée à l'atteinte du cerveau par des biothérapeutiques via la circulation sanguine périphérique écrit : « Il est largement admis que le transport à travers la BHE de grosses molécules thérapeutiques n'est pas possible, et les programmes de développement de ces grandes molécules sont fréquemment interrompus en faveur de la découverte de petites molécules thérapeutiques. Cependant, les protéines recombinantes, les médicaments antisens et les médicaments génétiques non viraux peuvent être délivrés au cerveau avec la technologie de ciblage des médicaments pour le cerveau » (160). Effectivement, le développement de l'immunothérapie et la nécessité d'atteindre le cerveau dans des pathologies neurologiques ou dans le cas de cancer primaires ou métastasés a fait progresser la voie d'administration de biothérapeutiques à travers la BHE. Cette stratégie permet de faire passer des biothérapeutiques en utilisant des récepteurs connus pour faire de la transcytose en conditions physiologiques. Cette propriété est utilisée et mimée pour introduire des biothérapeutiques dans le cerveau en passant la BHE. Contrairement aux voies d'administration dans le cerveau vues précédemment, qui sont extrêmement invasives et très peu envisageables pour des traitements chroniques, cette stratégie permet une administration par voie systémique bien plus pratique. Actuellement sont en clinique des anticorps dirigés contre les RMT TFRC et le

récepteur à l'insuline (InsR). Nous allons détailler ci-dessous ces deux cibles ainsi que certaines moins avancées dans leur développement.

1.2.5.1 Récepteur de la transferrine

La cible la mieux documentée pour l'administration de médicaments au cerveau via un RMT est le récepteur de la transferrine. De nombreux articles de revue, l'identifient comme fortement exprimé et enrichi dans les microcapillaires cérébraux (161),(162). Par ailleurs Zuchero et al ont démontré que, contrairement à LRP1 et INSR, TFRC a une expression d'ARNm plus élevée dans les cellules endothéliales cérébrales comparé aux cellules endothéliales du foie et des poumons (163). Dès 1984, Jefferies (164) avait remarqué que des anticorps anti-TFRC marquaient spécifiquement les capillaires cérébraux et avait émis l'hypothèse que ce récepteur permettait les transports de fer dans le tissu cérébral. En 1991, Friden (165) et Pardridge (166) montrent que des anticorps contre le TFRC sont capables d'emmener des principes actifs qui leur sont conjugués ou fusionnés dans le cerveau. Ce sera le début d'une longue série de recherches dont nous citerons quelques jalons ci-dessous.

Pardridge a appliqué cette stratégie qu'il appelle « cheval de Troie » (167) à différents peptides ou protéines biothérapeutiques : le peptide intestinal vasoactif (VIP) pour l'amélioration du flux sanguin cérébral (168), le facteur neurotrophique BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) pour la neuroprotection dans l'ischémie globale ou cérébrale (169), le facteur de croissance épidermique (EGFR) pour la détection précoce du cancer du cerveau, des analogues A β pour la détection précoce de l'amyloïde cérébrale de la maladie d'Alzheimer et des peptides pour l'imagerie *in vivo* de l'expression des gènes cérébraux (170,171). Dans tous ces cas, la protéine seule, sans « cheval de Troie » n'était pas pharmacologiquement active car retrouvée en quantité trop faible dans le cerveau (160). En fonction du principe actif à faire pénétrer dans le cerveau, différents formats ont été utilisés. Pour les peptides et les protéines, trois grandes façons de les lier à l'anticorps anti-TFRC ou à un de ses fragments ont été utilisées, soit la fusion, soit la conjugaison, soit encore plus rarement une liaison non covalente.

Un bon exemple de fusion est celle de l'anti-TFRC humain avec l'enzyme lysosomale iduronate sulfatase (172) qui a été récemment approuvée au Japon pour le traitement de la mucopolysaccharidose (IZCARGO®) (147). Elle est schématisée en Figure 25, 1.

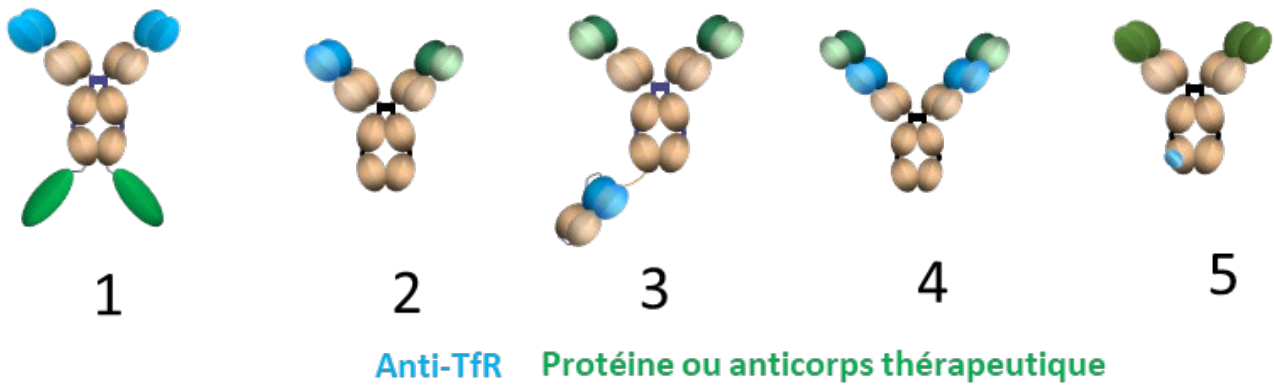


Figure 25: Plusieurs constructions de protéines ou anticorps thérapeutiques avec un anticorps anti-TFRC

Deux autres modes de liaison en dehors de la fusion ont été utilisés pour les peptides ou plus rarement les protéines. L'anticorps anti-TFRC et le peptide peuvent être liés via une interaction non covalente biotine/streptavidine. Par exemple, en 1993, Bickel et al ont lié le peptide VIP biotinylé à l'anticorps anti-TFRC de rat OX26 conjugué de manière covalente à l'avidine. La perfusion systémique des rats avec VIP-OX26 a entraîné une augmentation du flux sanguin cérébral de 65% comparé au peptide VIP nu (168). Une troisième façon est la conjugaison chimique du peptide sur une ou plusieurs chaînes de l'anticorps anti-TFRC. Ainsi Friden décrit la conjugaison de NGF (Nerve Growth Factor) sur la chaîne lourde de cet anticorps. Ils ont mis en évidence une augmentation du niveau de NGF dans le cerveau de rats injectés avec OX-26-NGF dans la veine caudale (173) (169). En 2017 Webster et al ont décrit un biothérapeutique efficace contre les douleurs neuropathiques. Il s'agit de l'antagoniste du récepteur de l'interleukine 1 (IL1RA) fusionné à l'anticorps anti-transferrine récepteur 8D3. Ils ont généré des variants du 8D3 avec des affinités réduites dans le but d'augmenter l'exposition cérébrale (174).

Pour les anticorps thérapeutiques, plusieurs types de formats bispécifiques ont été utilisés (Figure 25, 2-5), nous en illustrerons quelques exemples fondateurs.

En 2011, Yu et al présentent leurs travaux sur un anticorps monovalent bispécifique TFRC/ Beta-site Amyloid precursor protein Cleaving Enzyme (BACE)1 (Figure 25 2) comme « cheval de Troie » pour inhiber l'enzyme BACE1 responsable de la formation de la protéine A β 1-42 qui s'agrège dans la maladie d'Alzheimer. Ils montrent dans un modèle de souris sauvage que la diminution de l'affinité du TFRC est corrélée à une augmentation de l'exposition cérébrale de l'anticorps bispécifique (175). Pour une affinité 10 fois inférieure, l'exposition cérébrale est 3 fois plus importante. Ils montrent dans ce même modèle de souris, une diminution de 80% de la quantité d'A β 1-40 dans le cerveau (176). En 2014 Yu et al, se servent de leurs résultats sur des anticorps bispécifiques dirigés contre le TFRC de souris pour franchir la BHE et contre BACE1 comme cible thérapeutique dont l'efficacité a été montré chez la souris (175). Les souris montraient des taux d'A β diminués (176). Ils ont ensuite

généralisé deux variants bispécifiques humains, en utilisant la technologie « knob into holes ». Cette méthode favorise l'hétérodimérisation de deux demi-anticorps différents en un anticorps bispécifique immunoglobuline G (IgG). Ils ont ainsi généré des anticorps bispécifiques anti-TFRC/BACE1, humain et primate pour le TFRC. Ils l'ont d'abord testé dans des souris Knock-In (KI) pour le TFRC humain. Puis, ils l'ont utilisé chez le primate et ont montré une réduction de l'A β dans le LCR et dans le tissu cérébral (177).

Le format de la Figure 25-3 a été utilisé par Niewoehner et al en 2014. Ils démontrent la différence d'exposition cérébrale en fonction de la valence d'un anticorps anti-TFRC. La construction monovalente sFab sort des capillaires, pénètre dans le parenchyme et engage efficacement la cible tandis que les constructions bivalentes dFab restent dans les cellules endothéliales et sont colocalisées avec des marqueurs lysosomaux, suggérant un tri dans une voie de dégradation. Le mécanisme par lequel la construction monovalente sFab échappe au tri lysosomal et est libérée du côté abluminal, n'est pas connu. Il se pourrait que la construction sFab s'amarre simplement en tant que ligand supplémentaire sur le TFRC adjacent à la transferrine sans changer la façon dont le complexe récepteur/ligand est reconnu par la machinerie de tri intracellulaire. Ainsi, les constructions monovalentes sFab pourraient utiliser le mécanisme de transcytose endogène pour traverser les cellules endothéliales cérébrales. En revanche, les constructions bivalentes dFab induiraient une dimérisation du TFRC, suivie d'une internalisation et d'un tri vers la voie lysosomale. Cela pourrait potentiellement être évité en utilisant un variant bivalent dFab de faible affinité pour réduire la dimérisation de TFRC à la surface de la cellule. Ils démontrent également qu'une exposition *in vivo* prolongée avec un bivalent peut entraîner une régulation négative du TFRC à la surface cellulaire (178). L'avidité de l'anticorps pour sa cible doit être prise en compte pour améliorer l'exposition cérébrale. L'entreprise Roche utilise cette technologie sur le gantenerumab (anticorps IgG1 entièrement humain qui a une affinité subnanomolaire pour un épitope conformationnel des fibrilles A β) pour améliorer son exposition cérébrale. Ils sont actuellement en phase 1 chez l'homme avec RO7126209 depuis mars 2021 sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer à des stades léger à modéré. Les premiers résultats de phase 1 ont été communiqués en juillet 2021 au congrès AAIC. Ils ont montré une augmentation de huit fois dans le LCR du TFRC- gantenerumab comparé au gantenerumab seul. L'utilisation du TFRC comme « cheval de Troie » pour faire passer les IgG dans le LCR chez l'homme est validée. Le critère d'évaluation principal sera l'innocuité et le critère secondaire sera la modification de l'amyloïde cérébrale. L'essai se poursuivra jusqu'en automne 2024 (179).

Des anticorps bispécifiques de format bivalent bispécifiques ont été décrits par Karaoglou (180) et Do (181) (Figure 25-4) et sont appliqués à plusieurs cibles thérapeutiques différentes : RGMa pour la sclérose multiple, TNF pour la maladie de Parkinson, A β pour la maladie d'Alzheimer et HER2

pour les tumeurs cérébrales (180). De plus, l'augmentation cérébrale a pu être corrélée avec un engagement sur la cible par la visualisation de l'anticorps sur les plaques amyloïdes dans le parenchyme cérébral et par une activité supérieure à celle d'un anticorps anti-A β nu dans un modèle chronique de la maladie d'Alzheimer (181).

Récemment, un nouveau format appelé TV (Transport Vehicule) a été décrit par Kariolis (Figure 25-5). Dans ce cas, c'est le domaine Fc de l'anticorps qui a été modifié pour reconnaître le récepteur de la transferrine. Ils ont injecté des singes et des souris iv et montrent une bonne exposition cérébrale de ATV-BACE1 (antibody Transport Vehicule). Le ratio cerveau/plasma est multiplié par 20 comparé à l'anticorps contrôle chez le primate (182).

1.2.5.2 Récepteur de l'Insuline

En dehors du récepteur de la transferrine, d'autres RMT ont été décrits comme potentiels « chevaux de Troie » comme le récepteur de l'insuline. C'est Pardridge et al en 1985 qui le mettent en évidence sur la BHE en mettant au point une méthode d'isolement des microvaisseaux humains. Ils ont montré un transport de l'insuline radiomarquée à travers la BHE et mis en évidence que son récepteur a des caractéristiques fonctionnelles pour faire du transport de peptides à travers la BHE (183). En 1994, Fukuta et al décrivent une expérience d'injections de souris dans la veine de la queue avec la protéine HRP seule ou fusionnée à un fragment d'insuline. L'activité HRP est ensuite mesurée dans les homogénats de cerveau. L'activité de l'HRP est 8 fois plus importante quand elle est fusionnée à un fragment d'insuline (184). Avec la même intention, Pardridge et al montrent que l'utilisation de l'insuline comme « cheval de Troie » conduirait à une hypoglycémie donc ils étudient la capacité d'anticorps monoclonaux murins (MAb83-7 et MAb83-14) dirigés contre le récepteur de l'insuline humaine à faire de la transcytose à travers la BHE. Ces anticorps se lient à différents épitopes de la sous-unité α du récepteur de l'insuline humaine sur des capillaires cérébraux humains isolés, des sections congelées du cerveau de primates et dans une étude pharmacocinétique *in vivo* chez des singes rhésus anesthésiés. Les deux anticorps ont fortement marqué les cellules endothéliales capillaires dans l'analyse immunocytochimique de sections congelées du cerveau du singe rhésus. Les deux anticorps monoclonaux, marqués à l'iode¹²⁵, se sont liés aux microcapillaires cérébraux humain, avec une liaison et une endocytose de MAb83-14 environ 10 fois supérieure à celle de MAb83-7. La liaison de MAb83-14 au récepteur de l'insuline humaine est accompagnée d'un transport augmenté de cet anticorps à travers la BHE *in vivo* chez deux singes rhésus anesthésiés. $3,8 \pm 0,4\%$ de la dose injectée a atteint 100 g de cerveau 3 heures après une seule injection intraveineuse. En revanche, il n'y avait pas d'absorption cérébrale des anticorps contrôles (isotype souris IgG2a). Cela démontre la capacité d'un anticorps monoclonal à faire de la transcytose à travers la BHE *in vivo* chez le primate (185). En 1997, Wu et al décrivent une étude dans laquelle ils ont injecté à des singes en iv, un peptide A β radiomarqué conjugué à un anticorps

anti récepteur à l'insuline 8314SA. Trois heures après l'injection, ils ont noté un marquage du cerveau contrairement aux singes injectés avec l'A β radiomarquée seule. Cette technique peut être développée pour l'imagerie médicale ou pour l'administration de médicaments dans le cerveau (186,187). En 2007, Boado décrit les caractéristiques de l'anticorps HIRMAB humanisé. Un variant a été sélectionné pour son affinité de liaison au domaine extracellulaire du récepteur à l'insuline et à sa capacité à se lier à des microcapillaires singes et humains isolés. Les résultats de transcytose *in vivo* chez le singe de l'anticorps HIRMAB humanisé montrent un passage de 1% de la dose injectée en intraveineux pour 100g de cerveau de singe. Cet anticorps HIRMAB humanisé peut servir de « cheval de Troie » pour franchir la BHE (Figure 26) (188).

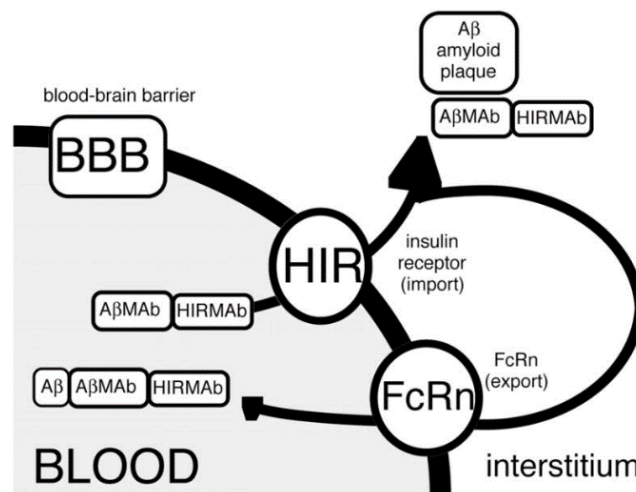


Figure 26 :Modèle de circulation d'anticorps thérapeutiques anti-A β entre le sang et le cerveau (189).

En 2011, Ohshima-Hosoyama et Simmons, ont décrit leurs travaux avec HIRMAB fusionné au GDNF dans un modèle 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-TetrahydroPyridine (MPTP) chez le singe. Sept jours après l'injection MPTP, les singes ont été injectés deux fois par semaine pendant trois mois avec l'anticorps HIRMAB-GDNF à différentes doses selon leur groupe (1 ou 5 mg/kg). Le GDNF a des propriétés neuroprotectrices. Cette étude n'a pas montré d'effet neuroprotecteur du GDNF sur le comportement des singes évalués. Ce protocole a mis en évidence des effets secondaires graves avec une atteinte du pancréas sur quatre des sept animaux traités et une myocardite. Le GDNF est fortement exprimé par les nerfs intra-pancréatiques et le récepteur RET au GDNF est très fortement exprimé par les cellules tumorales dans les cancers du pancréas. Ces résultats sont à prendre en compte pour l'utilisation de ce récepteur comme « cheval de Troie » car l'injection intracrânienne de GDNF n'entraîne pas ces effets indésirables (190). La revue de Pardridge répertorie les différentes thérapies d'enzymes de remplacement qui sont évaluées par fusion de l'enzyme avec le récepteur de l'insuline (191). Dernièrement, Boado et al ont démontré que différentes enzymes lysosomales peuvent être fusionnées aux chaînes lourdes ou légères de HIRMAB en gardant leur fonctionnalité. C'est ce qui permettrait une thérapie de remplacement enzymatique par voie intraveineuse chez

des enfants atteints de troubles du métabolisme lysosomal (192). Une des constructions où le HIRMAB est fusionné à l'iduronidase humaine (Hirmab-IUDA , AGT-181 (193)) est actuellement en développement en phase 2 dans le traitement de la Mucopolysaccharidose.

1.2.5.3 Autres récepteurs

Stanimirovic et al ont décrit des VHH reconnaissant le récepteur de l'Insuline Growth Factor (IGFR). Des VHH reconnaissant la sous-unité α de l'IGFR1 sont cités et décrit avec une exposition cérébrale augmentée de 10 fois quand ils sont montés sur un fragment Fc par comparaison à un anticorps contrôle (194). Ce résultat est controversé puisque Sade et al se servent des anticorps anti-IGF1R comme contrôle négatif de transcytose. Dans leurs expériences, ils sont recyclés à la membrane. Ils expliquent ce défaut de transcytose par l'absence de LRP1 dans les cellules hCMEC/D3 utilisées (195). D'autres travaux ont mis en évidence des anticorps qui reconnaissent le récepteur au Low-Density Lipoprotein (LDL). En 2017, Molino et al ont évalué la capacité d'un vecteur peptidique à franchir la BHE quand il est associé au fragment Fc d'un anticorps. Ils ont montré que le LDLR est plus exprimé à la membrane apicale des cellules endothéliales. Ils ont montré, *in vivo* chez la souris, après une injection intraveineuse, que l'exposition cérébrale du fragment Fc vectorisé avec un peptide spécifique du LDLR était augmentée de 2 à 3 fois comparée à une souche de souris transgéniques ne possédant pas le LDLR. L'analyse du trafic intracellulaire a montré que le fragment Fc vectorisé est colocalisé avec un marquage EEA de l'endosome et n'est pas colocalisé dans le lysosome (196). D'autres récepteurs ont été décrits comme RMT permettant de franchir la BHE. Il s'agit du récepteur LRP1 (18) (197), ou du récepteur de la leptine (198). Toutefois, dans ces deux cas, ce ne sont pas des anticorps qui ont été utilisés pour franchir la BHE, mais des peptides. Le principal problème des RMT décrits précédemment est qu'ils sont présents de manière ubiquitaire. Ils ne sont pas spécifiques du cerveau.

Je vais maintenant détailler les stratégies qui ont été utilisées pour tenter de trouver de nouveaux récepteurs qui médient la transcytose à travers la BHE.

1.3 Stratégies utilisées pour découvrir de nouveaux mécanismes pour franchir la BHE

En 2007 plusieurs spécialistes de la BHE se sont réunis sur le thème des stratégies pour faire progresser la recherche dans le domaine des barrières cérébrales. Le compte rendu a été publié (199). Des recommandations y sont faites pour trouver des nouveaux transporteurs pour traverser la BHE en utilisant des études génomiques et protéomiques. Ils préconisent de développer des centres avec des biologistes spécialistes du transport à travers les membranes, pharmacologues, des ingénieurs et des spécialistes de l'imagerie. Banks, dans une revue publiée en 2016, préconise de continuer l'exploration de transporteurs inconnus car la plupart des transporteurs de la BHE ne sont pas encore découverts. Il souligne la difficulté d'élaborer une stratégie universelle (200).

La nature omniprésente des cibles RMT cérébrales actuelles a motivé de nombreux laboratoires universitaires et industriels à rechercher des systèmes RMT alternatifs. Un système RMT idéal pouvant être utilisé comme transporteur thérapeutique cérébral aurait trois caractéristiques principales. La première serait une expression sélective au niveau de la BHE avec une expression nulle ou relativement faible dans le système vasculaire périphérique ou dans d'autres tissus (163). La deuxième caractéristique serait une abondance élevée de RMT au niveau de la BHE aidant à conduire à un transport efficace à travers les cellules endothéliales. La dernière caractéristique qui intègre des aspects des deux premiers, est que le système RMT se traduirait par un transport efficace de la charge utile (%ID/g) à travers la BHE (201). Un turnover rapide devrait être un avantage aussi.

Plusieurs stratégies ont été décrites pour découvrir de nouveaux mécanismes permettant de franchir la BHE. La première approche est une identification différentielle de nouveaux récepteurs RMT à partir de bases de données générées par profilage moléculaire de la BHE. L'utilisation de ces données protéomique, génomique ou transcriptomique (« omique ») combinées à une caractérisation fonctionnelle permet la sélection de nouvelles cibles.

1.3.1 Omique

Plusieurs études omiques ont permis d'identifier des cibles enrichies sur les microcapillaires cérébraux. Celles qui sont suffisamment exprimées peuvent ensuite être étudiées.

1.3.1.1 Génomique et transcriptomique

Au cours du temps, les études de génomiques et transcriptomiques ont évolué avec la technologie. Il y a d'abord eu des études dans les années 90 de protection de la RNase pour identifier des ARNm cibles. La quantité de matériel concernant la microvascularisation ne représente qu'un 1000^{ème} du volume d'un cerveau total. Si un récepteur n'est pas suffisamment exprimé, il est impossible de le détecter car les techniques d'amplification ne sont pas assez sensibles. Au début des années 2000, les chercheurs ont utilisé l'hybridation par suppression soustractive (SSH) et le séquençage SAGE (serial analysis of gene expression). La SSH permet d'augmenter la précision des analyses et est adaptée à l'analyse de gènes peu représentés. De plus, elle ne demande pas de grande capacité de séquençage car seules les ADNc avec une expression différentielle sont analysés. C'est pour palier ce manque que les techniques d'hybridations suppressives de soustraction ont été utilisées (202). A partir de 2008, la Polymerase Chain Reaction quantitative (qPCR) a été utilisée, puis les puces d'expression. Après 2015, les capacités d'analyse de matériel amplifié à partir de Reverse Transcription RT-qPCR ont été améliorées par le développement du Next Generation Sequencing (NGS) dont le RNA-seq. Le RNA-seq sur cellule unique a permis d'améliorer la spécificité du matériel de départ. En effet, l'isolement des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales est primordiale car elles sont étroitement liées à d'autres types cellulaires comme les astrocytes et les

péricytes. Le RNA-seq sur cellules uniques permet de s'affranchir de ce biais. L'utilisation des souris transgéniques permet d'étiqueter spécifiquement les cellules endothéliales. Cela facilite l'isolement de ces cellules spécifiques de la BHE. Ces études sont à relativiser puisque 21% des gènes corticaux ont une expression différentielle en fonction de l'espèce (203).

Nous avons analysé toutes ces études et les présentons ci-dessous en les regroupant en fonction de leurs thèmes et objectifs : Etude de transporteurs, identification de gènes enrichis sur les microvaisseaux, génération de bases de données d'expression et d'atlas moléculaires exhaustifs, compréhension des mécanismes de formation de la BHE au cours de l'embryogénèse, étude de l'influence de pathologies ou de traitement sur l'expression génique et enfin la compréhension du mode d'entrée dans le cerveau de certains virus, bactéries ou autres pathogènes.

Les études de transporteurs comme les ABC ou les transporteurs SLC, donnent des profils d'expression en fonction des tissus et des espèces. Dès 1993, l'étude de l'ARNm du transporteur d'acides aminés cationiques sodium indépendant (système y) a été réalisée par Stoll et al. Ils ont détecté un enrichissement de 38 fois de l'ARNm de ce système y sur des préparations de micro-capillaires cérébraux et de plexus choroïdes de rats comparées à un homogénat de cerveau (204). En 1999, Boado et al ont créé une librairie d'ARNm à partir d'ADNc de cerveaux de bovins. Ils ont isolé l'ARNm du transporteur d'acides aminés Large neutral Amino acid Transporter (LAT1) d'une librairie de phages λ gt11 d'ADNc bovin. L'homologie de séquence de LAT1 entre le bovin et le rat est de 89%. Après avoir vérifié la fonctionnalité de LAT1 par des tests de transport du tryptophane dans les ovocytes de grenouilles transfectées avec cet ADNc, ils ont fait une étude de Northern Blot. Ils ont ainsi évalué l'abondance de la séquence de LAT parmi la librairie. Ils ont montré que l'ARNm de LAT1 était enrichi 100 fois sur les micro-capillaires cérébraux bovins comparés à la lignée de gliome C6 de rat ou au cerveau total de rat. L'ARNm de LAT1 n'a pas été détecté dans les poumons, cœur, foie et reins de rat (205). En 2008 Dauchy et al font l'analyse par RT-qPCR et western blot de résections d'épilepsie ou de gliomes de sept patients. Ils isolent les micro-vaisseaux et comparent l'expression de transporteurs de la BHE entre les micro-capillaires et le cerveau total (206). Cette étude est complétée en 2011 par la même équipe avec cinq nouveaux échantillons. Les échantillons sont à nouveau analysés mais cette fois par RT-qPCR et Liquid-Chromatography-tandem Mass-Spectrometry (LC-MS). Ils ont montré un enrichissement de l'ARNm de LAT1, OCT3, OATP2B1, MCT1, OCTN2 et MATE1 dans les microvaisseaux cérébraux (207). En 2009, Warren et al ont fait une étude transcriptomique par qPCR des transporteurs de cellules endothéliales micro-capillaires de cerveaux humains (résection de patients épileptiques), rats, souris, porcs et bovins. Cette étude met en évidence des membres des transporteurs ABC qui participent à l'efflux de la BHE. Ils ont observé des différences inter espèces (208). Geier et al ont utilisé des échantillons de cortex humain provenant de quatre donneurs décédés pour préparer des fractions enrichies en

microcapillaires cérébraux afin d'identifier des transporteurs humains de la BHE. Ils ont suivi l'expression de 359 transporteurs SLC et 49 transporteurs ABC en comparant les microvaisseaux au cortex, puis ils ont fait une analyse comparative de l'expression par rapport au rein et au foie (échantillons commerciaux de donneurs différents). Ils ont identifié des transporteurs connus comme SLC7A5, SLCO2B1, ABCB1 et ABCG2 et des nouveaux, jusqu'alors inconnus au niveau de la BHE humaine comme SLC26s, SLC19A3, SLC6A13 et SLC47A2 (209). Suhy et al ont effectué une analyse RNAseq du cortex et des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales obtenues de l'autopsie de deux donneurs humains. Les mêmes échantillons d'ARN avaient déjà été analysés concernant l'expression du transporteur à l'aide de la qRT-PCR 4 ans auparavant (209). L'étude RNAseq confirme un certain nombre de transporteurs hautement enrichis dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales (par exemple : ABCB1, ABCG2, SLCO2B1 et SLC47A1), mais détecte également de nouveaux transporteurs non identifiés. Les transporteurs solidement enrichis, détectables à la fois par RNAseq et qRT-PCR et soutenus par des études antérieures, comprennent SLC26A1 (209), SLC7A5 (LAT1) (210), SLC1A7 (211), SLC22A5, (207) SLC25A48 (212), ABCG2, ABCC4 et ABCB1. Cependant, des transporteurs enrichis dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, nouvellement identifiés par RNAseq, n'avaient pas été détectés par qRT-PCR. Ceux dont les rapports cellules endothéliales microvasculaires cérébrales/cortex entier sont supérieurs à 3 comprennent : SLC38A8, SLC13A4, SLC45A2, SLC7A5P1, SLC38A4, SLC22A14, SLC7A5P2 et SLC30A10. Le biais de cette étude est le peu d'échantillons analysés, issus seulement deux donneurs (213). S'agissant d'une étude chez l'homme ce biais est important car la variabilité inter individu est beaucoup plus importante que dans une même souche de souris (214).

Plusieurs études ont pour objectif l'identification de gènes enrichis sur les microvaisseaux ou cellules endothéliales, soit par rapport au parenchyme cérébral, ou à d'autres organes ou cellules périphériques. En 2001, Li et al (161) ont utilisé la SSH pour sélectionner des gènes enrichis sur la BHE par rapport au cerveau entier. Cette technologie permet une amplification par PCR uniquement de fragments d'ADNc qui diffèrent entre un contrôle (guide) et un transcriptome expérimental (test) (215). En effet, les ADNc communs entre les groupes guide et test sont présents sous forme double brins et sont éliminés. La banque initiale a été préparée à partir d'ADNc dérivés d'ARNm de capillaires de cerveau de rat après soustraction de l'ADNc issu d'ARNm de foie et de rein de rat. Le criblage est ensuite réalisé par Northern Blot. L'étude de 5 % de l'ADNc des capillaires sélectionnés par hybridation soustractive a permis d'identifier 50 produits géniques et plus de 80 % d'entre eux sont exprimés sélectivement au niveau de la BHE. Ils ont retrouvé des gènes connus tels que : MBP, TFRC, MHC et des gènes avec de nouvelles séquences dont la fonction est inconnue (161). En 2002 Shusta et al ont décrit leurs résultats obtenus avec la méthode SSH pour analyser des

parties de génome d'intérêt. Ici, la technique SSH a été utilisée sur les microvaisseaux du cerveau humain (issus de résections de neurochirurgies) pour identifier les gènes enrichis sur la BHE par rapport au foie et aux reins. Dans cette étude, Shusta et al ont étudié les 71 premiers clones exprimés de façon différentielle dans la microvascularisation cérébrale. Vingt d'entre eux étaient des gènes codant pour des protéines ayant une fonction connue qui étaient impliqués dans l'angiogenèse, la neurogenèse, le transport moléculaire et le maintien des jonctions serrées endothéliales ou du cytosquelette. Dix-huit gènes codaient pour des protéines d'une fonction inconnue, dont cinq gènes contenant des séquences d'ADN satellite. Il s'agit du premier groupement de gènes enrichis dans la microvascularisation cérébrale humaine (202). Enerson et al rapportent pour la première fois en 2006 un profil d'expression génique complet des microvaisseaux cérébraux de rat en utilisant une analyse SAGE. Les analyses SAGE demandent une grande capacité de séquençage et ont une sensibilité de 1/10000e par rapport à l'organe cible. C'est-à-dire qu'on ne pourra pas détecter des gènes dont l'abondance est inférieure à 1 pour 10 000 (202). Pour identifier les transcrits enrichis dans les microvaisseaux, ils ont comparé les catalogues SAGE des microvaisseaux cérébraux et de cortex de rats qu'ils ont générés et un catalogue SAGE de l'hippocampe généré par l'équipe de Datson et al en 2001. Les résultats d'Enerson indiquent que 31 % des gènes enrichis en microvaisseaux correspondent à des gènes connus, tandis que 61 % correspondent à des séquences transcrites (EST) dans la base de données Unigene. Ils ont identifié 864 gènes, dont plusieurs sont déjà connus pour leur expression abondante au niveau de la BHE, comme le TFRC. Le tri des gènes selon leur fonction a révélé des groupes qui codent pour les transporteurs (11 %), les récepteurs (5 %), les protéines impliquées dans le trafic des vésicules (4 %), les protéines structurelles (10 %) et les composants des voies de transduction du signal (17 %). Leur analyse montre pour la première fois que le transporteur de vitamines sodium-dépendant (SMVT, NM_130746), un transporteur spécifique du pantothénate, de la biotine et du lipoate, est enrichi dans les microvaisseaux cérébraux. Ils identifient également le symporteur sodium/iodure, Slc5a5 (NIS). Des protéines structurelles et les protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire sont fortement représentées dans les microvaisseaux cérébraux. Les gènes des protéines qui forment la membrane basale qui entoure les cellules endothéliales et les péricytes tel que la laminine et la fibronectine et les gènes du cytosquelette, comme la vimentine, la tubuline, et le muscle lisse α -actine sont très représentés dans l'ensemble de données (162). En 2010, Daneman et al ont analysé le génome de cellules endothéliales du cortex, du foie et du rein des souris transgéniques Tie2 avec des puces Affymetrix Genome Mouse 430 2.0. Ils ont notamment identifié 50 gènes surexprimés à la BHE comparé au parenchyme, parmi lesquels les gènes des jonctions serrées et de transporteurs transmembranaires qui sont Itm2a, Apccdd1, Tmeff1, Tmem23, Ly75, Ly6c, cd34, Pcdh19 et Extl3 (18). Dans une autre étude RNAseq sur des préparations de microvaisseaux cérébraux isolées de tissus congelés humains (3 individus différents) et de souris par

microdissection par capture laser, Song et al améliorent les bases de données sur les cellules endothéliales et les péricytes. L'intérêt étant que les échantillons de chaque espèce ont été préparés dans les mêmes conditions. Les données transcriptomiques ont permis d'identifier des gènes enrichis jusqu'alors inconnus. Par exemple, des transporteurs présumés enrichis dans les péricytes humains qui peuvent être impliqués pour le passage de la BHE humaine, tels que le cotransporteur de chlorure de potassium SLC12A7 et le transporteur de bétaïne SLC6A12. Ils ont mis en évidence les différences dans l'expression des gènes associés aux microvaisseaux entre les espèces souris et humains qui peuvent être pertinentes pour la régulation de la BHE et l'administration de médicaments. En comparant les données des microvaisseaux des microdissections par capture laser humains avec les ensembles de données transcriptomiques des cellules microvasculaires cérébrales humaines déjà existantes, ils ont identifié de nouveaux marqueurs des péricytes du cerveau humain (214).

Au fil des années et avec l'avènement des technologies, les études évoluent de plus en plus vers la génération de bases de données d'expression et d'atlas moléculaires exhaustifs. En 2014, Zhang et al publient une étude de RNAseq à partir de différents types cellulaires de cerveaux de souris adultes pour mieux comprendre leurs fonctions et leurs interactions. Les différents types cellulaires (astrocytes, neurones, oligodendrocytes, cellules endothéliales, péricytes) sont isolés par Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) ou par immunopanning à partir de différentes souris transgéniques (souris Tie2-EGFP pour isoler les cellules endothéliales). Ils décrivent les 20 récepteurs transmembranaires les plus enrichis dans les cellules endothéliales comme : *tfr*, *Pglyrp1*, *H2-D2*, *Eltf1*, *Kdr*, *Eng*, *Egalité1*, *Cav1*, *Flt1*, *Fcgrt*, *Sema7a*, *Dsl*, *Acvr11*, *Tek*, *Gpr116*, *Fzd6*, *Ptprb*, *Aplnr*, *Ptprg*, *Plxnd1*. Ils décrivent des gènes marqueurs du type cellulaire endothéliale : *Cldn5*, *Ly6a*, *Ly6c1*, *Car4*, *Bsg*, *Slc1a4*, *Slc16a1*, *Vwa1*, *Cd34*, *Egfl7*, *Slc35t2*, *Tie1* et des facteurs de transcription : *Erg*, *Foxq1*, *Foxl2*, *Bcl6b*, *Sox7* (216). En 2016, les mêmes scientifiques ont fait une étude RNA-seq sur des échantillons humains issus de résections d'épilepsie ou de gliomes de patients. Par immunopanning, ils ont isolé les différents types cellulaires du cerveau et notamment les cellules endothéliales (Figure 27). L'analyse RNAseq de leurs échantillons est consultable sur <http://www.brainrnaseq.org> (217).

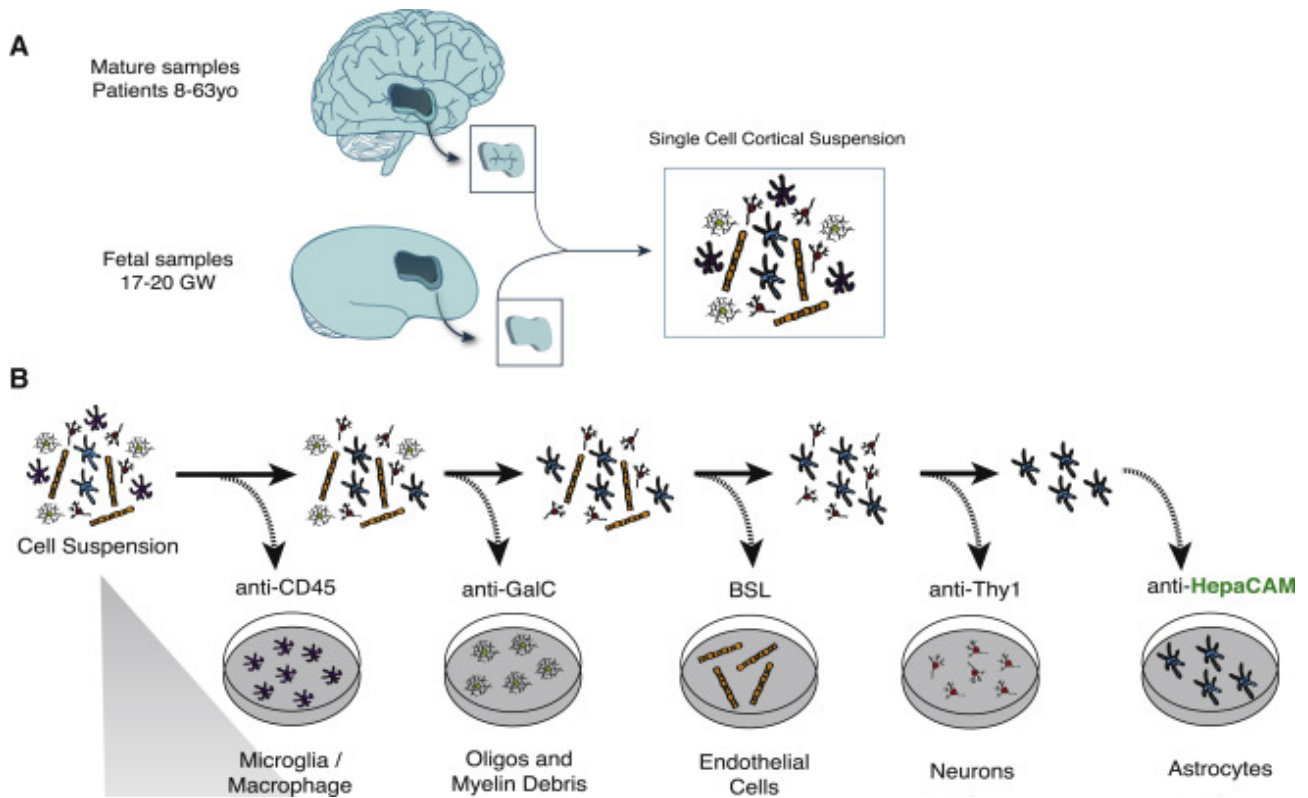


Figure 27 : Isolement et tri de différentes populations cellulaires par immunopanning (217).

Tasic et al ont décrit une analyse RNAseq à partir de microdissection de cortex visuel primaire de souris. Ils identifient 49 types cellulaires différents dans cette région et s'intéressent surtout aux différents types neuronaux (218). Une partie des données des études que nous avons décrites ci-dessus (Figure 27) a fait l'objet d'une méta analyse qui a permis d'identifier des gènes, spécifiques, enrichis par rapport aux autres types cellulaires et en abondance dans les cellules endothéliales comme : *itm2a*, *bsg*, *ifitm1*, *apold1*, *rscg5*. Ils ont exploité les données de Zhang et al en 2015 (216) et 2016 (217), Darmanis et al (219), Zeisel et al (220) en 2015, et Tasic et al en 2016 (218,221). Ces données sont consultables dans une base accessible à tous : BRETIGEA (BRain cEll Type specific Gene Expression Analysis). En 2018, He et al, décrivent un ensemble de données de séquençage de l'ARN (scRNA-seq) issu de cellules uniques et définissent des types et des sous-types de cellules vasculaires associées aux vaisseaux dans le cerveau et les poumons de souris. L'ensemble de données contient 3 436 transcriptomes unicellulaires provenant du cerveau de souris, qui ont formé 15 groupes distincts correspondant à des sous-types de cellules, et 1 504 autres transcriptomes unicellulaires du poumon de souris, qui ont formé 17 groupes de cellules. Leur base de données est facilement consultable :

<http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html>. Ces données constituent un atlas moléculaire complet des types de cellules vasculaires associées aux vaisseaux dans le cerveau et les poumons de la souris (222). Le projet Tabula Muris [Tabula Muris \(czbiohub.org\)](http://czbiohub.org) en 2019

consiste en l'analyse RNAseq de cellules uniques chez la souris adulte de 20 organes différents. Les auteurs se concentrent sur les cellules endothéliales du tissu cardiaque mais ils ont tout de même noté que *Slc2a1* et *Itm2a* sont exprimés exclusivement par les cellules endothéliales vasculaires cérébrales (223). En 2020, Kalucka et al ont fait une étude RNAseq sur cellules uniques sur des cellules endothéliales provenant de 11 organes de souris. Ils ont mis en évidence différents types de cellules endothéliales. Ils ont montré que les cellules endothéliales ont un profil d'expression qui dépend de l'organe d'origine. Leurs résultats sont consultables sur

<https://www.vibcancer.be/software-tools/ec-atlas> (224).

Des études soulignent également une difficulté supplémentaire dans l'analyse de la BHE en raison de la perte rapide du phénotype des cellules primaires ou de lignées en culture. Ainsi Lyck et al ont fait une étude transcriptomique avec des puces Affymetrix genome Mouse 430 2.0 de cellules endothéliales microcapillaires cérébrales de souris pour évaluer le transcriptome des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales *in vivo* comparé au bend5 (lignée de cellules endothéliales de souris immortalisées). Ils ont analysé les transporteurs d'acides aminés, les jonctions serrées, et les transporteurs ABC et SLC. Ils ont mis en évidence les changements induits par la culture dans l'expression des gènes. Ils ont identifié l'expression différentielle de certains transporteurs d'acides aminés par RT-qPCR. Ils ont noté que *4F2hc*, *Lat1*, *Taut*, *Snat3*, *Snat5*, *Xpct*, et *Cat1* sont abondants mais dérégulés en culture. *Snat2* et *Eaat3* sont stables malgré la culture et *y+Lat2*, *xCT*, et *Snat1* sont surexprimés en culture (225). Urich a comparé les profils transcriptomiques de lignées hCMEC/D3 avec des cellules primaires humaines et a montré plusieurs différences d'expression de transporteurs spécifiques de la BHE : Glut1 (SLC2A1), MCT1 (SLC16A1), MCT8 (SLC6A2), TauT (SLC6A6), CAT1 (SLC7A1) et LAT1 (SLC7A5). Dans la famille des transporteurs ABC, l'expression des transporteurs P-gp (ABCB1), MRP4 (ABCC4) et BRCP (ABCG2) diminue en culture. Ils mettent en évidence le besoin d'améliorer les modèles de BHE *in vitro* et l'importance de l'environnement des cellules endothéliales du cerveau (226).

Des études plus ciblées sont réalisées pour comprendre les mécanismes en jeu lors de la formation de la BHE au cours de l'embryogénèse. En 2014, Ben-Zvi et al ont découvert un gène impliqué dans la perméabilité de la BHE. Ils se sont appuyés sur les propriétés fonctionnelles de la BHE pour l'identifier. Ils ont fait des injections de traceurs dans le foie de souris embryonnaire et ont analysé l'étanchéité du réseau capillaire au niveau du cerveau. Ils ont ainsi pu identifier le stade embryonnaire auquel la BHE est intègre. Ils ont analysé le profil d'expression des gènes par puce Affimetrix dans cette fenêtre de temps dans le cerveau et le poumon et ont identifié le gène *mfsd2a* qui étaient 80 fois plus représenté dans le cerveau que dans le poumon. Ils ont ensuite vérifié l'expression de la protéine par immunohistochimie et ont mis en évidence que la protéine était sélective des cellules endothéliales cérébrales et n'était pas présente dans le plexus choroïde. En

suivant par microscopie électronique l'injection de HRP par voie systémique, ils ont mis en évidence une augmentation du trafic vésiculaire et de la transcytose dans les souris KO pour *mfsd2a*. De plus les souris *PDGFR β* ^{-/-} présentent également une expression nulle de *Mfsd2a* et une perméabilité de la BHE. La régulation de la transcytose semble donc être orchestrée par les péricytes qui influent sur l'expression de *mfsd2a* qui est responsable du trafic vésiculaire dans la transcytose (12). En 2015, Darmanis et al publient une étude RNAseq sur cellules uniques sur des échantillons de cerveaux humains provenant de 8 adultes et 4 embryons (16 à 18 semaines de gestation). Ils ont utilisé deux techniques pour trier les cellules. Soit, ils ont appliqué une approche impartiale qui permet de classer les cellules en 10 groupes en fonction de leur expression génique. Soit, ils ont fait les groupes de cellules en se basant sur les analyses RNAseq précédentes faites chez la souris et en retrouvant les orthologues humains des 50 gènes les plus enrichis dans chaque type cellulaire. Ils ont obtenu 7 groupes de cellules. Même si l'essentiel de leur étude est consacrée aux populations neuronales et à leur hétérogénéité, ils notent que les cellules endothéliales sont celles, avec les cellules microgliales qui expriment le moins de gènes. Cependant, il n'y a pas d'analyses relatives à la BHE (219). Hupe et al ont défini des profils de transcription des cellules endothéliales cérébrales murines à différents stades embryonnaires qui révèlent la nature distincte de l'endothélium cérébral par rapport à d'autres systèmes vasculaires spécifiques d'un organe. Ils ont généré une lignée de souris transgénique mCherryTRAP sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules endothéliales : CreERT2. Ainsi, ils ont séquencé uniquement les ARN du système vasculaire. Il a été montré que la formation de la BHE est déjà initiée à E9,5 (19) mais, leurs données indiquent que la grande majorité des transcrits associés à la BHE commencent à être traduits à E11.5 ou E12.5. Ils ont identifié des gènes enrichis dans le système vasculaire du SNC (*Nkd1*, *Ppard* et *Ttyh2*) qui n'avaient pas été précédemment rapportés comme étant spécifiquement enrichis dans les cellules endothéliales cérébrales Figure 28 (227).

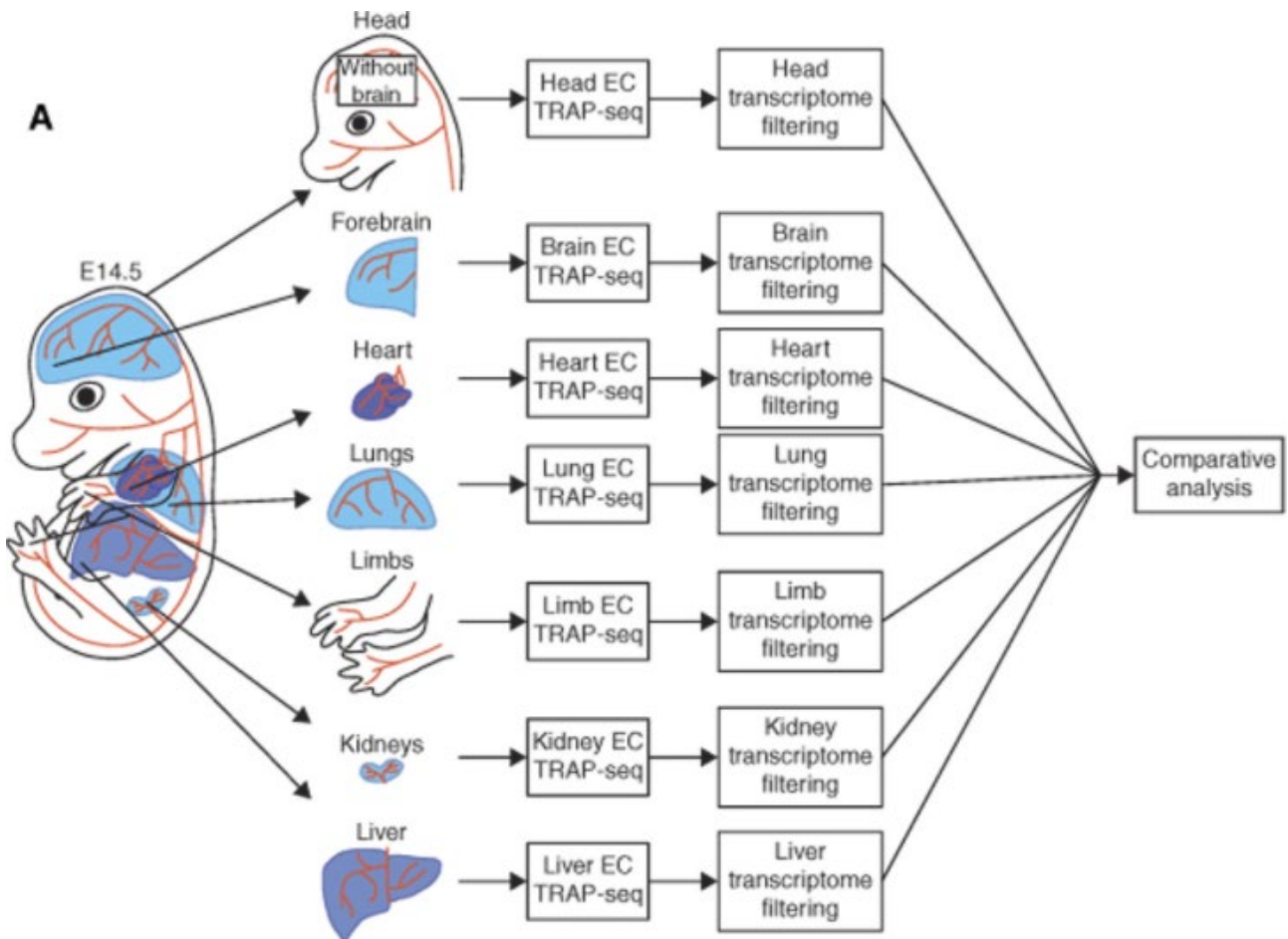


Figure 28 :Analyse transcriptomiques de cellules endothéliales originaires de tissus différents (227).

Des études se sont attachées à comprendre l'influence de pathologies ou de traitement sur l'expression génique. En 2019, Goodall et al ont publié les changements d'expression d'ARNm et de miRNA, de cellules de la BHE, liés au vieillissement. Ils ont comparé les données d'échantillons humains jeunes et âgés avec des échantillons de souris de 3, 12 et 24 mois. Le transcriptome est diminué chez l'homme et ils ont mis en évidence des gènes dont l'expression varie dans le même sens au cours du vieillissement dans les deux espèces : *ARHGAP42*, *DSCAM*, *SNAI2*, *ERLEC1*, *GRIN2C*, *ZNF704*, *ATF6*, *FOXA1*, *FOXP1*, *BECN1*, *TP53* (228). Spaethling et al ont mis en culture des biopsies de 7 patients (3 opérés pour traiter une épilepsie et 4 pour glioblastome de stade 4) et cultivé six grandes classes de cellules cérébrales pendant 3 semaines avant de faire une analyse de 300 cellules en RNA seq. Les patients avaient de 24 à 63 ans et certains prenaient des traitements. Ils ont identifié des ARN enrichis dans chaque classe, trouvé des systèmes susceptibles de contrôler cet enrichissement génétique et prédit des altérations de l'expression des gènes résultant d'interventions thérapeutiques *in vivo* dans plusieurs types de cellules. C'est certainement un des premiers exemples de la médecine de précision dans le but de proposer des traitements personnalisés aux individus. Par exemple dans les cellules endothéliales, ils identifient

une relation entre le traitement par le lévétiracétam (dérivé de la pyrrolidone) ou la dexaméthasone et les gènes GFAP, CD14, PDPN et HTRA3. La culture primaire de cellules cérébrales adultes à partir de biopsies humaines permet d'aborder la plasticité intégrée dans le système humain dans un modèle différent des lignées cellulaires comme hCMEC/D3. Ils ont mis en évidence la surexpression dans les cellules endothéliales des gènes : *TBXA2R*, *CYP1B1*, *TBX3*, *FN1*, *GPER1*, *PDGFRB*, *ACTA2*, *CAV1*, *PGF*, *NR2F2*. Ils concluent de leurs analyses que les RNA devraient être pris comme sélectifs et non pas spécifiques d'un type cellulaire. En effet ils sont souvent enrichis dans un type cellulaire mais présent en plus faible quantité dans d'autres. Ces données fournissent une variété de phénotypes inhérente aux cellules du cerveau humain pour le bon fonctionnement de cet organe Figure 29 (229).

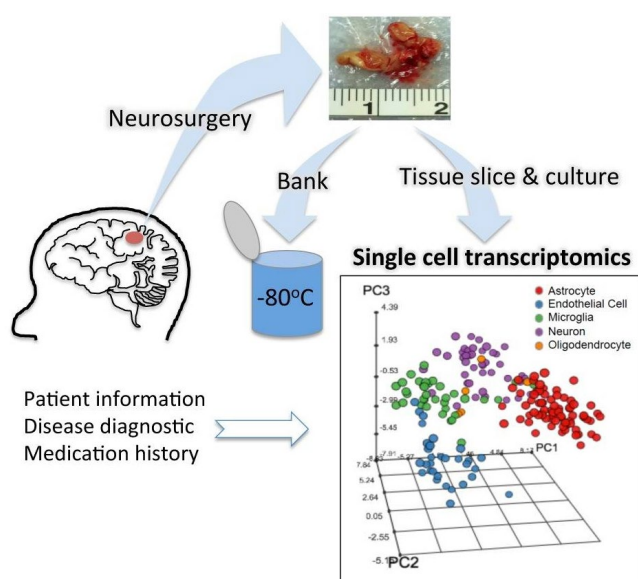


Figure 29: Analyse transcriptomique par RNA-seq de cellules issues de résections chirurgicales cultivées *in vitro* pendant 3 semaines (229)

Dusart et al en 2019 ont compilé les résultats des analyses des données accessibles dans les bases suivantes : projet Genotype-Tissue Expression (GTEx) (gtexportal.org) n = 158, 108 hommes, 50 femmes, âgés de 20 à 79 ans, du TCGA Research Network (<https://www.cancer.gov/about-nci/organization/ccg/research/structural-genomics/tcga>) et du portail de connaissances AMP-AD (<https://www.synapse.org>) (ID de l'étude : syn3163039) (n = 80, 41 hommes, 39 femmes, âgés de 53 à 90 ans). Un ensemble de données de scRNAseq cérébraux normaux (219) et RNAseq de types de cellules cérébrales humaines et de souris isolées (216,217) a été téléchargé à partir de la base de données Gene Expression Omnibus (GEO). Ils ont mis en évidence des gènes enrichis dans les cellules endothéliales cérébrales : *CYYR1*, *ESAM*, *SHE*, *LSR*, *GATA2*, *PRKH*, *TCN2*, *MARVELD2*, *ABCB1*, *PALMD*, *PAQR5*, *ACVRL1*, *SULT161*, *LY75*, *ANXA3* et surtout des gènes

marqueurs de glioblastomes comparés aux tissus sains. Leurs résultats sont accessibles sur le site suivant : <https://cell-enrichment.shinyapps.io/Brain/> (230). Un des aspects sur lequel cette étude aurait pu être éclairante est celui de la perméabilité de la BHE dans le glioblastome comparé au cerveau normal. Cette question reste très débattue dans la communauté scientifique. Certains auteurs démontrent une perturbation de la BHE dans l'environnement tumoral (231). Même si la BHE est perturbée dans des régions tumorales, elle reste intacte dans les régions péri-tumorale et peut-être une entrave au passage des biothérapeutiques (232). C'est également le cas des sites micrométastatiques et des petites cellules tumorales en bordure de glioblastome non visibles à l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Ces cellules tumorales sont localisées derrière une BHE saine (233).

En 2020, Jambusaria et al propose une analyse différentielle par RNAseq cellules uniques chez la souris en condition physiologiques ou d'inflammation sur 3 organes dont le cerveau. Ils ont utilisé un modèle de souris RiboTag. Ces souris LoxP expriment une étiquette HemAgglutinin (HA) sur la protéine ribosomique Rpl22 ce qui permet l'isolement direct d'ARNm spécifiques aux tissus subissant une traduction sans dissociation cellulaire Figure 30. Ils ont créé une base de données consultables qui donne l'enrichissement de chaque gène détecté [Rehmanwebsite \(rehmanlab.org\)](http://Rehmanwebsite(rehmanlab.org)) en condition physiologique ou inflammatoire (injection de lipopolysaccharide (LPS) 10mg/kg). Dans cette étude, les gènes les plus représentés dans les cellules endothéliales de cerveau sont : *Mbp*, *Plp1*, *Calm1*, *Sanp25*, *Kif5a*, *Atp1a3*, *Slc1a2*, *Sparcl1*, *Cpe*, *Scd2* (234).

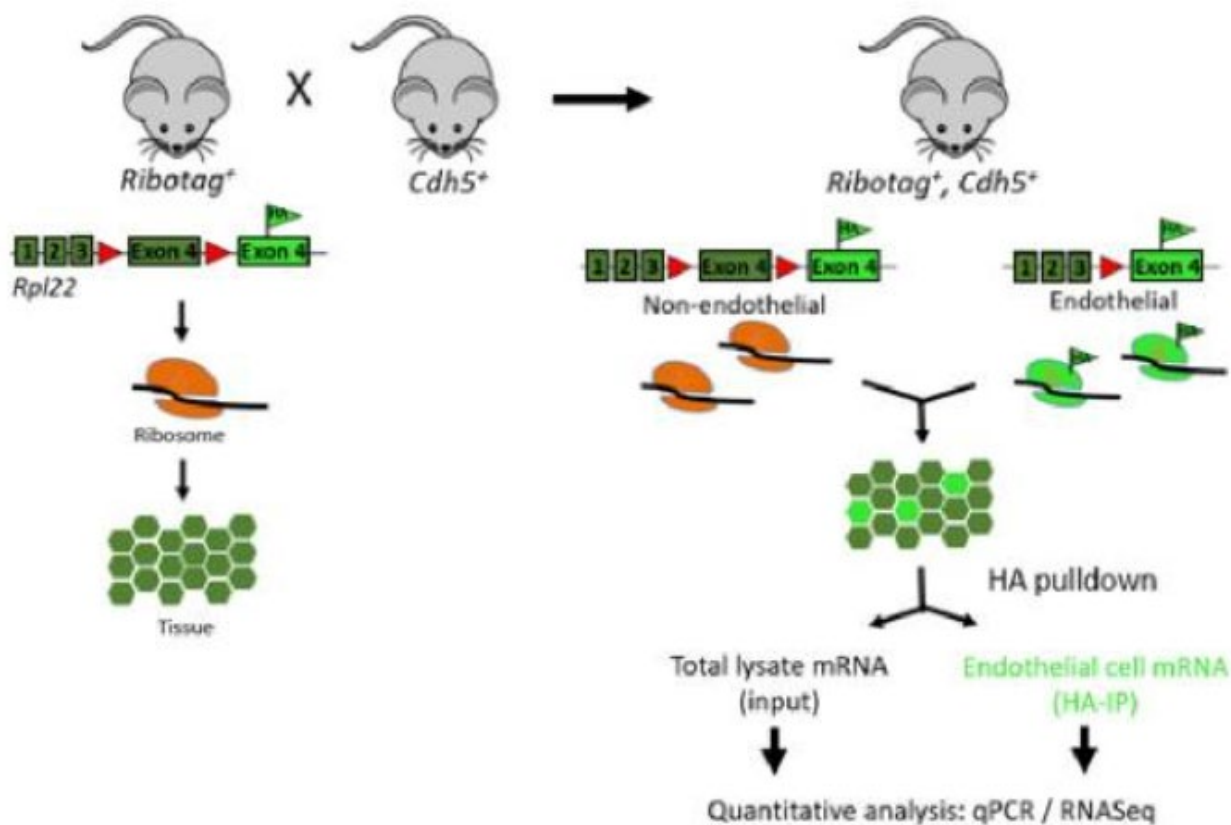


Figure 30 : Sélection de cellules endothéliales de souris transgéniques en vue d'une analyse transcriptomique par RNAseq (234).

La compréhension du mode d'entrée dans le cerveau de certains virus, bactéries ou autres pathogènes a motivé plusieurs recherches (235) et (236). Celle de Jiménez-Munguía a fait appel à des techniques de transcriptomique. Dans cette étude, les auteurs font une analyse fonctionnelle intégrative pour mettre en évidence les événements de signalisation cellulaire dans les hCMEC/D3 en contact avec *S. pneumoniae* ou LBP (*laminin binding protein*). LBP est l'une des principales protéines de surface streptococcique qui déclenche des événements de signalisation dans les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales. Ils veulent contribuer à une meilleure compréhension de l'invasion des pneumocoques à travers la BHE et soulignent le rôle de l'adhésine LBP dans l'expression génique du complexe neurovasculaire. Au total, 350 gènes exprimés différemment (DEG) ont été identifiés après une infection par *S. pneumoniae*, contre 443 DEG lors d'une incubation avec LBP. Au total, 231 DEG sont communs dans les deux traitements. L'analyse fonctionnelle intégrative a révélé que les DEG appartiennent aux cytokines, aux chimiokines, aux voies de signalisation du TNF et à la formation de phagosomes. Ils mettent en évidence Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM), ICAM, SELE, CCR10 comme gènes impliqués dans la migration transendothéliale des leucocytes. Ils ont identifié une expression accrue des protéines d'adhésion (comme ICAM-1) pour faciliter l'adhésion des macrophages à l'épithélium microvasculaire pour contribuer à la clairance du pneumocoque (237). Pour arriver à comprendre l'énorme différence de tropisme cérébral d'un Adeno-Associated Virus (AAV) entre les souris BalbC

et C57Bl6 , Huang et al (238) a criblé différentiellement le génome de 13 souches de souris et a identifié un récepteur, LY6A, qui serait impliqué comme récepteur de AAV-PHP.B. Ils montrent une abolition du tropisme cérébrale si le gène LY6A est modifié par « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats » (CRISPR) ou en utilisant des anticorps bloquants. Ils augmentent la transduction de ce vecteur dans les cellules Human Embryonic Kidney (HEK) ou Chinese Hamster Ovary (CHO) dans lesquelles LY6A est surexprimé.

Thème	Auteurs	Année	Technique	Espèce	Matériel	Gènes identifiés / Résultats
Transporteurs	Stoll (204)	1993	RNAse protection	Rat	Microvaisseaux capillaires cérébraux et de plexus choroïde	<i>Caat</i> (Cationic Amino Acid Transporter) system y+
	Boado (205)	1999	Librairie de cDNA phage λgt11	Bovin	Microvaisseaux capillaires cérébraux	LAT1
	Dauchy (206)	2008	RT-qPCR et WB	Humain	Microvaisseaux capillaires cérébraux résections de gliome ou d'épilepsie de 7 patients	<i>ABCB1, ABCG2, ABCC6, ABCC12, CYP1B1</i> surexprimés <i>ABCC11</i> sous exprimés
	Shawahna (207)	2011	RT-qPCR et LC-MS	Humain	Microvaisseaux capillaires cérébraux résections de gliome ou d'épilepsie de 12 patients (7 de Dauchy et al + 5 new)	<i>LAT1, OCT3, OATP2B1, MCT1, OCTN2</i> et <i>MATE1</i>
	Warren (208)	2009	qPCR	Rats souris porcs bovins humains	Capillaires de cerveau rats, souris porcs, bovins, humain (résection de patients épileptiques)	<i>ABCB1, ABCC1, ABCC4, ABCC5</i> et <i>ABCG2</i> , <i>Nouveaux transporteurs ABCA3, ABCA4, ABCB4, ABCB7, ABCC3, ABCC6, et ABCC10</i> <i>ABCC4, ABCC5, ABCG2, et ABCC10</i> différences de niveau d'expression inter espèce
	Geier (209)	2013	RT-PCR OpenArray	Humain	Microvaisseaux capillaires cérébraux 4 patients décédés ARNm de foie et de reins humain commercial	Vs cortex: <i>SLC7A5, SLCO2B1, ABCB1</i> et <i>ABCG2, SLC26s, SLC19A3, SLC6A13</i> et <i>SLC47A2</i> Vs rein: <i>ABCB1, ABCC5, ABCG2, SLC22A5</i> et <i>SLCO1A2</i> Vs foie: <i>ABCB1, ABCC4, ABCG2, SLC19A1, SLC22A5</i> et <i>SLCO2B1</i>
	Suhy (213)	2017	RNAseq	Humain	Microvaisseaux capillaires cérébraux autopsie	<i>ABCB1, ABCG2, SLCO2B1</i> et <i>SLC47A1, SLC26A1, SLC7A5 (LAT1), SLC1A7, SLC22A5, SLC25A48, ABCG2, ABCC4, ABCB1, SLC38A8, SLC13A4, SLC45A2, SLC7A5P1, SLC38A4, SLC22A14, SLC7A5P2</i> et <i>SLC30A10</i>
	Zhang (239)	2020	RNA Seq	Humain souris	Microvaisseaux capillaires cérébraux Echantillon humains issus d'autopsie	<i>TFRC, INSR, IGF1R, IGF2R, LRP1, LDLR, LRP8, CDC50A, SLC2A1, SLC3A2</i> et <i>LEPR</i>
Gènes enrichis	Song (214)	2020	Microdissection laser RNAseq	Humain Souris	Cellules endothéliales et péricytes et cellules endothéliales de souris 3 patients résections chirurgicales	<i>Vtn, Slco1c1, Slc6a20a, Atp13a5, Slc22a8</i> <i>SLCO2A1, GIMAP7, et A2M</i>
	Li (161)	2001	SSH cerveau vs rein et foie	Rat	Microvaisseaux capillaires cérébraux	<i>Mbp, Tfrc, Mhc</i> et des gènes inconnus
	Shusta (240)	2002	SSH cerveau vs rein et foie	Humain	Microvaisseaux capillaires cérébraux résection de patients épileptiques	20 gènes impliqués dans angiogenèse, neurogénèse, transport, jonctions serrées. 18 gènes fonctions inconnues
	Enerson (162)	2006	SAGE	Rat	Microvaisseaux capillaires cérébraux Comparaison de leur catalogue SAGE de microvaisseaux cérébraux et de cortex avec un catalogue SAGE d'hippocampe généré par Datson et al 2001.	<i>Hbb, mt-Co2, Verge, Tfrc, Tsc2, Pkd1, Slc2a1, Cldn5, Slc7a1, Slco1c1 Csrp2, Scarb1, Nr4a1</i> nouveau transporteur: <i>Smyt, Slcs5a5</i>

Thème	Auteurs	Année	Technique	Espèce	Matériel	Gènes identifiés / Résultats
Analyse de base de données	Damenan (18)	2010	Puce Affymetrix genome Mouse 430 2.0	Souris Tg Tie2-EGFP	Cellules endothéliales de cortex, foie et poumon	<i>Itm2a, Apccdd1, Tmeff1, Tmem23, Ly75, Ly6c, cd34, Pcdh19</i> et <i>Extl3</i>
	Zhang (216)	2014	RNA seq et microarray	Souris Tg Tie2-EGFP	Cellules endothéliales immunopanning	<i>Tfrc, Pglyrp1, H2-D2, Eltd1, Kdr, Eng, Egalité1, Cav1, Flt1, Fcgrt, Sema7a, Dsl, Acvr11, Tek, Gpr116, Fzd6, Ptprb, Aplnr, Ptpng, Plxnd1, Cldn5, Ly6a, Ly6c1, Car4, Bsg, Smlco1a4, Slc16a1, Vwa1, Cd34, Egfl7, Slc35t2, Tie1, Erg, Foxq1, Foxl2, Bcl6b, Sox7</i>
	Zhang (217)	2016	RNAseq sur cellules uniques	Humain	Cellules endothéliales isolées par immunopanning 22 patients de 8 à 65 ans résections chirurgicales d'épilepsies et de gliome	http://www.brainrnaseq.org
	Tasic (218)	2016	RNA seq sur cellules uniques	Souris	Microdissection de cortex visuel primaire	Commentaires sur les différents types neuronaux
	Darmanis (219)	2015	RNAseq sur cellules uniques	Humain	Cellules de cerveaux dissociés par des enzymes 8 patients adultes résections chirurgicales et 4 fœtus d'IVG	Regroupement des cellules par génotype
	Zeisel (220)	2015	RNA seq sur cellules uniques	Souris	3005 cellules issues de microdissection cortex somatosensoriel primaire S1 et hippocampe CA1	Regroupement des cellules par génotype
	McKenzie (221)	2018	Méta analyse de données	Humain souris	Immunopanning Zhang 2016 humain, Zhang 2015 souris, RNAseq cellules uniques Darmanis 2015 humain Tasic 2016 souris et Zeisel 2015 souris	Base de données BRETIGEA <i>Itm2a, Bsg, Ifitm1, Apold1, Rscg5</i>
	He (222)	2018	RNA seq sur cellules uniques	Souris	Cellules endothéliales cérébrales et pulmonaires	http://betsholtzlab.org/VascularSingleCells/database.html
	Feng (223)	2019	RNAseq single cell Projet Tabula Muris	Souris	Cellules endothéliales de 20 tissus différents	<i>Itm2a</i> et <i>Slc2a1</i>
	Kalucka (224)	2020	RNAseq sur cellules uniques	Souris	Cellules endothéliales CD31+ de 11 organes différents	https://www.vibcancer.be/software-tools/ec-atlas
	Lyck (225)	2009	Puce Affymetrix genome Mouse 430 2.0 RT qPCR	Souris	Cellules endothéliales cérébrales isolées par PECAM+ ou cultivées en monoculture ou en co-culture avec des astrocytes ou des bend5	<i>4F2hc, Lat1, Taut, Snat3, Snat5, Xpct, et Cat1</i> dérégulés en culture <i>Snat2</i> et <i>Eaat3</i> sont stables malgré la culture <i>y+Lat2, xCT, et Snat1</i> surexprimés en culture
BHE au cours du développement	Urich (226)	2012	Puce Affymetrix GeneChip 3' IVT	Humain	Cellules hCMEC/D3 et human primary BMEC	Différences d'expression <i>Glut1</i> (SLC2A1), <i>MCT1</i> (SLC16A1), <i>MCT8</i> (SLC6A2), <i>TauT</i> (SLC6A6), <i>CAT1</i> (SLC7A1) et <i>LAT1</i> (SLC7A5). <i>P-gp</i> (ABCB1), <i>MRP4</i> (ABCC4) et <i>BRCP</i> (ABCG2) sont diminués en culture
	Ben-Zvi (12)	2014	Fonctionnelle, puce Affymetrix	Souris	Cellules endothéliales du cerveau ou des poumons au moment de l'acquisition de l'intégrité de la BHE	<i>Mfsd2a</i>

Thème	Auteurs	Année	Technique	Espèce	Matériel	Gènes identifiés / Résultats
BHE dans les pathologies	Goodall (228)	2019	Puce Affymetrix genome Mouse 430 2.0 human U133 PLUS 2.0	Souris Humain	ARNm de microdissection laser de cellules microvasculaires échantillons humains mort subite entre 20 et 30 ans et 71 à 79 ans. Echantillons souris 3,12 et 24 mois	Gènes communs aux 2 espèces évoluant dans le même sens au cours du vieillissement : <i>ARHGAP42, DSCAM, SNAI2, ERLEC1, GRIN2C, ZNF704, ATF6, FOXA1, FOXP1, BECN1, TP53</i>
	Hupe (227)	2017	RNA seq sur cellules uniques	Souris Tg mCherry TRAP promoteur ERT2	ARNm des cellules endothéliales des organes cerveau, cœur, poumon foie, reins, membres	<i>Nkd1, Ppard et Ttyh2</i>
	Spaethling (229)	2017	RNA seq de 300 cellules uniques	Humain	Cellules primaires de 7 patients cultivées pendant 3 semaines 7 patients : 4 résections épileptiques et 3 gliomes	<i>TBXA2R, CYP1B1, TBX3, FN1, GPER1, PDGFRB, ACTA2, CAV1, PGF, NR2F2</i>
	Dusart (230)	2019	RNAseq en vrac	Humain	Cellules endothéliales de cerveau sain vs glioblastome Projet Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portail de connaissances AMP-AD Ensemble de données de scRNaseq GEO	<i>CYYR1, ESAM, SHE, LSR, GATA2, PRKH, TCN2, MARVELD2, ABCB1, PALMD, PAQR5, ACVRL1, SULT161, LY75, ANXA3</i> https://cell-enrichment.shinyapps.io/Brain/
	Jambusaria (234)	2020	RNAseq sur cellules uniques	Souris Tg RiboTag croisé avec Cdh5	Cellules endothéliales de différents organes en conditions physiologique ou inflammatoire après injection de LPS	<i>Mbp, Plp1, Calm1, Sanp25, Kif5a, Atp1a3, Slc1a2, Sparcl1, Cpe, Scd2</i>
Mode d'entrée des pathogènes	Jiménez-Munguia (237)	2021	RNAseq	Humain	hCMEC/D3 sauvage, en contact avec <i>S.pneumoniae</i> ou LBP	<i>ICAM, VCAM, SELE et CCR10</i> impliqués dans la migration transendothéliale des leucocytes
	Huang (238)	2019	Analyse de données des SNP du projet Mouse Genome Project	Souris	Données des SNP de 13 souches de souris différentes corrélées au tropisme cérébral du vecteur AAV-PHP.B	<i>ly6a</i>

Tableau 1: Etudes transcriptomiques publiées sur les cellules endothéliales

Les études décrites ci-dessus font ressortir trois grandes conclusions : D'une part, des analyses qui utilisent des méthodologies complètement différentes ont identifié les mêmes gènes spécifiques de la BHE. D'autre part, ces analyses montrent l'expression et l'enrichissement sur la BHE de gènes couramment étudiés importants pour ses fonctions comme : les jonctions serrées (*claudin 5*, *occludin*, *Zo-1*, *Zo-2*), le transport d'efflux (*P-glycoprotéine*, et *Bcrp*), le transport des nutriments (*Glut-1*, *Mct-1*, *Lat-1*) et d'autres (basigine, anhydrase carbonique 4). La forte reproductibilité des analyses suggère que ces données pourraient permettre l'identification de nouveaux gènes importants pour la fonction de la BHE (241). Enfin, même si certaines analyses ont permis d'identifier des gènes spécifiquement exprimés ou enrichis sur la BHE, ou de confirmer la présence de gènes déjà connus pour faire de la transcytose (TFRC par exemple), très peu sont allées jusqu'à la validation d'un nouveau mécanisme permettant de transporter des médicaments dans le cerveau.

Il faut noter les difficultés de translabilité des études entre espèce. Zhang et al en 2020 publient l'abondance de l'ARNm des principaux RMT présent sur la BHE entre des tissus humains et souris. L'abondance de ces transcrits étant différentes entre ces 2 modèles, il faut en tenir compte lors de la transition des modèles souris vers humains (239) Un des principaux inconvénients des approches transcriptomiques est que l'abondance des transcrits n'est pas forcément corrélée avec les niveaux de protéines et leur activité fonctionnelle. Jiang et al en 2020, ont publié le résultat d'une étude protéomique partant du matériel utilisé dans le projet GTEx (Genotype-Tissue Expression). Ce projet a pour but d'identifier et de quantifier les ARNm de tissus humains. Dans leurs travaux, Jiang et al ont utilisé la spectrométrie de masse et la quantification pour étudier de nombreux tissus humains avec de multiples répliques biologiques et les faire correspondre au niveau transcriptomique dans les mêmes tissus. Ils ont étudié 201 échantillons dont des cerveaux humains provenant de 948 donneurs post-mortem issus de GTEx. Ils ont mis en évidence que l'abondance de nombreux transcrits d'ARN n'est pas corrélée avec l'abondance des protéines codées. Les exemples incluent des protéines de transport qui sont impliquées dans la fonction des neurotransmetteurs et la signalisation cellulaire qui sont très enrichies dans le cerveau, mais qui ne présentent pas d'enrichissement en ARN. Inversement, des transcriptions d'ARN enrichies/spécifiques aux tissus peuvent être trouvées dans des tissus sans enrichissement protéique correspondant (242). Ces découvertes renforcent la nécessité de compléter l'approche transcriptomique avec des approches protéomiques.

Ainsi l'approche qui a été développée par le consortium IMI Collaboration on the Optimisation of Macromolecular Pharmaceutical Access to Cellular Targets (COMPACT) et qui a servi de base à une partie du travail que nous détaillerons plus loin, a utilisé conjointement transcriptomique et protéomique pour rechercher des nouvelles cibles RMT (243). De même, nous verrons dans le chapitre suivant une des études les plus emblématiques pour l'identification de nouveaux

mécanismes de transport des anticorps au cerveau et qui a précisément confirmé par protéomique des pistes identifiées par des études transcriptomiques (163).

1.3.1.2 Protéomique

Depuis 2019 a été mis en ligne : « The Brain Atlas » qui indique l'expression des protéines dans le cerveau des mammifères en intégrant les données de trois espèces : humain, porc et souris. Human Protein Atlas (HPA) a intégré les données du projet GTex en 2016.

Nous avons regroupé les études de protéomiques de la BHE selon leurs différents objectifs : recherche de protéines enrichies dans le tissu cérébral, quantification et localisation des protéines de la BHE et enfin nous détaillerons la seule entreprise complète par transcriptomique et protéomique qui a abouti à l'identification de nouveaux mécanismes de transport au travers de la BHE. Comme pour les études transcriptomiques, les résultats et les données générées ont évolué avec les améliorations technologiques.

La méthode globale utilisée pour rechercher les protéines enrichies dans le tissu cérébral est résumée sur le schéma suivant Figure 31. A partir de cellules endothéliales cérébrales ou de microvaisseaux, des fractions sont obtenues par différentes techniques de marquage, de digestion ou autres. Une détection des peptides présents par spectrométrie de masse permet de faire une analyse des protéines exprimées dans les échantillons. L'enjeu est maintenant sur l'analyse et l'interprétation des énormes jeux de données générés par ces études (244).

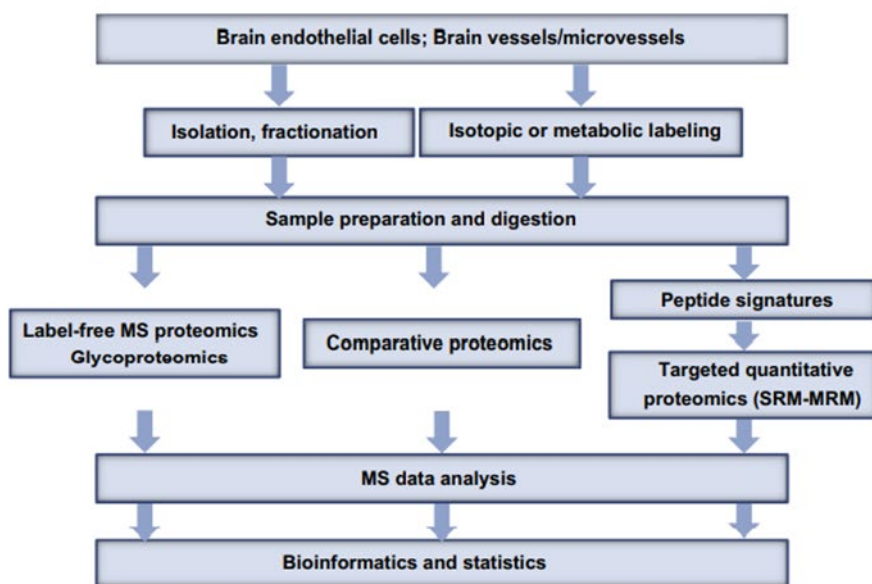


Figure 31: Schéma du processus d'identification et de quantification des protéines génériques composant l'unité neuro-vasculaire. MRM: multiple-reaction monitoring; MS, mass spectrometry; SRM, selected reaction monitoring (244).

L'identification de protéines combinée à une stratégie de départ permettant de concentrer les efforts sur le cerveau ou la BHE ont été mises en œuvre par différentes équipes. Certaines études sont

globales sur le protéome humain et comprennent des données sur le cerveau. Le projet HPA a été initié en 2003 en Suède. Le but est de générer une carte tissulaire du protéome humain à partir d'analyses de 32 tissus et 47 lignées cellulaires, avec des données d'expression de l'ARN et des protéines. 12 tissus supplémentaires ont été analysés par protéomique. Les données sont consultables sur www.proteinatlas.org. Les analyses mettent en évidence les protéines enrichies dans les tissus et les profils d'expression pour des classes de protéines spécifiques. Des listes complètes de gènes exprimés à des niveaux élevés dans les tissus ont été compilées, avec des profils d'expression quantitatifs fournis par transcriptomique et complétée par immunohistochimie. Cela permet de localiser les protéines dans les sous-compartiments de chaque tissu et organe jusqu'à la cellule unique (245) (246). D'autres études isolent directement du matériel à partir du tissu cérébral voire des cellules endothéliales constituant la BHE. En 2008, Lu et al couplent une microdissection par capture laser immunoguidée CD31+ de cortex de souris à une détection LTQ-FT MS (Fourier Transfer Mass spectrometry) après une digestion à la trypsine. Ils identifient une centaine de protéines dont les transporteurs suivants : Abcb1, Mrp1, Asct1, Slc25a3, Tat1, des protéines de jonctions et des enzymes métaboliques (247). Chun et al en 2011 ont utilisé la technique d'identification multidimensionnelle des protéines (MudPIT) sur des membranes isolées à partir de microvaisseaux cérébraux de souris. MudPIT est une technique protéomique basée sur la chromatographie dans laquelle un mélange peptidique complexe est chargé directement sur une colonne microcapillaire triphasique (phase reverse, échange de cation et phase reverse HPLC). Cette colonne est placée directement en ligne avec un spectromètre de masse en tandem. Les données de spectrométrie de masse en tandem générées à partir d'une analyse MudPIT sont ensuite recherchées pour déterminer la teneur en protéines de l'échantillon d'origine (<https://research.stowers.org/roteomics/mudpit.html>). Ils ont appliqué cette technique plusieurs fois afin d'identifier les protéines d'abondance plus faible. Leur stratégie a permis l'identification et la classification de transporteurs membranaires de la BHE, de protéines à jonction serrée, d'intégrines, de protéines de la matrice extracellulaire et des protéoglycanes. Ils ont comparé leur analyse MudPIT avec la quantification de transporteurs membranaires connus à partir de microvaisseaux humains et murins (248). Leurs résultats montrent qu'une approche MudPIT est appropriée pour l'identification de protéines à partir de membranes de BHE isolées. En utilisant des microvaisseaux intacts frais, 58% des protéines enrichies sur la BHE identifiées par microdissection de capture laser ou électrophorèse sur gel étaient également mises en évidence dans leurs études (249). En 2011, Pottiez et al ont fait une étude protéomique de cellules endothéliales cérébrales de bovins. Ils ont fait une électrophorèse 2D sur gel polyacrylamide combiné à de la chromatographie liquide. Ils ont ensuite identifié 81 spots par spectrométrie de masse et réalisé des western blot pour évaluer la quantité de protéine exprimée. A l'aide de PANTHER (Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships) et IPA (Ingenuity Pathway Analysis), ils ont déterminé que les protéines identifiées

sont impliquées dans la structure et l'organisation cellulaire, la signalisation et l'interaction entre les cellules ou le métabolisme et les processus de modification des protéines (250). En 2013, Geier et al, ont analysé l'expression protéique de gènes surexprimés à la BHE par western Blot et immunohistofluorescence. Les protéines LAT1, OCT3 (*SLC22A3*), et le transporteur de folate réduit (RFC; *SLC19A1*) ont été détectés dans les microvaisseaux de diamètre inférieurs à 10 µm tandis que MATE1 (*SLC47A1*) a été principalement détecté dans les microvaisseaux de diamètres supérieurs à 10 µm (209). Ohtsuki et al en 2013 font une analyse du protéome des hCMEC/D3 par LC-MS/MS basée sur une quantification absolue par une méthode de multiplexed multiple/selective reaction monitoring (multiplexed MRM/SRM). Ils comparent le protéome des hCMEC/D3 avec des microvaisseaux humains issus d'expériences précédentes (248) et des HUVEC. Les protéines ABCA2, MDR1, MRP4, BCRP, GLUT1, 4F2hc, MCT1, ENT1, TFRC InsR et CLDN5 sont exprimées dans les hCMEC/D3 et les microvaisseaux. Les protéines ABCA8, LAT1, LRP1 et γ -GTP ne sont exprimées que dans les microvaisseaux tandis que les protéines ABCA3, ABCA6, MRP1 et ATA1 ne sont exprimées que dans les hCMEC/D3 (251). Sato et al en 2019 ont publié les résultats d'une étude dans laquelle ils administrent des fractions de protéines cytosoliques hépatiques marquées à la biotine à des souris *in vivo*. Ils ont identifié neuf protéines biotinylées dans le cerveau des souris : P05201 aspartate aminotransférase cytoplasmique, Q04447 créatine kinase de type B, P16125 L-lactate déshydrogénase B, P52480-2 pyruvate kinase isoforme M1, Q99KI0 aconitate hydratase mitochondriale, P06745 glucose-6-phosphate isomérase, P15105 glutamine synthétase, P10649 glutathion S-transférase Mu 1, Q9QZZ4 myosine-XV. Ils focalisent leurs recherches sur la créatine kinase et démontrent que le type musculaire (CK-MM) est absorbée préférentiellement par les hCMEC/D3 comparé au type cérébral (CK-BB). Cette absorption diminue à 4°C et en présence d'inhibiteurs de clathrine et de cavéoline suggérant plusieurs mécanismes de transport à travers la BHE (252).

Une fois les protéines spécifiques de la BHE identifiées, une information intéressante à obtenir est leur quantification. On peut facilement comprendre que plus une protéine sera abondante dans les cellules endothéliales plus elle sera une cible facile et intéressante à étudier. A l'instar des études protéomiques, une partie des études se sont concentrées sur la quantification de transporteurs. En 2007, Ohtsuki et Terasaki proposent une revue sur les connaissances des transporteurs d'influx et d'efflux présents sur la BHE et de leur potentiel pour découvrir de nouveaux mécanismes pour franchir la BHE (253). La technologie repose essentiellement sur une identification des protéines par la caractérisation en spectrométrie de masse des peptides obtenus après digestion trypsique. La quantification peut se faire grâce à l'addition de peptides marqués (Figure 32). Ils proposent d'utiliser la spectrométrie de masse pour créer un atlas de transporteurs présents sur la BHE. Les transporteurs sont souvent très glycosylés et peuvent avoir une expression restreinte sur la BHE.

Le même groupe a mis au point une technique de spectrométrie de masse (Multiple-Reaction-Monitoring) MRM LC-MS/MS plus sensible et l'appliquent à une étude protéomique spécifique de la BHE de souris. Pour la sélection des peptides, ils ont ajouté une étape in silico avec des critères spécifiques aux protéines transmembranaires. Cela permet d'augmenter la sensibilité de la LC-MS/MS classique et de détecter ces protéines faiblement représentées. Ils ont quantifié Mdr1a, Mrp4, Bcrp, 4F2hc, Asct2, Glut1, Mct1, Lat1, Oat3, Oatp2, Oatpf, Taut dans les cellules endothéliales capillaires cérébrales (254).

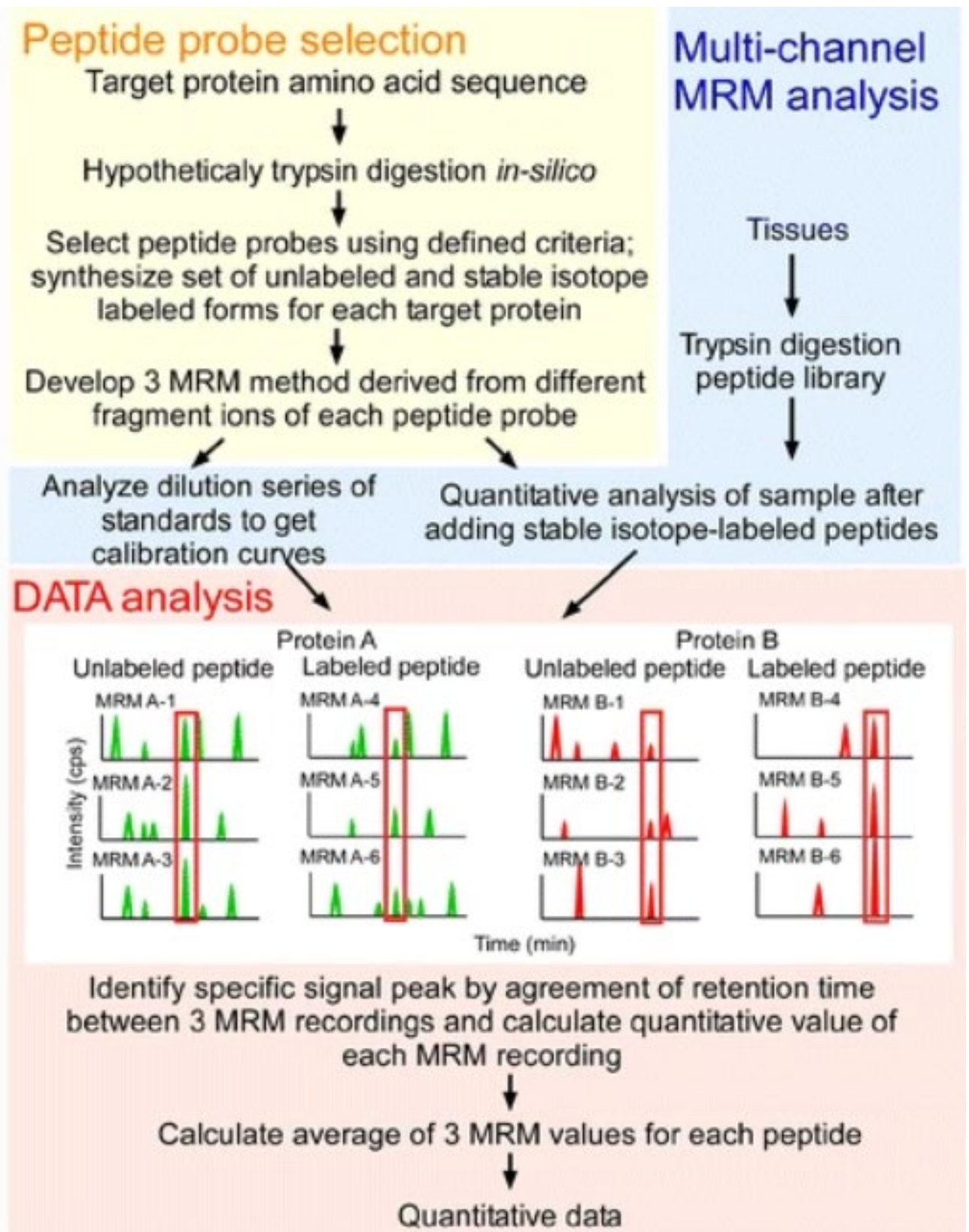


Figure 32: Représentation schématique de la stratégie de quantification des protéines (254). La stratégie de quantification est composée de trois sections comprenant la sélection peptidique *in-silico* (zone jaune), l'analyse MRM multicanal (zone bleue) et l'analyse DATA (zone rouge).

Les protéines cibles sont aléatoirement digérées avec de la trypsine et les peptides détectables dans LC-MS/MS sont sélectionnés au moyen d'une approche informatique. Les peptides

sélectionnés sont synthétisés sous forme d'ensembles non marqués et stables radiomarqués. L'analyse de trois ions produits de chaque peptide est optimisée avec LC-MS/MS en mode MRM. Un échantillon biologique est digéré avec de la trypsine dans des conditions de dénaturation. Le produit de digestion est mélangé avec une quantité fixe de peptides marqués par des isotopes stables comme étalons internes et analysés par LC-MS/MS en mode MRM. Les pics de signaux spécifiques sont identifiés par l'accord du temps de rétention entre les canaux. La quantité de protéines cibles est calculée (peptide endogène/peptide marqué isotopique stable) (254). Uchida et al en 2013, ont décrit un protocole QTAP (Quantitative Targeted Absolute Proteomics) qui permet la quantification absolue de protéines de faible abondance, applicable à l'étude de la BHE (255,256).

En 2011, Ito et al ont fait une étude du niveau d'expression des protéines membranaires (transporteurs, récepteurs et jonctions serrées) sur des microvaisseaux cérébraux de singes cynomolgus en utilisant la spectrométrie de masse associée à la chromatographie liquide. Les 51 protéines étudiées ont été sélectionnées *in silico*. Ils ont comparé ces résultats à ceux obtenus chez la souris. Ils ont réalisé cette analyse sur des individus à différents stades de développement. Par exemple, pour la P-gp qui est beaucoup moins exprimée chez le jeune rongeur que chez le singe adulte, le jeune rongeur serait un mauvais modèle d'étude (257). Uchida en 2011 fait une étude protéomique de microvaisseaux cérébraux humains et souris, isolés à partir de cortex congelés de sept patients décédés et de cerveaux de souris. Ils quantifient le niveau de protéines dans ces tissus. La quantité de protéines BCRP est retrouvée 1,85 fois plus élevée chez l'homme que chez la souris. Le niveau d'expression de la P-glycoprotéine chez l'homme (protéine 6,06 fmol/ μ g) est 2,33 fois plus faible que celui de MDR1 chez la souris. Les Multidrug resistance-associated protein (MRP), les transporteurs d'anions organiques et les membres de la famille des polypeptides transportant des anions organiques, n'ont pas été détectés chez l'homme, à l'exception de MRP4 (protéine 0,195 fmol / μ g). GLUT 1 est similaire chez l'homme et la souris, tandis que la protéine LAT1 est cinq fois plus faible chez la souris (248). En 2013, Hoshi et al ont présenté les résultats d'une quantification absolue de protéines connues exprimées sur la BHE. Ils ont comparé la quantité de protéines entre différentes souches de rats et entre les humains et les rongeurs ou entre les humains et les singes. Ils ont trouvé des similitudes et également des différences comme celle notable de la P-gp qui est quatre fois plus exprimée chez le rat que chez l'homme. Ils concluent que le *ouistiti* est un modèle meilleur que le rat pour la prédictivité de la BHE humaine (258). En 2019, Gomez-Zepeda et al publient une méthode de quantification absolue par LC-MS/MS de transporteurs sur des vaisseaux corticaux de souris et de rats. Ils mettent en évidence l'importance des choix des peptides ainsi que la différence inter-espèce concernant les transporteurs P-gp, Bcrp et Atp 1, 2 et 3 présents sur la BHE (259). Il ressort des quatre études précédentes que la prise en

compte de l'espèce étudiée est capitale. Les variations d'expression protéique laissent présager des problèmes de transposition de résultats d'un modèle à un autre.

En 2012, Agarwal et al ont fait une quantification absolue de 29 protéines membranaires (transporteurs ABC et SLC, récepteurs) sur des microcapillaires cérébraux isolés de souris sauvages ou KO pour la P-gp, BCRP ou double KO P-gp et BCRP. Ils ont mis en évidence que le KO n'affectait que la quantité de protéines concernées par le KO et non les autres transporteurs dans différentes souches de souris. Il n'y a pas de phénomène de compensation des autres transporteurs (260), contrairement aux souris KO pour Mdr1a pour lesquelles la quantité d'ARNm de BCRP avait été multipliée par trois (261). En 2018, Al Feteisi (262) propose une standardisation d'un protocole d'isolement des microcapillaires cérébraux de rats. Ils font une analyse protéomique quantitative de ces cellules. Ils identifient de nombreux transporteurs et corrèlent leurs résultats à ceux publiés précédemment par Uchida (248) et Hoshi (258). Cette étude peut servir de base d'identification de protéines contre lesquelles il faudrait générer des anticorps. Dans un second temps, il faudrait vérifier leur capacité à faire de la transcytose. En 2019, Al-Majdoub et al publient une étude sur 22 cerveaux de patients décédés sains, d'Alzheimer ou d'une démence à corps de Levy. Ils ont extrait les microvaisseaux cérébraux et ont analysé par trois techniques de spectrométrie de masse différentes, les protéines exprimées en conditions physiologiques ou pathologiques. Ils soulignent les différences de quantité de transporteurs à prendre en compte pour adapter les traitements des patients (263). Shawahna et al en 2011 ont fait une étude LC-MS à partir de douze échantillons de cerveaux humains de patients atteints d'épilepsie ou de gliome. Ils ont mis en évidence une surexpression de certaines protéines SLC : Glut1, EAAT1, EAAT2 et de transporteurs ABC : BCRP, MDR1, ABCA2, ABCA8. Dans les Cytochrome P (CYP), seuls CYP1B1 et CYP2U1 sont quantifiables. Ils ont également mis en évidence des enzymes de phase II : GSTP1, COMT, GSTM3, GSTO1 et GSTM2 (207). Cette étude est intéressante dans la mesure où elle est la seule réalisée à partir de donneurs humains vivants.

Les études de quantifications des protéines sur la BHE font ressortir l'hétérogénéité des résultats entre espèces, entre individus et évidemment selon le contexte physiologique ou pathologique. On peut également se poser la question de la robustesse des résultats en fonction des conditions d'obtention des échantillons. Il faut garder à l'esprit la difficulté d'obtention des échantillons de cerveau humains. Les délais de prise en charge de l'échantillon jouent probablement un rôle sur l'expression protéique mais également leur provenance selon s'ils viennent d'une personne vivante ou décédée.

Une donnée importante à prendre en compte est la localisation des protéines étudiées dans le cerveau et notamment au niveau des membranes des cellules qui tapissent les vaisseaux sanguins

cérébraux. Pour trouver de nouveaux RMT, ils doivent être majoritairement présents sur la membrane luminale des cellules endothéliales formant les microcapillaires cérébraux.

Une étude reporte une différence d'expression protéique dans les cellules endothéliales selon la taille des vaisseaux analysés. Dans une étude protéomique des cellules endothéliales du cercle de Willis chez la souris en 2014, Badhwar et al utilisent deux approches : une sans gel nanoLC-mass spectrometry (MS)/MS et l'autre basée sur gel GeLIC-MS/MS, utilisant nanoAcquity UPLC couplé avec ESI-LTQ Orbitrap XL. Ils comparent le protéome des artères du cercle de Willis aux résultats obtenus par Chun et al sur les microcapillaires de souris (249). Ils confirment que l'expression protéique est différente entre des cellules endothéliales issues d'artères ou de microcapillaires (264) (265). Une étude rapporte des informations sur les protéines membranaires des cellules endothéliales. En 2010, Pottiez et al publient une étude protéomique sur des cellules primaires issues de microvaisseaux de cerveaux de bovins en co-culture ou non avec des astrocytes de rats. Ils utilisent l'électrophorèse 2D ou électrophorèse 1D couplée à LC-MS. Ils identifient les protéines solubles au Triton X100 avec le processus 1D LC-MS pour pallier le problème de séparation des très petites et très grosses protéines avec l'électrophorèse 2D. Cela crée un biais et seulement 5% des protéines identifiées sont membranaires. 293 des protéines identifiées sont phosphorylées. Cette technique peut être utilisée pour étudier le phospho-protéome (266). En 2013, Haqqani et al publient les résultats de l'analyse protéomique d'exosomes issus de hCMEC/D3 avec l'idée sous-jacente que les protéines présentes dans les exosomes sont associées à des mécanismes d'exocytose et par extension d'endocytose et de transcytose. Par spectrométrie de masse, ils ont identifié 524 protéines dont des RMT connus tels que TFRC, INSR, LDLR et LRP1 (267). Une autre technique peut être utilisée pour visualiser la localisation de protéines d'intérêt : la microscopie électronique. Les premiers résultats concernant l'identification de protéines spécifiques de la BHE comme Podocalyxin Like (PODXL) et l'anhydrase carbonique IV ont été obtenus par cette technique utilisée récemment (268,269). En 2005, Cornford et Hyman, publient une revue sur l'étude du transporteur Glut1 par microscopie électronique immunogold. Ils mettent en évidence une répartition différente du transporteur entre les membranes lumineales et ablumineales des cellules endothéliales en fonction du besoin en transport de glucose. Ils pointent l'importance de vérifier la localisation exacte des protéines à cibler pour adresser des biothérapeutiques au cerveau. Le but de leur étude est de choisir un promoteur approprié pour une expression de la protéine cible au bon endroit. Par exemple, le promoteur de Glut1 peut être envisagé pour un adressage dans les cellules endothéliales ou le promoteur de Gfap pour un adressage dans les astrocytes. Ils ont pour perspective d'utiliser la microscopie électronique Immunogold pour identifier de nouvelles cibles, en particulier celles pour participer à la transcytose médiée par les récepteurs et à l'administration d'agents biothérapeutiques dans le cerveau (270). Finalement, ces auteurs ont orienté leurs

recherches vers l'utilisation de nanoparticules, d'immunoliposomes ou de virus AAV pour franchir la BHE. Kubo et al en 2015 ont évalué la quantité de certaines protéines sur les membranes lumineales et ablumineales de cellules de microvaisseaux de porcs. Ils séparent les fractions membranaires sur gradient de Ficoll et récupèrent deux fractions distinctes pour les membranes lumineales et ablumineales. Du côté luminal, ils ont trouvé BCRP, GLUT1 (comme chez l'homme mais pas chez le rat) et OATP3A1. Du côté abluminal, ils ont trouvé: ABCA1, FATP1 (271).

La seule entreprise complète qui combine une étude transcriptomique et protéomique est celle décrite par Zuchero (163). Ils ont commencé par une analyse transcriptomique du génome de souris. Ils ont cherché des candidats RMT spécifiquement exprimés par les cellules endothéliales de la BHE. L'analyse transcriptomique a donné cinq cibles potentielles : *ldlr3*, *cd320*, *basigin* (*bsg*), *glut1* (transporteur du glucose) et *cd98* (transporteur d'acides aminés). Afin de sélectionner les cibles les plus fortement exprimées, ils ont élaboré une approche protéomique pour identifier les protéines transmembranaires qui sont fortement exprimées dans les cellules endothéliales cérébrales par spectrométrie de masse. Les résultats ont montré que, malgré une quantité de transcrits enrichis dans le cerveau, les protéines *Ldlr3* et *cd320* ne sont pas enrichies dans le cerveau de souris. Des anticorps contre ces cibles ont ensuite été générés soit à partir d'une banque de phages, soit par immunisation de souris, de rats ou de hamsters avec le domaine extracellulaire murin des protéines ou l'ADN codant pour la protéine. Ils ont estimé que le niveau absolu de protéines au niveau de la BHE peut être un facteur limitant pour transporter suffisamment d'anticorps à travers la BHE. Ils ont continué à explorer la capacité des anticorps anti-Bsg, anti-CD98hc et anti-Glut1 à atteindre le cerveau de souris injectées en intra-veineux. Ce sont les anticorps anti-CD98 qui ont montré la meilleure exposition cérébrale avec une augmentation de 5 fois par rapport au récepteur à la transferrine et de 90 fois comparé à un anticorps contrôle. Ils ont ensuite évalué la capacité de ces anticorps à atteindre une cible thérapeutique dans le cerveau en générant des anticorps bispécifiques CD98/ BACE1 par phage display. Ils ont obtenu deux anticorps avec des affinités diminuées par rapport au monospécifique, le A de 2 fois et le B de 100 fois. Lors de l'injection de ces anticorps à des souris sauvages, l'anticorps B avec le moins d'affinité a été retrouvé le plus exposé en périphérie et dans le cerveau. L'exposition cérébrale est inversement corrélée à l'affinité de l'anticorps pour sa cible. Ils ont montré cependant que les deux anticorps réduisaient la quantité cérébrale de protéines A β x-40 de 30 à 45% sans modifier la fonction physiologique de CD98 qui est un transporteur d'acides aminés Slc3A2 (163). L'avenir dira si ce transporteur démontrera comme le TFRC ou quelques autres une utilité dans l'adressage des biothérapeutiques au cerveau.

Thème	Auteurs	Année	Technique	Espèce	Matériel	Protéines identifiées / Résultats
Protéines enrichies dans le tissu cérébral	Wang(246)	2019	LC-MS/MS	Humain	Projet HPA différents tissus	« The Brain Atlas »
	Lu(247)	2008	Microdissection par capture laser LTQ-FT MS	Souris	Microdissection laser digérée à la trypsine	Abc1, Mrp1, Asct1, Slc25a3, Tat1, des protéines de jonctions, des enzymes métaboliques
	Uchida(248)	2011	MRM HPLC-MS/MS	Humain souris	Microvaisseaux cérébraux isolés à partir de cortex congelés de 7 patients décédés	BCRP P-gp MDRa MRP4 Glut 1 Lat1
	Chun(249)	2011	MudPIT	Souris	Membrane de cerveaux	https://research.stowers.org/proteomics/mudpit.html
	Pottiez(250)	2011	Electrophorèse 2D spectrométrie de masse MALDI/TOF	Bovin	Microvaisseaux cérébraux	Protéines impliquées dans la structure et l'organisation cellulaire, la signalisation et l'interaction de cellule à cellule ou le métabolisme et les processus de modification des protéines
	Geier(209)	2013	RT-PCR OpenArray WB IHC	Humain	Microvaisseaux capillaires de cerveaux humains issus 4 patients décédés	LAT1, OCT3 (SLC22A3), transporteur de folate réduit RFC (SLC19A1) dans les vaisseaux de diamètre <10µM, Détection de MATE1 (SLC47A1) dans les vaisseaux de diamètre >10µM
	Ohtsuki(251)	2013	LC-MS/MS-MRM/SRM	Humain	hCMEC/D3 et anciens résultats de microvaisseaux cérébral humain	hCMEC/D3 et les microvaisseaux : ABCA2, MDR1, MRP4, BCRP, GLUT1, 4F2hc, MCT1, ENT1, TFRC InsR et CLDN5 Microvaisseaux : ABCA8, LAT1, LRP1 et γ-GTP hCMEC/D3 : ABCA3, ABCA6, MRP1 et ATA1
	Sato (252)	2019	Biotnylation LC/MS	Souris	Souris <i>in vivo</i> puis test de la créatine kinase en Transwell hCMEC/D3	P05201, Q04447, P16125, P52480-2, Q99K10, P06745, P15105, P10649, Q9QZZ4
Quantification	Kamiie(254)	2008	MRM HPLC-MS/MS	Souris	Microvaisseaux cérébraux et tissus cerveau rein et foie	Mdr1a, Mrp4, Bcrp, 4F2hc, Asct2, Glut1, Mct1, Lat1, Oat3, Oatp2, Oatpf, Taut
	Ito(257)	2011	MRM LC-MS/MS	Singe	Microvaisseaux cérébraux	51 protéines (MDR1)
	Hoshi(258)	2013	SRM/MRM LC-MS/MS QTAP	Rat Marmouset	Microvaisseaux cérébraux	Transporteurs, récepteurs et des protéines de jonctions serrées sur la BHE. Différence de protéome inter espèce.
	Agarwal(260)	2012	MRM LC-MS/MS	Souris	Microvaisseaux cérébraux souris sauvage, KO (P-gp, BCRP, BCRP et P-gp)	Pas de compensation des autres transporteurs entre les souris sauvages et le KO
	Al Feteisi(262)	2018	LC-MS/MS	Rat	Microvaisseaux cérébraux	Transporteurs
	Al-Majdoub(263)	2019	Spectrométrie de masse AMRT, label free, MRM	Humain	Microvaisseaux cérébraux issus de 22 donneurs décédés sains, Alzheimer ou démence de Lévy	Transporteurs SLC et ABC en conditions physiologique et pathologique
	Gomez-Zepeda (259)	2019	LC-MS/MS	Rat Souris	Microvaisseaux cérébraux	Transporteurs P-gp, Bcrp, Atp 1, 2 et 3

Thème	Auteurs	Année	Technique	Espèce	Matériel	Protéines identifiées / Résultats
Localisation des protéines	Badhwar(265)	2014	nanoLC-MS/MS LC-MS/MS, nanoAcquity UPLC couplé avec ESI-LTQ Orbitrap XL	Souris	Cellules endothéliales des artères du cercle de Willis	Expression protéique différente entre des cellules endothéliales issues d'artères vs microcapillaires
	Testa(272)	2009	Gel 1D LC-MS/MS immunomarquage	Rat	Homogénat de tissus	PODXL, mAb G278
	Haqqani(267)	2013	Spectrométrie de masse	Humain	Exosomes des hCMEC/D3	TFRC, INSR, LDLR, LRP1, LRP1B, LRP2, TMEM30A, CDC50A et FcyBP
	Pottiez(266)	2010	Electrophorèse 2D ou électrophorèse 1D couplé à LC-MS	Bovin	Cellules primaire issues de microvaisseaux de cerveaux de bovins en co-culture ou non avec des astrocytes de rats	Protéines solubles
	Horvat(268)	1986	Microscopie électronique	Rat	Coupe de cerveaux	PODXL
	Ghandour(269)	1992	Microscopie électronique	Rat souris	Coupe de cerveaux	Anhydrase carbonique IV
	Kubo(271)	2015	LC-MS/MS QTAP (quantitative target absolute proteomique)	Porcin	Microvaisseaux cérébraux	Luminale : BCRP, GLUT1 et OATP3A1. Abluminale : ABCA1, FATP1
Etudes transcriptomiques et protéomiques couplées	Ben-Zvi(12)	2014	Puce Affymetrix et IHC	Souris	Cellules endothéliales du cerveau ou des poumons au moment de l'acquisition de l'intégrité de la BHE	MFSD2A
	Jiang(242)	2020	Nano 2D LC puis MS	Humain	201 échantillons dont des cerveaux humains provenant de 948 donneurs post-mortem issus de Gtex	Corrélation transcrit/protéine non systématique
	Zuchero(163)	2016	LC-MS/MS WB IHC	Souris	Cellules primaires endothéliales CD31+/CD45-	CD98 Anticorps bispécifique CD98/BACE1

Tableau 2: Etudes protéomiques publiées sur les cellules endothéliales

Le tableau 2 présente la compilation de toutes les études de protéomique de la BHE citées plus haut. On voit que même si une abondance d'articles décrit des approches protéomiques caractérisant la BHE, seul le travail de Zuchero (163) a permis l'identification d'un mécanisme permettant de faire traverser la BHE à des biothérapeutiques. A travers toutes ces expériences de protéomique, on peut aussi noter la grande difficulté à trouver des échantillons de cerveaux humains, l'hétérogénéité du matériel de départ et la disparité des méthodes d'analyses. On voit que de plus en plus de projets communs se mettent en place pour avoir accès à plus de matériel par exemple avec les projets HPA ou GTex. Il y a également un effort dans le sens de la standardisation des analyses, la mutualisation des données. Il faut maintenant l'aide de la bio-informatique pour interpréter toutes les données générées. Une fois les protéines identifiées, il faut pouvoir tester leur fonctionnalité. Un exemple d'IMI l'illustre parfaitement. Dans l'IMI COMPACT, des analyses transcriptomiques ont permis d'identifier de potentiels nouveaux récepteurs médiant la transcytose à travers la BHE. Le nouvel IMI qui fait suite : l'IM2PACT, va permettre une harmonisation des modèles *in vitro* de BHE pour pouvoir tester ces protéines pour leur capacité à faire passer des anticorps à travers la BHE. Ainsi nous pourrions obtenir des résultats robustes. La capacité à identifier et à quantifier l'internalisation des récepteurs de la surface cellulaire à partir de la surface du vaisseau *in vivo* serait particulièrement intéressante pour le domaine du transport de la BHE, grâce à l'adaptation des méthodes protéomiques d'internalisation qui ont été appliquées aux cellules *in vitro*. À mesure que les méthodes et les technologies s'améliorent, la quantification des niveaux d'expression luminale des protéines au niveau de la BHE permettra une meilleure compréhension des caractéristiques du transport de la BHE médié par les RMT, ce qui ouvrira de nombreuses nouvelles opportunités pour traiter et guérir efficacement les maladies du SNC (28).

La protéomique est un outil qui permet de générer des données en quantité importante. Il faut donc établir une stratégie en amont pour pouvoir analyser des données pertinentes. Une stratégie mise en œuvre depuis plus de 20 ans est le display.

1.3.2 Phage display

Le plus souvent, le display est utilisé pour trouver des anticorps dirigés contre une cible identifiée. Cependant, le criblage phénotypique de bibliothèques d'anticorps ou de peptides, affichées dans divers formats, y compris les phages et les levures, permet de trier un grand nombre d'anticorps ou de peptides *in vitro* ou *in vivo* sur une propriété particulière. La caractéristique fonctionnelle peut être la pénétration cérébrale ou l'affinité pour la BHE. De ce fait, les protéines obtenues ont déjà les propriétés désirées. Leurs cibles, les récepteurs, sont alors identifiées par diverses approches biochimiques, comme l'immunoprécipitation ou un séquençage basé sur la spectrométrie de masse et enfin, validées comme RMT (273). Pour ce faire, il faut générer des outils comme des anticorps, des peptides, des nanoparticules, des cellules et valider la transcytose *in vitro* et *in vivo*. C'est un

très gros travail que nous illustrerons plus tard avec notre recherche. Ces criblages sont parfois sous-tendus par des rationnels spécifiques comme la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation d'une BHE imperméable au cours du développement ou la recherche des mécanismes impliqués dans le passage dans le cerveau de certains virus ou pathogènes.

Le protocole le plus courant d'affichage par des phages peut être résumé en 8 étapes Figure 33: (1) Préparation d'une librairie de phages 2) Exposition de la librairie sur la cible; (3) Incubation de la librairie de phages avec la cible ; 4) Elimination des phages non liés avec un tampon; 5) Elution des phages liés; 6) Amplification des phages élués par infection de bactéries; (7) Répétition des étapes (3)-(6) pour augmenter le nombre de phages se liant à la cible; (8) Amplification des phages élués et sélection de certains clones pour le test de spécificité et le séquençage de l'ADN (274).

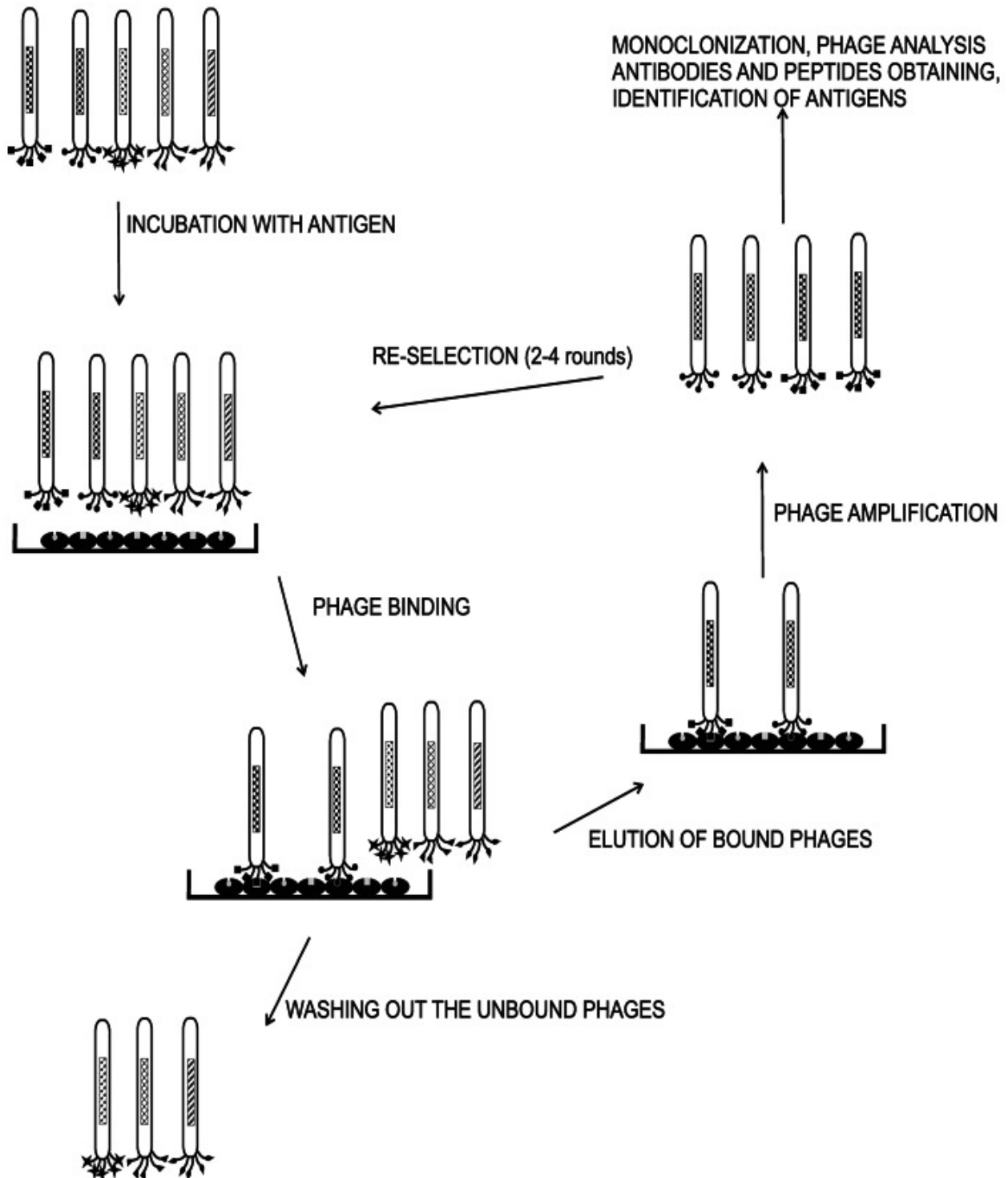


Figure 33: Présentation schématique du biopanning.

La librairie de phages est incubée avec la molécule cible immobilisée. Les phages spécifiques sont liés à la molécule et les phages non liés sont lavés. Les phages spécifiques sont élués et amplifiés dans les bactéries. Après plusieurs tours, les phages amplifiés sont analysés (275).

Certaines études de phages display affichent des **librairies naïves de peptides**. En 1996 Pasqualini et al ont injecté *in vivo* chez la souris, deux librairies de phages affichant des peptides. Ils ont enrichi les librairies avec les phages retrouvés dans le cerveau et en parallèle dans les reins.

Ils ont identifié une séquence peptidique, SRL, qui semble liée à l'adressage au cerveau. Ils ont sélectionné la séquence CLSSRLDAC (avec le meilleur ratio cerveau/rein) et l'ont greffée sur des globules rouges. Après injection dans la veine de la queue des souris, ils ont pu montrer une accumulation des globules rouges dans le cerveau. Malheureusement, ils n'ont pas pu identifier la cible du peptide sur les cellules probablement en raison de sa faible abondance (276). Plusieurs études ont ensuite déterminé d'autres séquences peptidiques d'adressage au cerveau sans chercher à identifier quelle était la cible du peptide permettant ce passage. En 2010, Van Rooy et al ont utilisé une librairie de phages peptidiques et ils l'ont administrée par perfusion intracardiaque à des souris. A chaque tour ont été sélectionnés les phages présents dans le cerveau des souris. Parmi ceux qui se lient le plus fortement, les séquences GLAHSFSDFARDFVA et GYRPVHNIRGHWAPG ont été testées sur des cellules hCMEC/D3 en comparaison avec des HUVEC. Les phages sélectionnés sont spécifiques des cellules endothéliales de la BHE (277). Ces deux peptides sont potentiellement des cibles intéressantes pour franchir la BHE. En 2011, Li et al ont identifié une séquence peptidique TGNYKALHPHNG d'adressage au cerveau par criblage d'une librairie de phages 12 mers injectée à des souris par iv caudale. Après perfusion ils ont sélectionné les phages présents dans le cerveau des souris et après 5 tours de sélection ils ont étudié les phages obtenus. Ils ont décoré des nanoparticules avec la séquence peptidique TGNYKALHPHNG. Ils ont testé la capacité des nanoparticules à s'internaliser dans des bend3. Ils ont enfin confirmé *in vivo* que la séquence TGNYKALHPHNG améliorait l'exposition cérébrale des nanoparticules injectées à des souris par iv caudale en comparaison à des nanoparticules nues (278). En 2012, Smith et al ont utilisé une librairie de phages affichant des peptides cycliques de 7 mers. Ils ont injecté la librairie de phages à des rats. Après perfusion, le cerveau et d'autres organes sont prélevés et après 5 tours de sélection ce sont les microcapillaires cérébraux qui sont prélevés. Les 500 phages présents sont étudiés. Ils ont identifié une séquence peptidique qui permet un adressage au cerveau. L'accumulation cérébrale du phage AC-SYTSSTM-CGGGS s'est avérée 4 à 5 fois supérieure à celle du phage témoin (279). En 2020, Majerova et al publient une autre étude qui aboutit à la sélection d'une séquence peptidique permettant un adressage cérébral (280). Yamaguchi et al identifient un heptapeptide SLS cyclique par criblage d'une librairie peptidique de phage M13 à travers des cellules hCMEC/D3. La capacité de transcytose du peptide identifié est vérifiée dans des modèles BHE de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de rats et de singes. Une incubation avec le peptide RGD a amélioré de 7 fois la perméabilité du phage avec le peptide SLS à travers les hCMEC/D3. Ils ont confirmé l'exposition cérébrale du phage avec le peptide SLS *in vivo* chez la souris après une injection systémique (281). En 2022, Zhang et al criblent une librairie peptidique de phages pour leur capacité à atteindre le cerveau *in vivo* chez la souris (5 tours de sélection) puis sur leur capacité à se lier au virus AAV9 (4 tours de sélection). Ils ont identifié le peptide PB5-3. Ils ont pré-incubé les virions AAV9 avec le peptide PB5-3 et après

injection intraveineuse à des souris, ils ont mis en évidence une meilleure exposition cérébrale du virus. Ils ont montré dans un modèle souris *in vivo* de mucopolysaccharidose type 1 une activité IDUA 2 fois plus élevée chez les souris qui ont reçu AAV9 PB5-3 comparé à AAV9 seul avec un taux de GAG (glyco-amino glycans) deux fois plus faible (282). Pour trouver de nouveaux RMT, il serait intéressant d'identifier le mécanisme d'adressage des peptides qui ciblent le cerveau.

En 2002 Muruganandam et al ont criblé une librairie de phages enrichie en single domain antibody (sdAb) cérébraux par soustraction d'une librairie de sdAb de poumons dans le but de trouver de nouveaux récepteurs capables de franchir la BHE Figure 34. Après 4 tours d'affichage soustractif, et un passage dans un modèle de BHE vitro de Transwell® ensemencé avec des cellules endothéliales humaines (issues de résections de patients épileptiques), ils ont identifié 56 phages dont 16 avait une séquence VH entière.

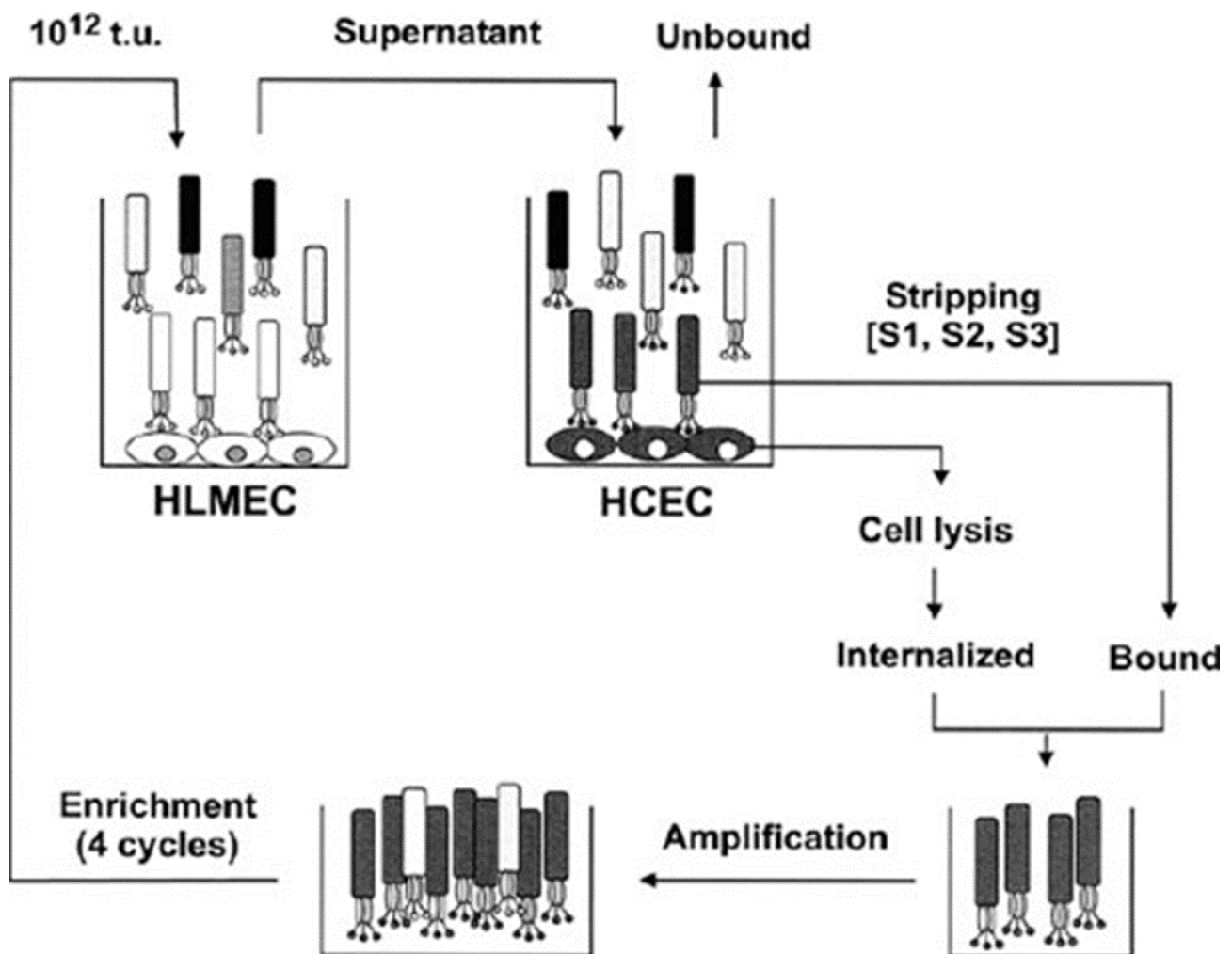


Figure 34: Protocole d'enrichissement d'une librairie de phages de sdAb de llama en anticorps sélectifs des cellules endothéliales cérébromicrovasculaires humaines (HCEC) (283).

La librairie (10^{12} PFU plaque forming units) a d'abord été appliquée aux cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires humaines pour soustraire les liants endothéliaux non spécifiques ; les phages non liés ont ensuite été appliqués aux cellules endothéliales microvasculaires

cérébrales. Les phages liés aux cellules endothéliales microvasculaires cérébrales ont été éliminés par trois lavages, et les phages internalisés ont été récupérés par lyse cellulaire. Chaque fraction internalisée a été analysée par PCR ; la fraction contenant le pourcentage le plus élevé de clones avec une séquence VH entière a été amplifiée. L'enrichissement s'est fait en quatre tours de sélection (283). Ces 16 phages correspondaient à deux séquences différentes nommées FC5 et FC44. Ils ont ensuite vérifié la capacité de FC5 et FC44 à atteindre le cerveau *in vivo* dans des souris injectées par iv caudale. L'exposition cérébrale des phages FC44 et FC5 était de $4,5 \pm 2,7$ % et $2,9 \pm 1,7$ % de la dose injectée/gramme de tissu, respectivement, contrairement à l'absorption cérébrale des phages de type sauvage ($<0,1$ %). De plus, l'absorption de FC5 et de FC44 par le tissu pulmonaire était significativement inférieure à celle des phages de type sauvage. Les reins et le foie, qui sont les voies d'élimination probables, contenaient des titres de phages élevés de FC44, FC5, et de type sauvage. L'identification de l'antigène reconnu par FC5 et FC44 est préliminaire à ce moment et aboutit à une protéine de 36 kDa reconnue par le FC44 (284) (283). En 2005, Abulrob et al. ont continué les efforts reportés par Muruganandam. Ils ont montré un transport polarisé apical vers basolatéral du FC5. Ils ont mis en évidence que le transport n'était pas impacté par des inhibiteurs de cavéoles et ils ont montré une colocalisation de FC5 avec les clathrines. Ils ont démontré que FC5 reconnaît la $\alpha(2,3)$ -sialoglycoprotéine et ne reconnaît pas le TFRC (285). Ces mêmes auteurs ont ensuite démontré que FC5 était capable de transporter de grosses molécules à travers la BHE. Ils ont ainsi validé le transport de HRP-IgG-cysF5 dans un modèle BHE *in vitro* de Transwell®ensemencé avec des cellules endothéliales microcapillaires cérébrales humaines. Dans cet article ils ont également amélioré l'efficacité de transport à travers la BHE en pentamérisant FC5 (286). Haqqani en 2013 écrit que le VHH FC5 reconnaît la protéine CDC50A (cell cycle control 50A) codée par le gène TMEM30A (267). Goulatis confirme que CDC50A est une $\alpha(2,3)$ -sialoglycoprotéine (36). Dans une étude publiée en 2016, Webster démontre une exposition cérébrale augmentée d'un anticorps bispécifique FC5/mGluR1 (287). Bien que cet anticorps ait les propriétés souhaitées pour le transport de la BHE, il s'est avéré sensible à la dégradation protéolytique, limitant ainsi son développement pour une utilisation clinique (288). Pour poursuivre ces travaux, Thom et al de Medimmune ont criblé trois bibliothèques de phages exprimant des Single-Chain Variable Fragment (scFv) humains. Le premier tour d'enrichissement a été réalisé sur des cellules de souris bend3 puis les deux tours suivants ont été réalisés pour sélectionner des phages scFv qui se lient aux bend3 en compétition avec l'anticorps FC5. Ils ont vérifié l'exposition cérébrale d'un de ces VHH dans un modèle murin de douleurs neuropathiques. Cela leur a permis d'identifier plusieurs nouveaux scFv fusionnés à des fragments Fc qui augmentent l'exposition cérébrale : les BBBt (288).

Récemment, Georgieva et al ont publié leurs résultats sur un criblage d'une librairie de phages scFv humains. Ils ont fait un enrichissement des cellules endothéliales de cerveau par rapport à celles de poumons et de cœur. Ils ont ensuite fait trois tours d'enrichissement sur un test d'internalisation dans des cellules endothéliales dérivées d'iPSC. Le dernier tour a été fait sur un modèle de transcytose de BHE *in vitro* avec ces mêmes cellules. Ils ont identifié des scFv qu'ils ont fusionnés avec un fragment Fc. Ils ont montré que ces anticorps sont cross réactifs humains / souris. Une heure après administration intraveineuse chez la souris à 20 mg/kg, la concentration cérébrale du clone 46,1 (8,1 nM, 0,72 % cerveau/plasma) était 26 fois plus élevée que le contrôle, et 9 fois plus élevée pour le clone 17 (2,8 nM, 0,28 % cerveau/plasma), respectivement. Ces niveaux d'absorption cérébrale sont comparables aux concentrations cérébrales précédemment rapportées pour les anticorps anti-transferrine modifiés (289). Ces résultats très encourageants suggèrent un possible mécanisme d'intérêt pour vectoriser des anticorps dans le cerveau. L'identification de la cible reste à réaliser pour pouvoir ensuite optimiser ce transport.

Thème	Auteurs	Année	Technique	Affichage	Espèce	Librairie	Matériel	Résultats
Librairies peptidiques	Pasqualini(276)	1996	Injection de 2 librairies de phages et enrichissement dans le cerveau et le rein	Phage	Souris	Peptides 10 ¹⁴ CX ₅₋₇ C/CX ₉ (pool I) 10 ¹⁶ X ₂ CX ₁₄ CX ₂ , X ₂ CX ₁₈ (pool II)	<i>In vivo</i>	Séquences peptidiques d'adressage au cerveau CLSSRLDAC et SRL.
	Van Rooy(277)	2010	Enrichissement de la librairie par perfusion intracardiaque de souris. Analyse du cerveau pour identifier les phages qui ont traversé la BHE. Les phages sont ensuite mis en contact avec des hCMEC/D3 ou des HUVEC	Phage	Souris Humain	Peptides 8,9 × 10 ¹¹ bibliothèque aléatoire de peptides de 3 à 15 acides aminés	Cerveaux de souris puis binding sur hCMEC/D3 vs HUVEC	2 peptides binder dans les cerveaux perfusés : GLAHSFSDFARDFVA et GYRPVHNIRGHWAPG
	Cho (290)	2010	Exposition d'une librairie de levures scFv humain avec un lysat de cellules RBE4 de rats dans différents détergents	Levure	Humain	Peptides 5 × 10 ⁷ clones d'une librairie scFv naïve humaine	Immunoprécipitation des levures pour identifier les protéines cibles des scFv	Vérification de la détection de TFRC, identification de TFRC et 3tO4
	Li (278)	2011	Injection par iv caudale à une souris d'une librairie de phages 12 mers. Prélèvement des cerveaux.	Phage	Souris	Peptides 10 ¹¹ librairie de peptides 12 mers : Ph.D.-12™ phage display library	Test sur bend3 et <i>in vivo</i> chez la souris	Séquence peptidique d'adressage au cerveau TGNYKALHPHNG
	Smith(279)	2012	Injection d'une librairie de phages à des rats. Après perfusion, le cerveau et d'autres organes sont prélevés les microcapillaires cérébraux sont prélevés et les 500 phages présents sont étudiés	Phage	Rat	Peptides 1.2 × 10 ⁹ The Ph.D.-C7C™ cyclized 7-mer disulphide constrained peptide-phage library	Cerveaux de rats	Séquence peptidique d'adressage au cerveau AC-SYTSSTM-CGGGS
	Majerova (280)	2020	Criblage d'une librairie peptidique 12 mers de phages sur des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de rats	Phage	Rat	Ph.D.-12™ Phage Display Peptide Library	Transcytose dans un modèle BHE <i>in vitro</i> avec des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de rats	2 peptides qui font de la transcytose : GLHTSATNLYLH et VAARTGEIYVPW
	Yamaguchi (281)	2020	Criblage d'une librairie peptidique cycliques de phages sur la transcytose à travers les hCMECD/3	Phage	Humains	Ph.D.™-C7C Phage Display Peptide Library	Transcytose dans un modèle BHE <i>in vitro</i> avec des hCMEC/D3 et des cellules endothéliales microvasculaires	heptapeptide cyclique SLSHSPQ

							cérébrales de rats et de singes confirmation <i>in vivo</i>	
	Zhang (282)	2022	Criblage d'une librairie peptidique de phage <i>in vivo</i> pour l'exposition cérébrale chez la souris puis pour la liaison avec AAV9	Phage	Souris	1×10^{11} pfu Ph.D.™-12 phage-display peptide library (E8110S)	<i>In vivo</i>	Séquence peptidique d'adressage au cerveau QFAALPVRAHYG-NH2
Librairies de fragments d'anticorps	Poul(291)	2000	Exposition de la librairie sur des cellules et récupération des phages à l'intérieur des cellules	Phage	Humain	10^{12} scFv humains	Lignée tumorale du sein SKBR3	2 scFv qui se lient à ERB2 1 scFv qui se lie à TFRC
	Thom(288)	2018	Criblage de 3 librairies de phages de scFv humain sur des cellules bend3 puis compétition avec l'anticorps FC5 pour trouver de nouveaux scFv	Phage	Souris	3 librairies de scFv humains	Modèle de souris avec douleurs neuropathiques	BBBt= scFv fusionné à des fragment Fc qui augmente l'exposition cérébrale
	Georgieva(289)	2020	Criblage d'une librairie de phages scFv humains sur cellules endothéliales de cœur et de poumon humains, puis sur BMEC dérivés d'iPSC dans un modèle de Transwell®	Phage	Humain	Librairie scFv humains	Modèle humain iPSC	3 Ac cross réactif humain souris, qui colocalisent avec le collagène IV spécifique de la membrane basale des cellules endothéliales mais leur cible est inconnue
	Muruganandam(284)	2001	Hybridation de (sdAb) cérébraux par soustraction d'une librairie de sdAb de poumons puis test pour les capacités de transcytose dans un modèle de BHE vitro	Phage	Humain	10^{12} single domain antibody de lama	Cellules endothéliales cérébrales humaines issues de résection de chirurgie	Ac FC5 qui reconnaît $\alpha(2,3)$ -sialoglycoprotéine et FC44 qui reconnaît une protéine de 36kDa
	Wang(273)	2007	Sélection de scFv qui se lient à la membrane plasmique des cellules endothéliales cérébrales	Levure	Rat	10^9 single-chaînes scFv humain d'anticorps synthétisée à partir d'ARNm de chaîne variable d'anticorps humain commercial	Rat brain endothelial cells RBE4	scFVA internalisé dans les cellules RBE4

Tableau 3: Etudes d'affichage par des phages ou des levures identifiant des peptides ou des fragments d'anticorps permettant un adressage cérébral.

Les techniques de display permettent donc d'identifier des cibles ou des fragments d'anticorps capables de franchir la BHE. Alors que plusieurs études ont identifié des séquences capables de pénétrer dans le cerveau, une seule a abouti à la découverte d'un nouveau mécanisme qui a pu démontrer son efficacité pour transporter des biothérapeutiques dans le cerveau.

1.3.3 Immunisation

Cette technique de production d'anticorps est appelée aussi technique des hybridomes. Elle est souvent utilisée lorsque la cible est connue et que l'on souhaite obtenir des anticorps dirigés contre cette cible. Elle pourrait être utilisée comme technique combinatoire avec du phage display pour identifier de nouvelles cibles, et sélectionner des anticorps dirigés contre des cibles inconnues à déconvoluer.

Pardridge et al en 1986 ont réalisé une expérience d'immunisation pour identifier les protéines spécifiques du cerveau. Ils ont immunisé un lapin avec des microcapillaires de cerveaux de bovins. Ils ont ensuite adsorbé ce sérum sur des tissus périphériques de foie et de rein pour éliminer les anticorps non spécifiques du cerveau. L'analyse du sérum restant a d'abord mis en évidence une protéine de 46kDa (292). Par la suite cette technique a été reprise de nombreuses fois. En 2002, Shusta décrit une méthode de clonage par expression d'anticorps soustractifs pour analyser l'expression différentielle de protéines de la microvascularisation cérébrale Figure 35. La 1^{ère} étape est celle de l'obtention d'un sérum polyclonal d'anticorps spécifique d'un tissu décrite par Pardridge. La seconde étape consiste en l'expression d'une banque d'ADNc spécifique du tissu à analyser (ici les microcapillaires cérébraux bovins) par des cellules de mammifères (cells being CV-1 (simian) in Origin, and carrying the SV40 genetic material : COS). Le sérum enrichi en anticorps spécifiques d'un organe est adsorbé sur les cellules exprimant les protéines spécifiques des microcapillaires bovins. Cette technique permet de mettre en évidence des protéines spécifiques de la microvascularisation cérébrales et notamment des protéines membranaires.

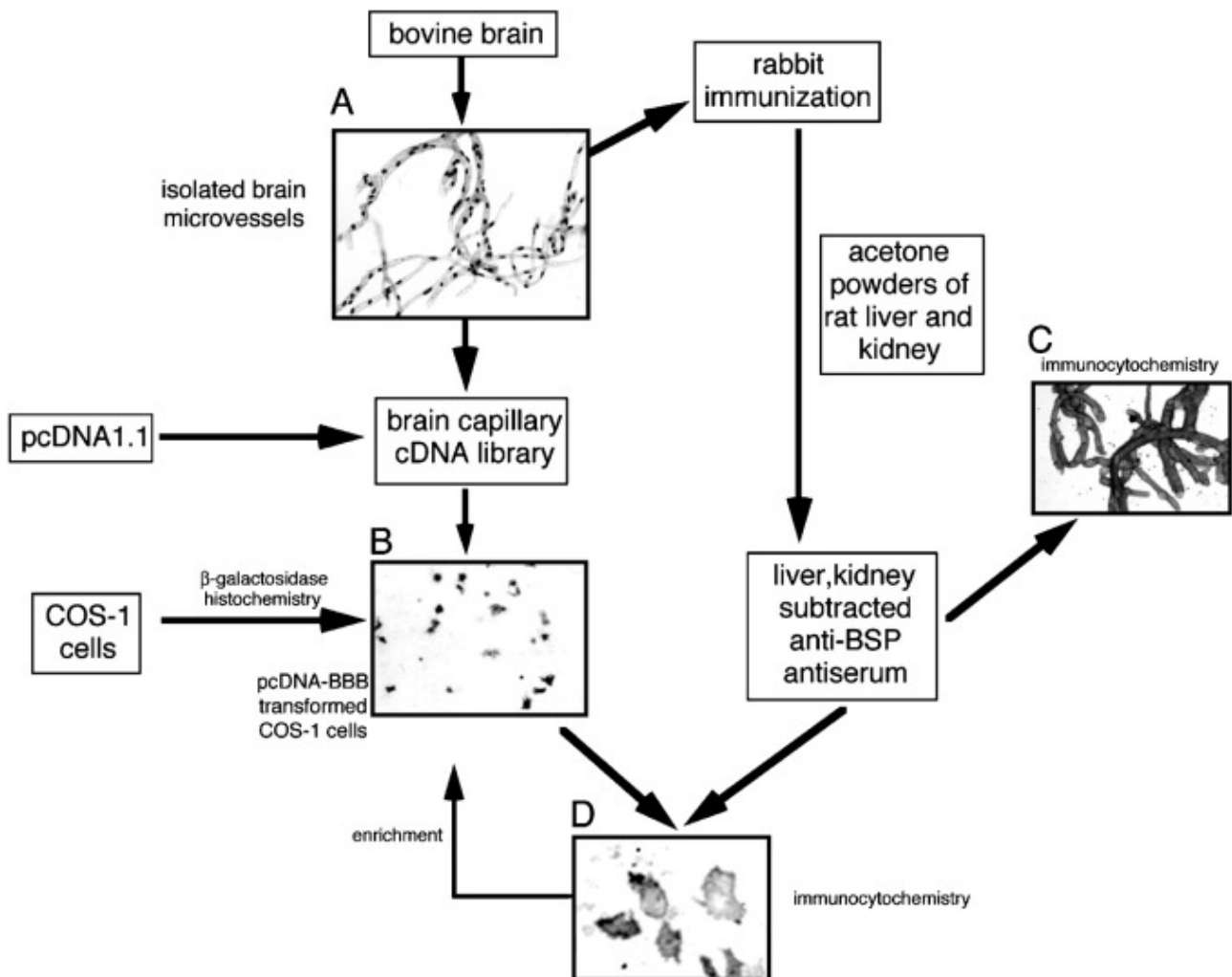


Figure 35 : Schéma du clonage par expression d'anticorps soustractifs. A : Microvaisseaux cérébraux bovins isolés. B : Sélection par β -galactosidase in situ des cellules COS-1 transfectées. C : Microvaisseaux bovins colorés avec de l'antisérum polyclonal enrichi en protéines endothéliales bovines. D : Cellules COS-1 positives en immunocytochimie transfectées avec la bibliothèque d'ADNc BHE bovin et marquées avec un sérum endothélial anti-bovin soustrait. BSP, protéine spécifique capillaire du cerveau (202).

Ils ont ainsi pu identifier la glycoprotéine luthérienne comme une protéine spécifique de la BHE en comparaison au foie ou aux reins dans lesquels elle est absente (293). Ils ont ainsi également identifié sept clones codant tous pour la protéine CD46 fortement exprimée sur la BHE. CD46 est un régulateur de l'activation du complément et est probablement un récepteur du virus de la rougeole (240). En 2003 Shusta décrit la découverte de la protéine Rho52 qui a interagi avec des IgG indépendamment de leur spécificité. Ro52/SS-A est un autoantigène impliqué dans le syndrome de Sjogren et le lupus érythémateux disséminé (294). Une revue de Shusta en 2005 récapitule ces expériences (295).

Agarwal et al en 2010 (296) continuent l'étude protéomique d'expression des protéines membranaires sur la BHE avec la technique d'enrichissement de Shusta. Ils ont amélioré la sélection par clonage d'expression en multiplex. Ils ont fait exprimer une banque d'ADNc enrichie de gènes spécifiques de la BHE par des cellules HEK. Ils ont sélectionné par FACS les cellules qui

se lie à un sérum polyclonal d'anticorps reconnaissant les protéines membranaires de la BHE. Après 4 tours de sélection, ils ont obtenu une sélection de 30 protéines exprimées de manière sélective sur la BHE. Les 30 transcrits ont été analysés sur des échantillons de cerveaux, cœur, foie, poumons et reins de bovins par microdissection laser et 5 protéines se sont avérées spécifiques de la membrane de la BHE : la glycoprotéine luthérienne, l'anhydrase carbonique IV (CAIV), la protéine de découplage 2 (UCP2), la podocalyxine et une protéine de la famille des transporteurs SLC38A5. La glycoprotéine luthérienne est impliquée dans la fixation des cellules endothéliales à la laminine présente dans la membrane basale (297). Des études antérieures avaient déjà confirmé l'enrichissement de la glycoprotéine luthérienne sur la BHE par rapport aux tissus hépatiques et rénaux de bovins (293). La séquence nucléotidique de la glycoprotéine luthérienne ayant une homologie de 79% entre le bovin et l'homme, Boado et al ont montré ensuite qu'elle est régulée à la hausse dans les vaisseaux tumoraux cérébraux humains (298). De nouvelles protéines sont identifiées comme l'anhydrase carbonique IV qui est impliquée dans la synthèse du LCR. Elle est décrite dans cette étude comme étant spécifique de la surface luminale des cellules endothéliales de la BHE dans le cerveau de rats et de souris (269). PODXL a également été trouvée exprimée dans les cellules endothéliales vasculaires de tous les organes (268). Elle est détectée par l'anticorps G278 dans le cœur et les poumons (272). Elle provoque une relocalisation des protéines de jonction serrée, quand elle est surexprimée dans les cellules épithéliales MDCK (299). UCP2 est une protéine de découplage mitochondrial. Les neurones producteurs sont les cibles des hormones périphériques, comme la leptine et les stéroïdes gonadiques. Elle permet la production de chaleur (300). UCP2 a des propriétés neuroprotectrices après une ischémie cérébrale en limitant l'entrée de calcium et l'accumulation de ROS (reactive oxygen species) dans les mitochondries (301) (302). Ainsi, le clonage de l'UCP2 au niveau de la BHE et sa sélectivité modérée par rapport aux lits vasculaires périphériques suggèrent un rôle dans la réponse au stress cérébral mais elle serait plus spécifique des neurones et non des cellules endothéliales. Enfin, la protéine membranaire la plus sélective de la BHE identifiée était le transporteur d'acides aminés (glutamine, asparagine et histidine) SLC38A5 (SNAT5). Un transcrit de 2,2 kb de SLC38A5 est abondant dans le cerveau et les poumons humains, tandis qu'un transcrit plus grand de 2,6 kb est exprimé dans le foie et dans les reins. Auparavant, il n'a été décrit que dans le cerveau, SLC38A5 est réparti de façon hétérogène selon les régions. Il est plus exprimé dans le néocortex, l'hippocampe ou le striatum où est également exprimé Glut1. Au niveau cellulaire SNAT5 est exprimé dans les astrocytes (303). Très récemment, SNAT5 s'est avéré être l'une des protéines les plus fortement exprimées dans les cellules endothéliales du cerveau fraîchement isolées et purifiées. Cela en fait un biomarqueur potentiel de la BHE (225) (296).

La publication la plus récente utilisant l'immunisation est celle de Lajoie et al (304). Ils ont immunisé des lamproies avec des membranes plasmiques de cellules endothéliales de souris obtenues par lyse hypotonique, sonication et centrifugation de microvaisseaux. Ils ont récupéré les leucocytes des plasmas des lamproies immunisées. Avec des primers spécifiques des VLR (variable lymphocytes récepteurs), ils ont introduit le répertoire des VLR dans des levures pour faire une banque immune. Ils ont enrichi la banque avec deux tours de liaison sur les membranes plasmique de microvaisseaux de souris. Ils ont sélectionné les levures qui se lient aux bend3 et ils ont fusionné les VLR à des fragments Fc d'anticorps. Ils ont inclus avant chaque tour une soustraction sur la matrice extracellulaire de la BBB et ont sélectionné les non-binders. Avec les anticorps sélectionnés, ils ont fait des marquages sur bend3 et sur des coupes de cerveaux souris et humains. Ils ont fait de l'internalisation à 4°C et 37°C dans les bend3. Ils ont utilisé des inhibiteurs de la voie des cavéolines ou des clathrines et montrent que VLR-Fc-11 et VLR-Fc-46 sont internalisés en utilisant la voie des cavéolines tandis que VLR-Fc-30 est internalisé en utilisant la voie des clathrines. Les VLR-Fcs ont été évaluées à l'aide du microréseau de glycane du Consortium for Functional Glycomics (CFG) qui comprend 600 glycanes de mammifères validés. Ils utilisent une sialidase qui enlève les résidus terminaux des acides sialiques des glycanes et montrent une diminution de la liaison des VLR-Fc 11 et 46 contrairement à la liaison du VLR-Fc-30 qui est moins diminuée. Cela suggère que VLR-Fc 11 et 46 reconnaissent des glycanes à la surface des cellules. Par un test de binding compétitif avec TFRC, IR et LDLR, ils montrent que les VLR ne reconnaissent pas ces récepteurs. Ils ont injecté les VLR-Fc 11 30 46 et 192 à des souris à 10mg/kg en intra-veineux et ont perfusé les souris au PBS après une heure. Ils montrent une coloration des vaisseaux cérébraux et aucune coloration des vaisseaux périphériques. Ils font de la microscopie électronique avec des billes immunogold et montrent que la cible des VLR-Fc est du côté luminal des cellules. Pour prouver que les VLR vont dans le parenchyme et ne restent pas dans les vaisseaux, ils utilisent le VLR-Fc-30 qui montre un marquage des neurones et ils quantifient le nombre de cellules marquées. 12% des cellules sont marquées avec le VLR-Fc-30 et 2% avec l'isotype. L'auteur souligne l'importance du glycocalix de la BHE car beaucoup de protéines reconnaissent des glycanes comme le FC5. Les glycanes sont espèce dépendants, il faut donc anticiper des difficultés de translabilité à l'homme (304). Cette stratégie par immunisation aboutit à des VLR-Fc capables de franchir la BHE.

Auteurs	Année	Technique	Espèce	Matériel	Protéines identifiées / Résultats
Shusta(293)	2002	cDNA de microcapillaires cérébraux bovins Immunocytochimie	Bovin	Microvaisseaux cérébraux	Glycoprotéine luthérienne
Shusta(240)	2002	cDNA de microcapillaires cérébraux bovins Immunocytochimie Northern Blot	Bovin	Microvaisseaux cérébraux	CD46
Shusta(294)	2003	cDNA de microcapillaires cérébraux bovins Immunocytochimie	Bovin	Microvaisseaux cérébraux	Rho52
Boado(298)	2000	cDNA de microcapillaires cérébraux bovins Immunocytochimie Northern Blot	Humain	Microvaisseaux sains et tumoraux d'autopsie de patients	Glycoprotéine luthérienne
Agarwal(296)	2010	Sélection de protéines par un antiserum d'anticorps polyclonaux BHE membrane protein-specific polyclonal antiserum (BMSPA)	Bovin	Banque d'ADNc enrichis sur la BHE exprimé dans HEK puis microdissection laser de cerveaux, cœur, foie poumons et reins de bovins	Glycoprotéine luthérienne, anhydrase carbonique IV (CAIV), UCP2, PODXL, SLC38A5
Lajoie (304)	2022	Immunsation de lamproies avec des membranes de cellules endothéliales cérébrales de souris	Souris	Banque immune de VLR (variable lymphocytes récepteur) fusionnée avec un fragment Fc	3 VLR-Fc passe la BHE en reconnaissant des glycans

Tableau 4 : Etude combinatoire d'immunisation suivie d'une hybridation soustractive. Identifications de protéines enrichies sur la BHE

Pour conclure sur l'ensemble des études présentées dans ce chapitre, seules deux approches ont permis l'identification d'un nouveau mécanisme de transcytose dans le cerveau permettant d'y entraîner des biothérapeutiques. D'une part, une étude combinatoire transcriptomique et protéomique, qui a permis d'identifier la protéine CD98 comme cible d'anticorps qui améliorent l'exposition cérébrale, d'autre part, l'identification de sdAb FC5 (qui reconnaît la protéine CDC50A codée par le gène TMEM30A (36)) par l'exploration d'une librairie naïve de phages sdAb sélective du cerveau par comparaison aux poumons puis triée pour les capacités de transcytose dans un modèle de BHE *vitro*.

2 Objectif : application de différentes stratégies pour identifier de nouveaux récepteurs capables de médier la transcytose à travers la BHE

A travers tous ces efforts décrits dans la littérature nous pouvons déduire qu'il existe toujours un fort besoin de franchir la BHE avec des biothérapeutiques sans toutefois maîtriser de réelles solutions pour le faire.

Mon travail de doctorat a consisté en la recherche de nouveaux récepteurs capables de faire de la transcytose. Après avoir mis en place des modèles *in vitro* de BHE pertinents, nous avons convenu de deux stratégies distinctes pour tenter de trouver des nouveaux RMT. La première stratégie découle de l'étude transcriptomique réalisée dans le cadre du COMPACT (IMI 2012-2017) qui a abouti à l'étude d'Integral Membrane protein 2A (ITM2A). La seconde stratégie est l'immunisation de souris avec des cellules endothéliales de singes et l'étude des anticorps produits.

3 Travaux expérimentaux

3.1 Cellules endothéliales et modèles de BHE *in vitro*

Pour étudier le passage d'anticorps à travers la BHE, nous avons commencé par mettre en place des modèles de BHE *in vitro*. La première étape a été d'isoler et de caractériser des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales. Nous avons isolé des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines et de singes. Les modèles statiques ont ensuite tous été développés dans des Transwell® (305), tandis qu'un modèle dynamique : Mimetas, a été évalué (134).

3.1.1 Introduction

Notre objectif a été double. D'une part, l'obtention de cellules endothéliales humaines de bonne qualité, en grand nombre, pour pouvoir réaliser la suite de nos objectifs, comme les expériences d'immunisation. D'autre part, des modèles de transcytose, idéalement humains pour valider nos hypothèses de travail. Nous détaillerons dans ce chapitre notre travail d'isolement et de caractérisation de cellules endothéliales primaires humaines de cerveau, le développement d'un modèle alternatif de transcytose avec des cellules primaires de primate et les modèles que nous avons montés avec ces cellules ou les lignées disponibles. Nous avons essentiellement travaillé avec des modèles en Transwell® ou OrganoPlate. Pour le modèle Transwell® nous avons utilisé plusieurs modes opératoires (direct ou de *pulse-chase* que nous détaillerons également). L'objectif de la mise en place de ces modèles de BHE *in vitro* était aussi d'évaluer la capacité d'anticorps, générés en interne ou commerciaux, à faire de la transcytose à travers des cellules endothéliales.

3.1.2 Matériels et Méthodes

3.1.2.1 Ethique animale

Les expériences ont été réalisées chez Sanofi dans notre établissement accrédité par l'Association pour l'évaluation et l'accréditation des soins aux animaux de laboratoire (AAALAC) en conformité avec les normes de soins et d'utilisation des animaux de laboratoire, selon la législation de la Communauté française et européenne (Directive 2010/63/UE). Toutes les procédures ont été approuvées par le comité local d'éthique animale (Comité d'éthique de l'expérimentation animale [CEEA] n°24 et n°21), des centres de recherche Sanofi, Vitry-Alfortville et Chilly Mazarin, France, et le ministère français de la Recherche.

3.1.2.2 Animaux

Des singes cynomolgus (*Macaca fascicularis*) mâles et femelles utilisés pour l'isolement des microvaisseaux cérébraux étaient à disposition à la suite d'études précliniques. Ce sont des animaux réformés qui ont été soumis à une période de sevrage d'au moins 1 mois avant l'isolement des microvaisseaux corticaux cérébraux. Toutefois, il faut noter que les éventuels effets des traitements administrés à ces animaux sur les cellules endothéliales ne sont pas évalués.

Les souris mâles C57BL6/J âgées de 6 à 8 semaines ont été achetées aux Laboratoires Charles River (France). Les souris gestantes C57BL/6JRj et les rattes Sprague Dawley ont été achetées chez Janvier Lab (France) entre E10 et E12. Après leur arrivée, les rongeurs ont été hébergés individuellement (pour les animaux gestants) ou regroupés (pour les mâles, six animaux par cage) dans un environnement enrichi, dans une installation sans agent pathogène à une température constante de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité ($50 \pm 10 \%$) sur un cycle lumière/obscurité de 12 h avec accès ad libitum à la nourriture et à l'eau.

3.1.2.3 Cerveaux humains

Nous avons collaboré avec la Netherland Brain Biobank pour obtenir des cerveaux humains de patients décédés ayant signé un consentement de dons d'organes de leur vivant. Nous avons établi une série de critères d'exclusion en fonction de l'âge et des pathologies. Nous avons établi des critères d'exclusion sur le postulat d'avoir une BHE saine dans les échantillons. Nous avons donc exclu les cerveaux avec des propriétés de perméabilité de la BHE affectées par l'âge (306,307), la présence de pathologies telle l'ischémie (191,308,309), l'épilepsie (35), les maladies neurodégénératives (Alzheimer, Parkinson, démence vasculaire, la sclérose amyotrophique latérale) (7,114,197,309,310), la sclérose en plaques (309,311), les infections notamment aux méningocoques (312–315), les cancers primitifs ou métastatiques (141,230,316–319), les traumatismes crâniens (309), les migraines sévères (320), les diabètes mal contrôlés (321), l'hypertension artérielle non contrôlée (322), certains désordres psychiatriques majeurs comme la schizophrénie (323), ou enfin du tissu cicatriciel suite à une précédente opération de neurochirurgie (309). Le décès d'un patient déclenchait un processus au cours duquel en fonction de l'heure et de notre logistique interne un échantillon de cerveau cortical était prélevé et acheminé à Chilly-Mazarin par un transport ultra rapide. Nous avons ainsi pu obtenir trois prélèvements (environ 100g chacun) de cerveaux humains frais dans des délais post-mortem inférieur à 24h et conformes à nos critères.

Nous avons également établi un contrat avec Fidelis, une entreprise bulgare qui pouvait accéder à des cerveaux humains avec des délais post-mortem très courts et à laquelle nous avons transféré notre protocole d'isolement et de culture.

Les contrats avec ces deux entreprises sont établis via la plateforme « science exchange » qui vérifie l'agrément à fournir des échantillons humains. Le travail avec du matériel humain est très encadré. Pour obtenir ce matériel, nous avons d'abord suivi une formation avec le service juridique de Sanofi concernant l'obtention et l'utilisation d'échantillons biologiques humains.

3.1.2.4 Cellules

3.1.2.4.1 Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de singes primaires

Les cerveaux de singes *Cynomolgus* ou de souris sont collectés peu de temps après l'euthanasie de l'animal dans un milieu Hibernate A glacé (ThermoFisher). Pour les cerveaux humains, les délais post-mortem étaient d'environ 24h. Toutes les étapes suivantes ont été effectuées à 4 °C et sous une enceinte de sécurité biologique. Notamment en laboratoire L2+ pour les échantillons humains. Le cortex cérébral est isolé et placé dans des boîtes de Pétri contenant du Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) glacé. Les méninges et la substance blanche corticale sont enlevées. Les tissus collectés sont transférés dans un nouveau tube stérile avec HBSS, finement hachés avec un scalpel, puis sédimentés par centrifugation (5 min à 600 g, 4°C). Le culot est remis en suspension dans une solution de collagénase/dispase® (Roche, Collagénase 0,1 U/mL ; Dispase 0,8 U/mL préparée en Ca²⁺/Mg²⁺ free HBSS) contenant de la DNase de type I à 20 U/mL et Tosyl-L-lysyl-Chloromethane Hydrochloride (TLCK) à 0,15 µg/mL, et incubé à 37°C pendant 60 min, sous agitation vigoureuse. Le tissu digéré est homogénéisé et centrifugé pendant 5 min à 600 g, 4°C. Le culot obtenu est remis en suspension dans du HBSS contenant 20 % de Bovine Serum Albumin (BSA) et est centrifugé pendant 30 min à 2000 g, 4°C. Les surnageants contenant un anneau de myéline sont jetés et le culot contenant les microvaisseaux est remis en suspension et réincubé dans la solution de collagénase/dispase® en présence de DNase et de TLCK pendant 30 min à 37°C. Après centrifugation (5 min à 600 g, 4°C), le culot final (appelé fraction P0D0) est resuspendu dans du milieu de cellules endothéliales Endothelial Basal Medium (EBM-2 complété par le Kit EGM-2 MV SingleQuots, Lonza) contenant 3 µg/mL de puromycine, puisensemencé dans des flasks de culture cellulaire pré-coatées (collagène IV 100 µg/mL, fibronectine 10 µg/mL, Sigma) et incubé à 37°C, 5% CO₂ pendant 7 jours. Tous les deux jours, le milieu cellulaire est changé et la concentration de puromycine diminuée à 2 µg/mL, puis retirée. Après 7 jours d'expansion à P0D7, les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sont passées (ou congelées) et recultivées pendant 7 jours (P1D7).

3.1.2.4.2 Cellules endothéliales commerciales

Trois sources de cellules endothéliales primaires humaines commerciales ont été testées : ACBRI376V Clinisciences (Cell system), H6023 Clinisciences (cell biologics) et 1000 Sciencell (Science cell). Elles ont été mises en culture en respectant les conditions expérimentales décrites par le fournisseur.

La lignée hCMEC/D3 a été achetée chez Cedarlane et est cultivée dans du milieu human endothelial cell basal medium (cell biologics H1168) supplémenté avec Endothelial Cell Growth Supplement

(cell biologics 1166) sur des surfaces coatées au collagène IV 100 µg/mL, et fibronectine 10 µg/mL. Les cellules sont utilisées jusqu'à 30 passages.

La lignée Huvec a été achetée chez Lonza Lot 0000296747. Elles sont cultivées dans le milieu EBM2 CC-3156 supplémenté avec les SingleQuots™ Supplements EGM2 CC-4176.

3.1.2.4.3 Cellules astrocytaires de rats

Les astrocytes sont obtenus à partir d'embryons de rats âgés de E16 ou plus. La dissection est réalisée dans du Phosphate-Buffered Saline (PBS) sans Ca²⁺ ni Mg²⁺ additionnés avec 30% de glucose (Merck, G8644). Les cerveaux sont prélevés et les méninges sont enlevées. Les deux hémisphères sont détachées du tronc cérébral et les striatum et hippocampes sont retirés. Les hémisphères sont digérées à la trypsine (2,5 mg/mL, Merck T8003 dans du PBS glucose) 10mn à 37°C. La digestion est stoppée par l'inhibiteur de trypsine (Merck, T6414 à 4 mg/mL) préparé avec de la DNase (Merck, D5025 à 1 mg/mL). Les tissus sont dissociés à la pipette et lavés deux fois dans du PBS glucose par centrifugation de 5 mn à 200g. Le culot est resuspendu à 10⁵ cellules/cm² dans du DMEM / F12 (Thermofisher 11330057) supplémenté en glucose 33 mM et 10% de sérum foetal bovin. Les cellules sontensemencées sur des surfaces préalablement coatées à la poly-L-ornithine (Merck P4957) 1h à 37°C. Une fois à confluence, les cellules sont rincées au PBS, décollées à la trypsine (Lonza CC-5012) et congelées dans une solution de SVF 10% DMSO (Merck, D2650) à une densité de 10⁶ cellules/mL.

3.1.2.5 Ensemencement des modèles de BHE *in vitro*

Pour le modèle Brainplotting™, tous les échantillons humains ont été fournis par Brainplotting™ (iPEPS, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Hôpital Universitaire de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France) en partenariat avec l'Hôpital Sainte-Anne, Paris (neurochirurgien Dr Johan Pallud) et récoltés pendant des chirurgies de résection tumorale programmées avec consentement éclairé écrit des patients (numéro d'autorisation CODECOH DC-2014-2229). Des microvaisseaux cérébraux humains ont été obtenus à partir de résections chirurgicales de plusieurs patients souffrant d'un gliome oligo-astrocytaire diffus. Les microvaisseaux ont été isolés du tissu cérébral péri-tumoral ou sain à l'aide d'une procédure enzymatique adaptant les méthodes précédemment publiées pour les rats (91,324). En bref, les échantillons de tissus ont été soigneusement nettoyés des méninges et de l'excès de sang ; ensuite, un mélange enzymatique a été utilisé pour dissocier les tissus et les microvaisseaux ont été isolés par rétention sur une maille de 10 µm. Les cellules ont été cultivées dans du milieu EBM-2 (Lonza) additionné de 20 % de sérum bovin et d'antibiotiques (penicilline, 100 U/mL; streptomycine, 100 µg/mL). Après avoir ensemencé les capillaires cérébraux dans des boîtes de Pétri coatées avec du collagen type IV (5 µg/cm²), la puromycine est ajoutée pour deux jours à 3µg/mL puis, sa concentration est diminuée progressivement et remplacée par

du *fibroblast growth factor* (2 ng/mL) et de l'hydrocortisone (500 ng/mL). Les cellules endothéliales microvasculaires primaires du cerveau ont été rapidement amplifiées etensemencées (P1) sur Transwell® (filtres en polycarbonate Corning Transwell® 3401, diamètre des pores 0,4 µm ; 1,12cm²) en monoculture.

Pour le modèle PharmaCo-Cell®, les cellules sont préparées en suivant les instructions fournies par le fournisseur du kit MBT24h Monkey BBB. En bref, des modèles de tri-culture avec des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de singes, des péricytes et des astrocytes ont été décongelés dans des milieux préchauffés fournis dans le kit. Après 1h puis 24h le milieu est changé. Le TEER est mesuré quatre jours après décongélation et le test de transcytose est réalisé un jour plus tard.

Pour les modèles de co-culture, les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales dérivées des primates non-humains (NHP) sontensemencées sur des plaques Transwell® à 12 puits (filtres en polycarbonate Corning Transwell® 3401, diamètre des pores 0,4 µm ; 1,12 cm²), préalablement recouverts de collagène IV/fibronectine (Sigma) à une densité de 60 000 cellules/puits en milieu EBM-2 supplémenté. A l'ensemencement, les Transwell@s recouverts de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sont placés dans des plaques sans autre type de cellules (monoculture), ou avec des astrocytes primaires de rat (80 000 cellules/puits)ensemencés au fond de la plaque 4 jours auparavant, dans MEMα/ Milieu cellulaire F-12 (1:1), 10 % de FBS, 1 % de PSN et 5 ng/mL de βFGF. Toutes les expériences de transcytose ont lieu après 4 jours ou 7 jours en monoculture ou en co-culture.

Pour le modèle de Mimetas, les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales sontensemencées selon les instructions du constructeur de l'OrganoPlate. Les images des puces sont acquises avec le microscope à fluorescence Evos de Thermofisher.

3.1.2.6 Mesure du TEER

Le TEER est mesuré sur des monocouches de cellules endothéliales microvasculaires cérébralesensemencées sur des filtres Transwell®. La résistance est enregistrée en utilisant un voltohmmètre épithélial EVOM2 couplé à une chambre (ENDOHM-12G) (World Precision Instruments, Hitchin, Hertfordshire, Royaume-Uni). Les valeurs de TEER sont données en Ω.cm² après soustraction d'une mesure de Transwell® nonensemencé et multiplication par 1,12 cm² pour tenir compte de la surface du Transwell® (Costar 3401).

3.1.2.7 Caractérisation des cellules par qPCR

Des culots cellulaires congelés provenant des fractions cellulaires microvaisseaux P0D0 (cortex), ou des cultures de cellules après des passage PxJx ou Px Dx sont lysés à l'aide de QIAzol Lysis

Reagent (Qiagen, #79306). L'ARN total a ensuite été isolé des lysats sur un instrument QIAcube (Qiagen) en utilisant le kit RNeasy Mini QIAcube (Qiagen, 74116) et en suivant les instructions du fabricant. La concentration d'ARN est déterminée à l'aide du kit Qubit RNA HS Assay (Invitrogen, Q32852) et la qualité et l'intégrité sont évaluées sur un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology) avec un kit Agilent RNA 6000 nano (Agilent Technology, 5067- 1511). La transcription inverse (RT) est réalisée à partir de 250 ng d'ARNm avec le kit de transcription inverse d'ADNc haute capacité d'AppliedBiosystem 4368813. La qPCR est réalisée à partir d'ADNc dilué au 1/20 en utilisant QuantStudio™ 7 dans 384 puits avec le mode standard du système TaqMan et en suivant les instructions du fabricant. Les amorces et les sondes Taqman ont été achetées chez thermofisher Scientific Inventoryed assay 4331182, *Itm2a*: Mm00515208_m1, *Actb*: Mm01205647_g1, *Gapdh*: Mm99999915_g1, *Pecam 1*: Mm01242576_m1, *Tfrc*: Mm00441941_m1, *Pdgfrβ*: Mm00435553_m1, *Cldn5*: Mm00727012_s1, *Aif1*: Mm00479862_g1, *Occludin*: Mm00500912_m1, *Abcb1*: Mm00440761_m1, *PDGFRβ*: Hs00966522_m1 ou Hs0109589_m1 et Mf02842795_m1, *GFAP*: Hs00909233_m1, *PECAM1*: Hs01065279_m1 et Mf02805562_m1, *TBP*: Hs00427620_m1, *ABCG2*: Hs01053790_m1 et Mf02788842_m1, *CLDN5*: Hs00533949_s1 et Mf00533949_s1, *AIF1*: Hs00610419_g1 et Mf00357551_g1, *ACTB*: Hs01060665_g1 et Mf04354341_g1, *ABCB1*: Mf02912805_g1, *TFRC*: Mf00951078_m1, *GAPDH*: Mf04392546_g1. Les données brutes ont été analysées avec le logiciel de PCR en temps réel QuantStudio™.

3.1.2.8 Marquages immunofluorescents

Les cellules cultivées sont fixées dans du paraformaldéhyde à 4 % ou à l'éthanol absolu pour les inserts Brainplotting™ pendant 15 min, à température ambiante, puis perméabilisées et bloquées dans du tampon bloquant Odyssey LiCor contenant 0,2 % de Triton X-100. Les anticorps primaires ont été incubés une nuit à 4°C (Anti-Claudin 5 clone 4C3C2 Thermofisher 35-2500 au 1:200 ; Anti-ZO-1 Thermofisher 61-7300 au 1:200; Anti-Occludin clone OC-3F10 Thermofisher 33-1500 au 1:100; Anti-VE Cadherin Polyclonal ab33168 Abcam au 1:500), et des anticorps secondaires appropriés conjugués avec des fluorophores Alexa (Invitrogen) et Hoechst 33432 (Invitrogen) pour la coloration des noyaux ont ensuite été utilisés pendant 2h à température ambiante. Les images ont été acquises sur un système Perkin Elmer Operetta CLS.

3.1.2.9 Test de transport

3.1.2.9.1 « Pulse-chase »

Des essais de transport en « pulse-chase » sont effectués avec des cellules non jointives telles que hCMEC/D3 ou des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de singes avec une mesure TEER < 150 Ω.cm². La première étape est le « pulse » où des anticorps cibles (1 µg/mL) sont ajoutés dans le milieu en apical au jour 4. Le milieu est changé en basolatéral et les astrocytes sont

retirés. Après 2h à 37°C, 3 lavages avec du PBS sont effectués. La deuxième étape était le « *chase* » à 37°C où le milieu est remplacé par un milieu neuf sans anticorps. Les aliquots des deux compartiments apicaux et basolatéraux sont prélevés 4 h après l'incubation à 37 °C, 5 % de CO₂. Les membranes Transwell® sont lavées 3 fois avec du PBS, retirées avec un scalpel et congelées avec 200 µl d'eau distillée pour lyser les cellules après 3 cycles de congélation/décongélation. Les quantités d'anticorps dans les cellules, les compartiments luminaux et basolatéraux sont déterminés par dosage Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) MSD (MESOQuickPlex SQ120, MesoScale Discovery). Le classement relatif des anticorps en fonction de leur capacité à faire de la transcytose dans ce modèle est obtenu en calculant le ratio « *pulse-chase* » PC_R :

$$PC_R = \frac{Q_{\text{basolatéral}}}{Q_{\text{total}}}$$

Où Q_{basolatéral} = quantité d'anticorps en ng mesurée dans le compartiment basolatéral, Q_{total} = quantité d'anticorps en ng mesurée dans les cellules et dans les compartiments apicaux et basolatéraux.

Les valeurs aberrantes sont éliminées si Q_{total} est inférieur à 10 % de la médiane de la quantité totale des échantillons de toutes les expériences.

3.1.2.9.2 Transcytose Classique

Le milieu contenant les anticorps cibles ou contrôles sont ajoutés dans les compartiments apicaux à 1 µg/mL le jour du test de transport. Du milieu neuf est ajouté dans le compartiment basolatéral. Les aliquots finaux des deux compartiments sont prélevés 240 min après l'incubation à 37°C, 5 % de CO₂. Les quantités d'anticorps dans les solutions mères (T = 0 min) et le compartiment basolatéral (T = 240 min) sont déterminés par dosage ELISA MSD (MESOQuickPlex SQ120, MesoScale Discovery). La perméabilité apparente (P_{app}) est calculée à l'aide de la formule suivante en cm.min⁻¹ :

$$P_{app} = \left(\frac{V \times C_{\text{abluminal}}}{A \times C_{\text{luminal}} \times t} \right)$$

où V = volume de milieu dans le compartiment basolatéral (mL), A = surface de l'insert (cm²), C_{luminal} = concentration en anticorps dans le compartiment apical à T=0h (µM), C_{abluminal} = concentration en anticorps mesurée dans le compartiment basolatéral (µM) ; t = temps du dosage (min).

3.1.2.10 Dosages ELISA

Des plaques 96 puits vierges de MSD sont coatées avec 0,5 µg/mL d'IgG Fab'2 anti-humain (709-006-098 JacksonImmuno) ou anti-souris (M0284 Sigma-aldrich) dans du PBS puis incubées pendant 1 h sous agitation à température ambiante. Après incubation, les plaques sont lavées trois

fois avec du PBS-Tween 0,05 % (Calbiochem, 524653) et bloquées pendant 1 h à température ambiante avec une solution de BSA à 0,1 % (A7030, Sigma). Après blocage des plaques, les échantillons collectés dans le test de transport et les standards sont incubés sur les plaques pendant 2 h à température ambiante. Après incubation, les plaques sont lavées trois fois avec du PBS-Tween à 0,05 % et l'anticorps lié est détecté avec un anticorps de chèvre anti-espèce conjugué à un SULFO-TAG (R32AC-1, Meso Scale Discovery) en utilisant du tampon de lecture contenant de la tripropylamine (R92TC-2, Meso Scale Discovery). Les concentrations ont été déterminées à partir d'une gamme étalon des anticorps testés en utilisant un programme de régression non linéaire à quatre paramètres (logiciel Discovery Workbench version 4.0).

3.1.3 Résultats

Dans un premier temps, nous avons isolé et caractérisé des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines puis de singes *Macaca fascicularis* et de souris. Nous avons également utilisé la lignée humaine hCMEC/D3 (93) et nous avons évalué la possibilité d'utiliser des cellules primaires humaines commerciales. Nous avons ensuite développé des modèles de BHE statiques selon deux modes de transport différents mais toujours avec l'utilisation de Transwell® (4,95,115). Le premier est un modèle de transcytose classique quand les cellules utilisées sont jointives avec une mesure de TEER > 150 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Ces expériences permettent de calculer une perméabilité apparente pour un anticorps cible, à comparer avec un anticorps contrôle appartenant à un isotype d'espèce différente (109). Le second est un modèle de « pulse-chase » qui permet de s'affranchir du passage paracellulaire lorsque les cellules utilisées sont peu jointives et que la mesure du TEER < 150 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (195). Nous avons également évalué un modèle dynamique pour essayer de tenir compte de la contrainte de cisaillement sur les cellules (134).

3.1.3.1 Isolement et caractérisation des cellules endothéliales primaires cérébrales

3.1.3.1.1 Cellules primaires endothéliales microvasculaires cérébrales humaines

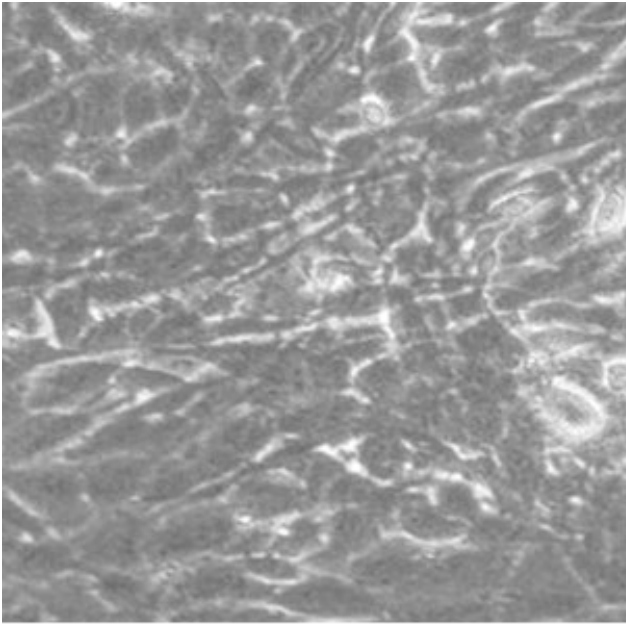
Nous souhaitons disposer d'une quantité importante (aux alentours de $200 \cdot 10^6$) de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales primaires humaines pour pouvoir ensuite procéder à nos expériences d'immunisation. Il existe des sources commerciales de ces cellules que nous avons évalué ci-dessous mais leur coût n'étant pas négligeable, nous avons décidé dans un premier temps de les isoler et de les préparer nous-mêmes. Pour cela, il fallait trouver des échantillons de cerveaux humains, soit provenant de patients décédés (209,213,325), soit provenant de patients opérés du cerveau, pour des résections de zones épileptiques ou de glioblastomes (202,206–208,214,217,219,229). Cette seconde possibilité nous semblait présenter un risque d'accéder à des tissus potentiellement contaminés par du tissu endommagé ou trop perméable, nous nous sommes donc tournés vers l'obtention de cerveaux post-mortem.

Un critère fondamental pour l'obtention et la mise en culture de ces cellules endothéliales est le délai qui doit être le plus court possible d'une part entre le décès et le prélèvement et d'autre part entre l'obtention des cellules et leur mise en culture qui ne doit pas excéder 24h après le prélèvement (critère établi en interne sur des expériences avec des cerveaux de singes). L'idéal étant un temps inférieur à 4h (326). Nous avons ensuite contacté un grand nombre d'organismes ou hôpitaux publics ou privés avec l'aide du médecin référent en interne. Il s'est très rapidement avéré qu'il est difficile voire impossible d'accéder en France, vu les formalités administratives notamment, à des cerveaux dont les délais post-mortem seraient inférieurs à 48h. Notre département étant localisé en région parisienne et aux Etats-Unis, nous avons exploré également les possibilités via des organismes basés aux US mais là non plus l'obtention de cerveaux sains dans des délais inférieurs à 48h ne s'est pas avérée possible. Nous nous sommes alors adressés aux réseaux de biobanques européennes (Biobanking and BioMolecular resources Research Infrastructure BBMRI), Banner Health Institute, Brain Bank Madrid, King's College, Netherland Brain Biobank.

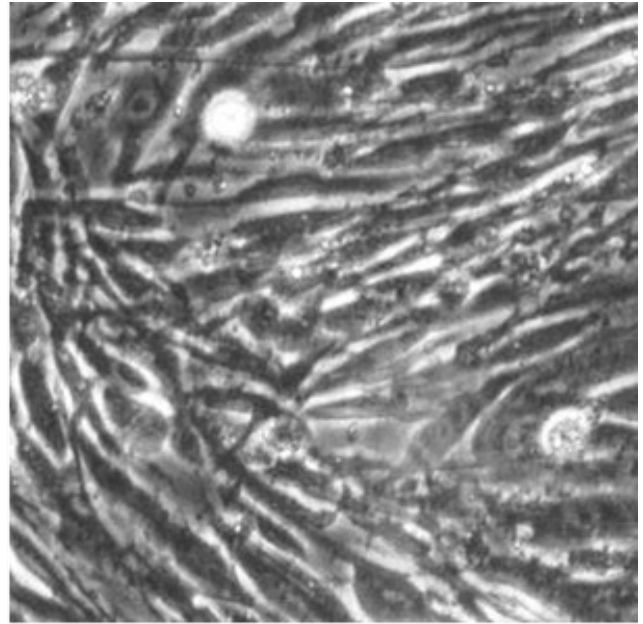
3.1.3.1.1 Isolement à façon

Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines « NBB » sont isolées à partir d'un échantillon d'un cerveau humain frais de la Netherland Brain Biobank (NBB) issu d'un individu décédé depuis moins de 24h et tenant compte de nos critères d'exclusion. Elles ont été mises en culture et amplifiées. Pour obtenir des cultures de cellules endothéliales les plus pures possibles, nous cultivons les cellules pendant 7 jours en présence de puromycine (91). Cet antibiotique est un substrat de la P-gp qui permet d'éliminer toutes les cellules qui n'expriment pas cette pompe d'efflux de manière à ne garder au bout de 7 jours que des cellules endothéliales. Un échantillon a été prélevé puis caractérisé lors du 1^{er} passage : P1J0, 3 jours après le 1^{er} passage : P1J3 puis 4 jours après le 2^{ème} passage : P2J4.

Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines « Fidelis » sont isolées à partir d'un échantillon d'un cerveau humain frais obtenu par Fidelis issu d'un individu décédé depuis moins de 6h et tenant compte de nos critères d'exclusion. Elles ont été mises en culture et amplifiées. Un échantillon a été prélevé puis caractérisé lors du 1^{er} passage : P1J0, 6 jours après le 1^{er} passage : P1J6 puis 4 jours après le 2^{ème} passage : P2J4. La Figure 36 présente ces cultures qui semblent avoir une morphologie de cellules endothéliales. Le tapis cellulaire est obtenu à partir de l'expansion de morceaux de microvaisseaux et semble homogène.



NBB



Fidelis

Figure 36 : Cellules endothéliales primaires humaines. Cellules isolées à partir de cerveaux provenant à gauche de Netherland BioBank à P1J6 et à droite de Fidelis à P1J3 observées au microscope à contraste de phase grossissement :x200 cultivées dans le milieu EBM2 sur un revêtement collagène et fibronectine.

A des fins de comparaison, nous avons travaillé aussi avec des cellules endothéliales primaires de cerveau générées par la société Brainplotting™. Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines « Brainplotting™ » sont isolées à partir d'un échantillon péri-tumoral d'un cerveau humain frais obtenu par Brainplotting™ auprès d'un neurochirurgien effectuant une résection de glioblastome. Elles sont amplifiées et purifiées en flask avant d'être ensemencées sur un Transwell® et récoltées entre J5 et J8 soit un temps moyen de culture P1J6. (Figure 37).

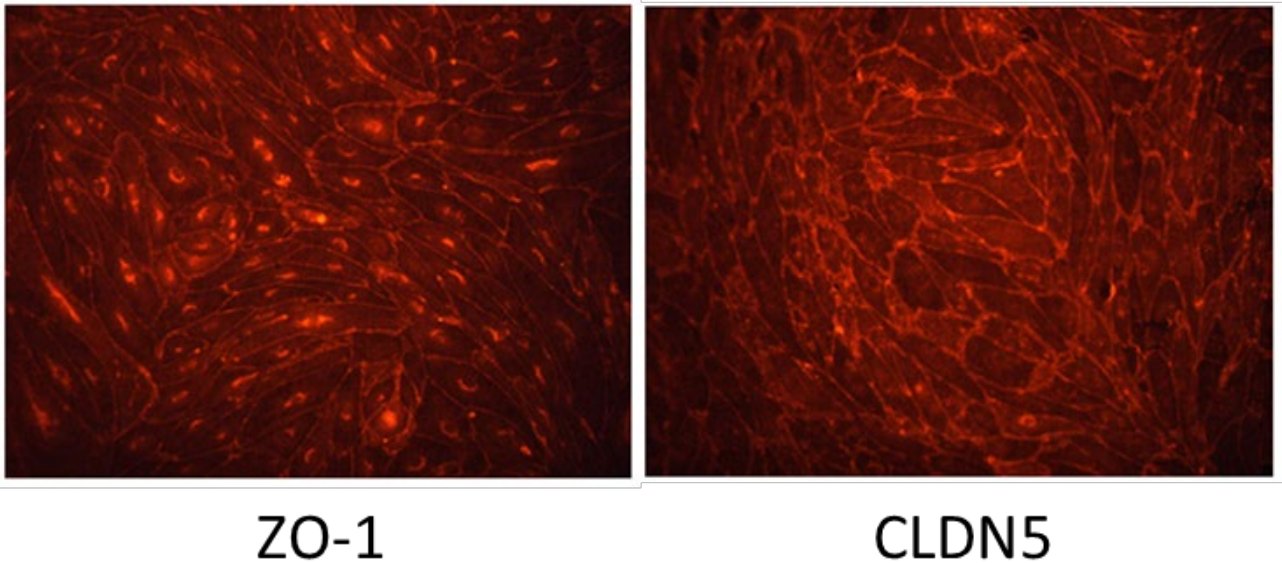


Figure 37 : Cellules endothéliales primaires humaines produites par Brainplotting™. Cellules observées au microscope à fluorescence grossissement x200. Les cellules sont fixées à l'éthanol et marquées avec des anticorps primaires : à gauche : ZO1, à droite : CLDN5 révélés par des anticorps secondaires couplés au fluorophore Alexa 594

Nous avons caractérisé les cellules endothéliales primaires de ces trois sources différentes par qPCR. Nous avons utilisé, comme contrôle, des cellules HUVEC qui sont des cellules endothéliales périphériques. Elles expriment *CD31* mais elles ne possèdent pas de caractéristiques de la BHE (ni jonctions serrées, ni pompes d'efflux) (327). Nous avons quantifié des gènes spécifiques des différents types cellulaires susceptibles d'être présents dans les cultures. La caractérisation de ces cellules isolées s'est faite par comparaison avec un homogénat d'un des cerveaux fournis par NBB (Figure 38). Cela nous a permis de vérifier l'enrichissement de nos cultures en cellules endothéliales par comparaison à l'homogénat de cerveau qui contient plusieurs types cellulaires différents. Nous avons amplifié, comme marqueurs des cellules endothéliales : *CD31*, *CLDN5* (jonctions serrées) et *BCRP* (pompe d'efflux) ; des cellules astrocytaires : *GFAP*, des cellules microgliales : *IBA1* et des péricytes *PDGFRβ*.

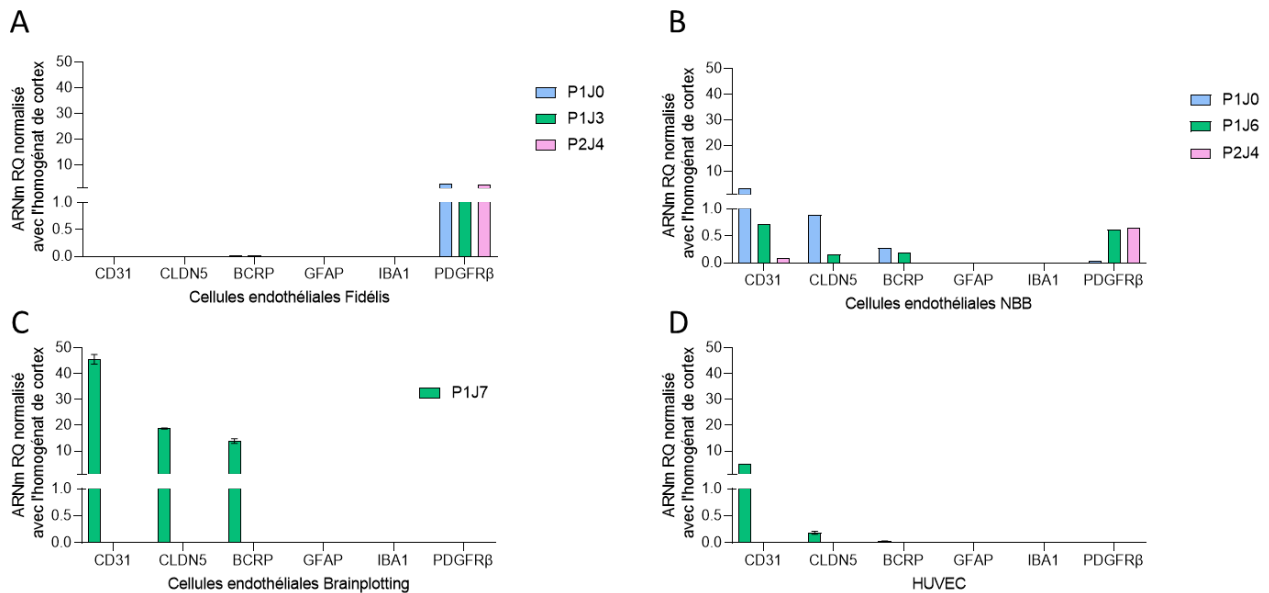


Figure 38 : RT-qPCR de l'ARNm de marqueurs de types cellulaires des cellules endothéliales primaires microvasculaires cérébrales humaines provenant de différentes sources. A : Cellules provenant de Fidelis, B : Cellules provenant de NBB, C : Cellules provenant de Brainplotting™, D : Cellules Huvec

Comme attendu, les cellules HUVEC expriment le gène *CD31*, marqueur endothélial mais pas les autres marqueurs de la BHE ni ceux des autres types cellulaires. Les cellules endothéliales primaires produites par Fidelis n'expriment pas les marqueurs endothéliaux *CD31*, *CLDN5* et *BCRP*, elles expriment *PDGFRβ*, ce sont vraisemblablement des péricytes. Les cellules produites en interne isolées de cerveaux de la NBB expriment bien les marqueurs endothéliaux *CD31*, *CLDN5* et *BCRP* à P1J0 mais ils diminuent rapidement au cours du temps au profit de *PDGFRβ*. Ces cellules sont probablement des cellules endothéliales qui sont contaminées par des péricytes. Cependant, ces cellules seraient utilisables sans passage dès lors que le phénotype est perdu en culture mais ce procédé ne nous permettra pas d'accéder à suffisamment de cellules pour nos besoins. Nous pouvons voir Figure 38 que les cellules endothéliales primaires produites par Brainplotting™ expriment les marqueurs endothéliaux *CD31*, *CLDN5* et *BCRP*, elles n'expriment pas *PDGFRβ* ce sont bien des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales pures. Nous verrons plus loin que nous avons utilisé le modèle de transcytose de Brainplotting™ à plusieurs reprises (91,93,328,329) mais nous ne pouvons pas utiliser cette source de cellules primaires car elles ne sont pas disponibles à la vente.

3.1.3.1.1.2 Source commerciale

Nous avons donc analysé des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales primaires commerciales. Les informations sur les donneurs sont succinctes (par exemple : donneur en bonne santé), nous n'avons pas d'indications sur l'âge du donneur. Par ailleurs, leur coût est trop élevé

pour envisager l'acquisition des quelques centaines de milliers de cellules dont nous aurions besoin pour nos expériences.

Nous avons acheté trois sources de cellules primaires endothéliales cérébrales commerciales : ACBRI376V Clinisciences (Cell system), H6023 Clinisciences (cell biologics) et 1000 Sciencell (Science cell) (Figure 39). Les cellules ACBRI376V n'ont pas été évaluées car elles sont mortes suite à un problème de coating. Nous avons évalué les cellules primaires H6023 et 1000.

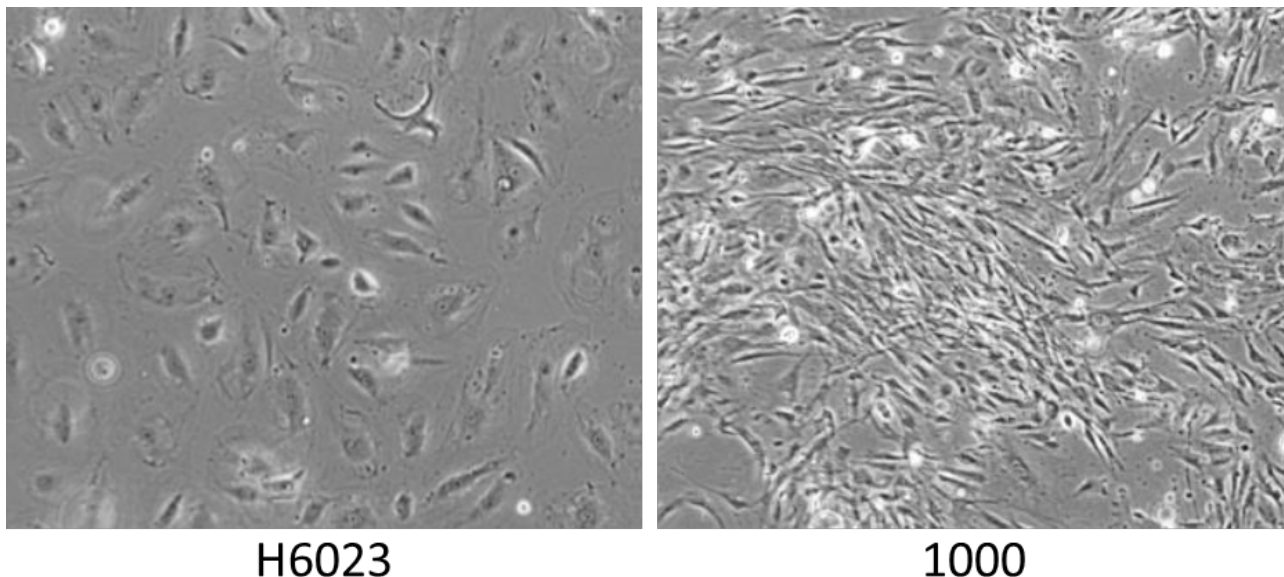


Figure 39 : Cellules primaires endothéliales commerciales à P0J5. A gauche H6023, à droite 1000. Cellules observées au microscope à contraste de phase grossissement x100

Nous observons que la morphologie des cellules est différente selon le fournisseur. Les cellules 1000 poussent plus vite et sont plus allongées par comparaison aux cellules H6023 qui sont de formes pavées et se multiplient moins.

H6023 et 1000 ont été évaluées en RT-qPCR (Figure 40) par comparaison à la lignée hCMEC/D3. Nous utilisons la lignée hCMEC/D3 car il s'agit d'une lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines qui possède quelques caractéristiques de la BHE malgré l'absence de jonctions serrées (93,94,118,330). Elle est utilisée comme normalisateur dans la quantification des ARNm des lignées de cellules endothéliales cérébrales commerciales avec une valeur de RQ à 1. Elle s'amplifie facilement, elle est largement utilisée dans les expériences du domaine de la BHE par la communauté scientifique.

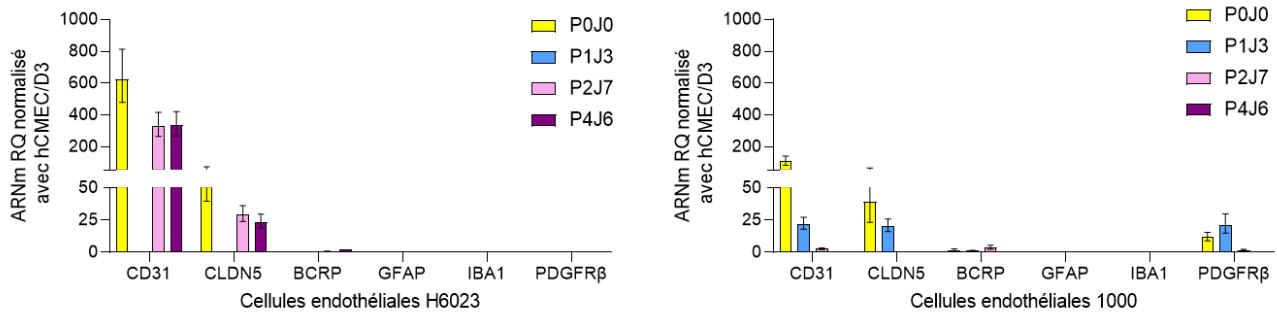


Figure 40 : RT-qPCR de l'ARNm de marqueurs de types cellulaires des cellules endothéliales primaires cérébrales humaines commerciales au cours de la culture de la décongélation P0J0 à 4 passages et 6 jours de culture. A gauche cellules endothéliales primaires commerciales H6023, à droite cellules endothéliales primaires commerciales 1000

La lignée H6023 exprime des marqueurs des cellules endothéliales *CD31* et *CLDN5* qui sont détectés en qPCR tandis que la lignée 1000 ne les expriment plus après 2 passages. Cette dernière est également contaminée par des péricytes dont la proportion augmente aussi avec la culture.

H6023 et 1000 ont été évaluées également avec des marquages immunofluorescents (Figure 41).

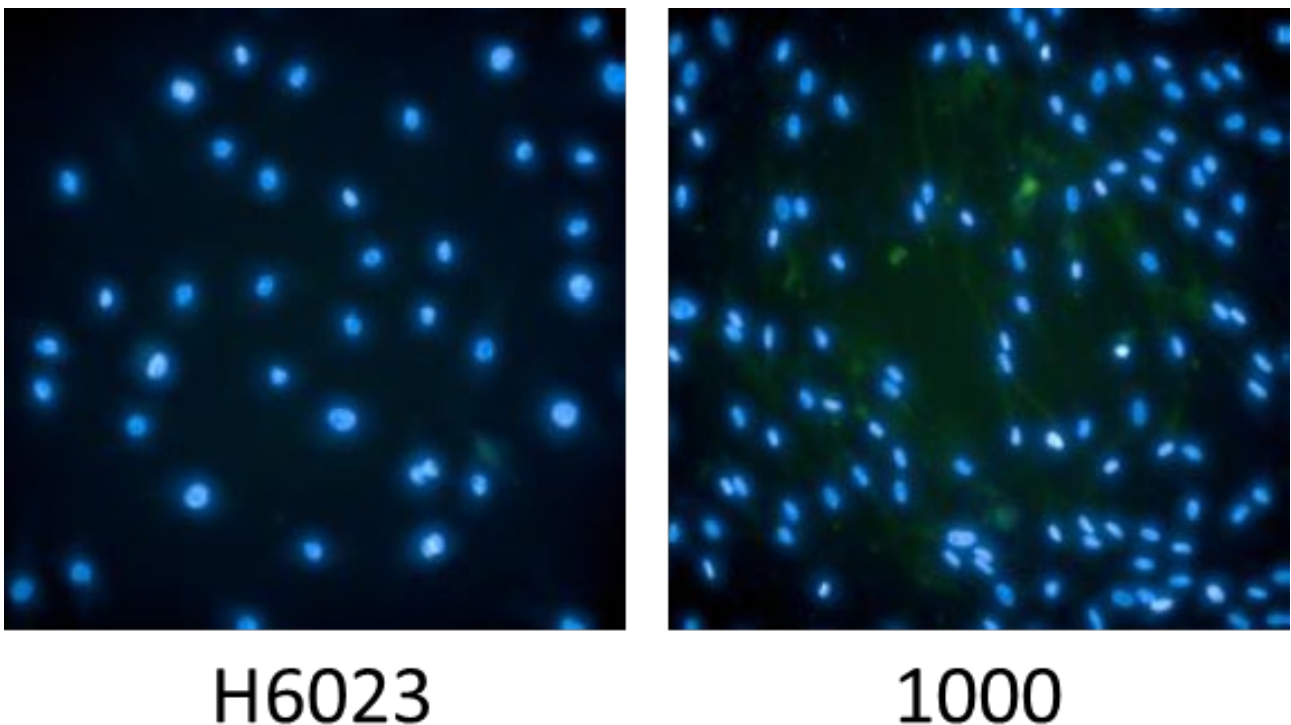


Figure 41: Immunofluorescence de ZO-1 des cellules primaires endothéliales commerciales. A gauche H6023, à droite 1000. Cellules observées au microscope à fluorescence grossissement x100. Les noyaux cellulaires sont visualisés en bleu par un marquage au Hoechst, ZO-1 est visualisé en vert avec un anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa 488.

Le marqueur de jonctions serrées ZO-1 n'est pas détecté en immunofluorescence sur les deux lignées. Au vu du peu de bénéfices comparés aux hCMEC/D3 et au coût d'une ampoule qui contient environ 1.10^6 cellules, l'utilisation de ces cellules n'est pas envisageable dans nos modèles.

Cette première partie de notre travail nous a permis de montrer les difficultés liées à la génération de cellules HBMECs à partir de cerveaux post-mortem. Nous avons alors exploré la piste de cerveaux provenant de résections chirurgicales avec l'hypothèse que comme le tissu collecté est « vivant », cette source permettrait d'obtenir des cellules de meilleure qualité. Nous avons pu d'ailleurs vérifier cette hypothèse lors de notre collaboration avec l'entreprise Brainplotting™ qui a un modèle de BHE *in vitro* avec des cellules endothéliales humaines issues de résections de neurochirurgie. Cependant, les difficultés logistiques et administratives liées à l'obtention de ce type de résection chirurgicales nous ont convaincus de nous tourner vers une autre alternative : la génération de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de primates. Nous avons alors des animaleries de *macaca fascicularis* en interne et l'obtention de cerveaux frais s'est avérée plus facile. Par ailleurs, l'homologie importante de beaucoup de transporteurs entre le cerveau de primate et le cerveau humain (203,331) nous permettrait sans doute de générer et valider nos hypothèses de travail (332).

3.1.3.1.2 Cellules primaires endothéliales microvasculaires cérébrales de singes

L'isolement des cellules de singes et leur caractérisation est détaillée dans notre article (96) Après prélèvement et dissection du cerveau, les microvaisseaux sont digérés par une enzyme puis séparés sur gradient de densité P0D0. Les cellules sont cultivées 7 jours en présence de puromycine P0D7 puis elles sont cultivées 7 jours dans un modèle de BHE *in vitro* sans puromycine P1D7 (Figure 42) (96).

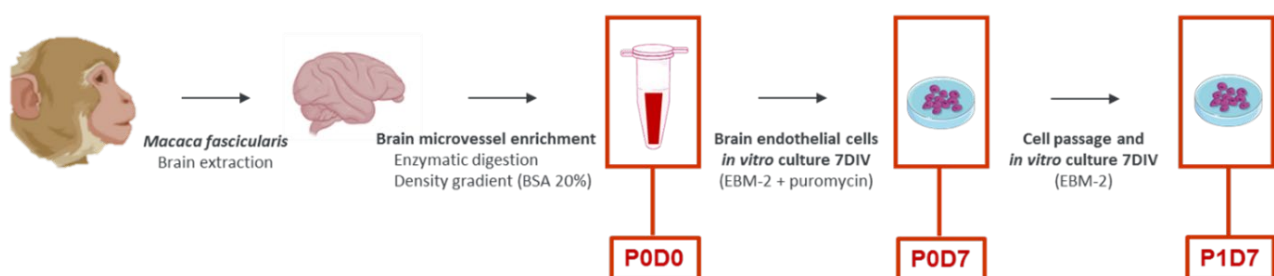


Figure 42: Etapes d'isolement des cellules endothéliales microvasculaires *Macaca Fascicularis*.

Nous produisons environ 20.10^6 cellules endothéliales par cerveau de singes *Macaca fascicularis* adultes. L'expression de protéines spécifiques de la BHE est montrée par des marquages immunofluorescents sur la Figure 43.

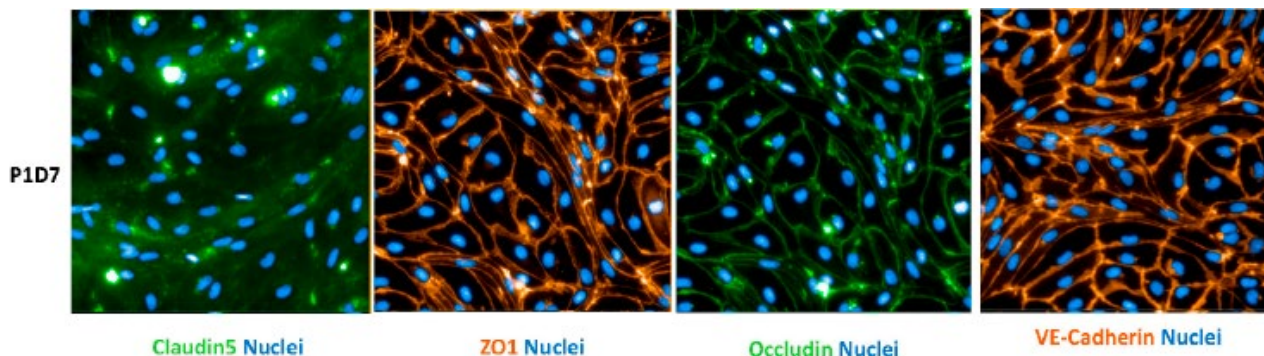


Figure 43 : Cellules endothéliales de singes à P1D7. Cellules observées au microscope à fluorescence x200. Les noyaux marqués au Hoechst sont visualisées en bleu, Claudin5 et Occludin sont détectées avec un fluorophore Alexa 488 en vert, ZO1 et VE-Cadherin sont détectées avec un fluorophore Alexa 555 en orange.

Ces cultures expriment les marqueurs endothéliaux jusqu'à P1D7. Nous avons vérifié ces marqueurs dans cinq régions du cerveau (tronc cérébral, cervelet, cortex, hippocampe et striatum). Il n'y a pas de signature particulière du transcriptome endothélial en fonction de la région du cerveau. Certains RMT sont dérégulés en culture comme le TFRC, INSR, LDLR ou GLUT1 (333). ABCG2 (codant pour BCRP) ou ABCB1 (P-gp) le sont également. Cependant ils sont toujours présents à P1D7 qui est le temps de culture auquel nous utilisons les cellules.

Nous avons évalué l'influence de la présence d'astrocytes dans un modèle de transcytose (Figure 44)(96). Les astrocytes (de rat) semblent augmenter le TEER mesuré à travers les cellules endothéliales.

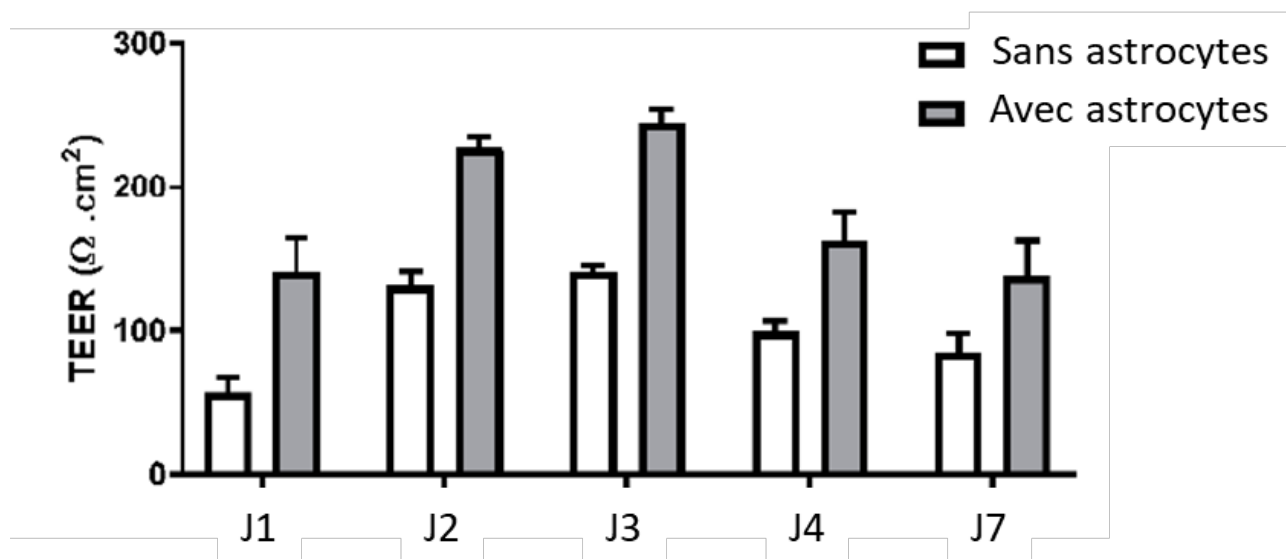


Figure 44 : Mesure du TEER au cours du temps dans un modèle de BHE *Macaca fascicularis* in vitro sur Transwell®. Comparaison des valeurs de J1 à J7 en absence ou en présence d'astrocytes.

La présence d'astrocytes améliore les valeurs de TEER. Dans tous nos modèles de Transwell® les cellules endothéliales sontensemencées en présence d'astrocytes jusqu'au test de transport.

Nous avons comparé la qualité des cellules de singes avec celles des cellules primaires humaines générées lors de la collaboration avec NBB ou celles obtenues de Brain Plotting (Figure 45). On vérifie ici que les cellules générées à partir du macaque présentent les marqueurs endothéliaux attendus et l'absence de péricytes comme les cellules de Brainplotting™ par opposition à celles générées avec des cerveaux humains post-mortem.

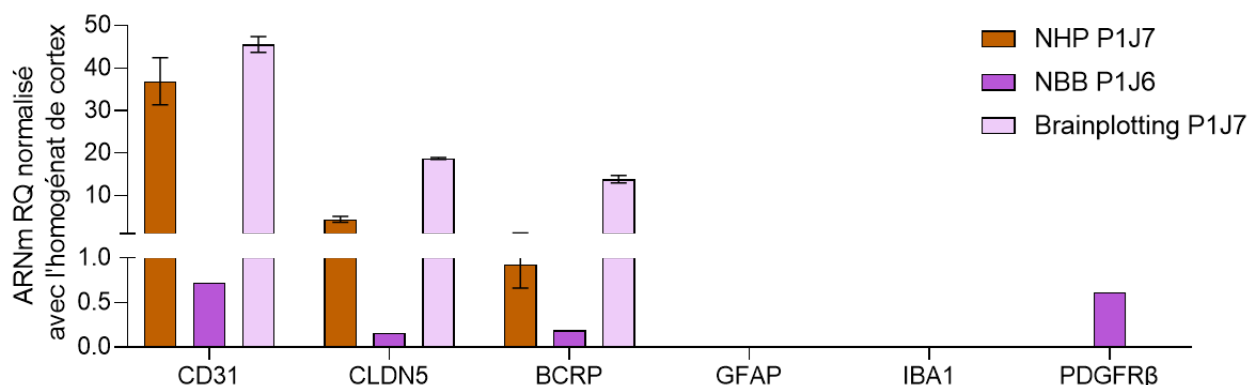


Figure 45 : Amplification des marqueurs endothéliaux dans des cellules de différentes espèces. Les résultats pour les cellules de singes sont représentés en marron, pour les cellules humaines de NBB en violet et pour les cellules humaines de Brainplotting™ en perle.

Ces cellules sont donc validées pour être utilisées dans des modèles de BHE *in vitro*.

3.1.3.1.3 Cellules primaires endothéliales microvasculaires cérébrales de souris

Pour l'isolement de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de souris, les étapes du protocole sont identiques. Après prélèvement et dissection du cerveau, les microvaisseaux sont digérés par une enzyme puis séparés sur gradient de densité P0J0. Les cellules sont cultivées 7 jours en présence de puromycine P0J7 puis elles sont cultivées 7 jours dans un modèle de BHE *in vitro* sans puromycine P1J7 (Figure 46).

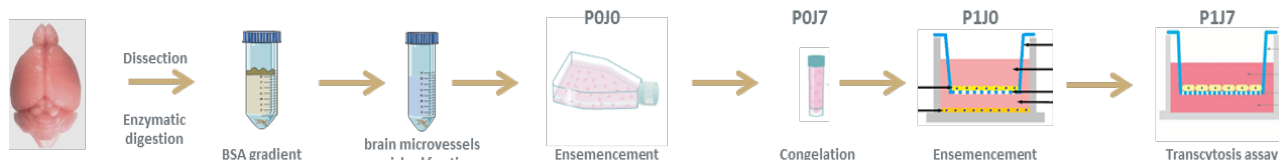


Figure 46 : Etapes d'isolement des cellules endothéliales microvasculaires de souris.

Les cellules observées au microscope à contraste de phase après une semaine de culture en présence de puromycine semblent présenter une morphologie endothéliale sur la Figure 47 .

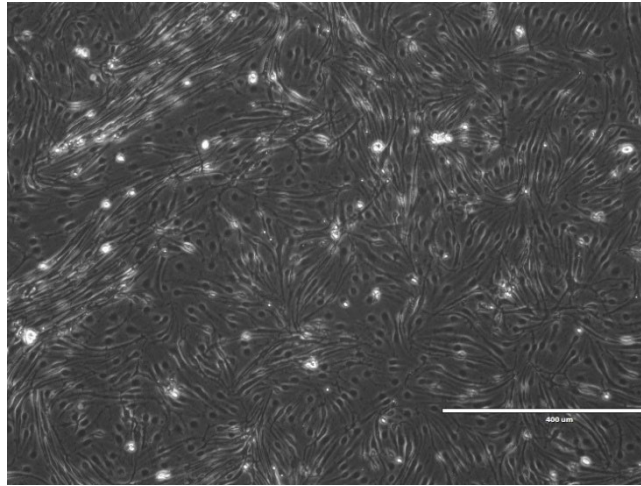


Figure 47: Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de souris observées après 7 jours de culture P0J7 (grossissement x100).

La caractérisation des cellules a également été faite par qPCR. Les résultats sont normalisés par rapport à la quantification des gènes dans un homogénat de cerveau dont la quantité relative est fixée à 1. Tandis que le marqueur *CD31* est maintenu en culture (>1), les marqueurs des jonctions serrées et les transporteurs tels que *Glut1*, *Tfr* sont dérégulés (<1). Hormis pour les gènes des pompes d'efflux *Bcrp* et *P-gp* qui sont plus exprimés dans les cellules endothéliales primaires, il y a peu de différence d'expression des gènes du phénotype endothélial entre les cellules primaires après une semaine de culture et la lignée de cellules endothéliales bend3 (Figure 48).

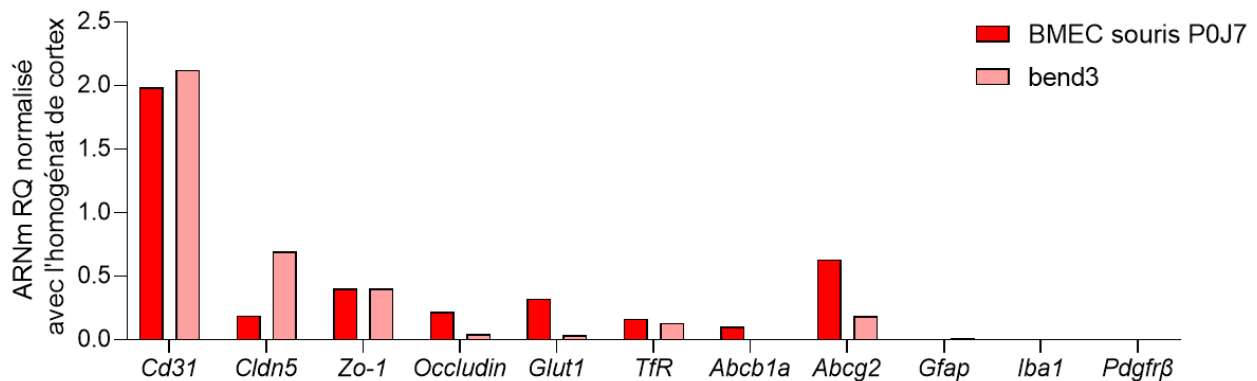
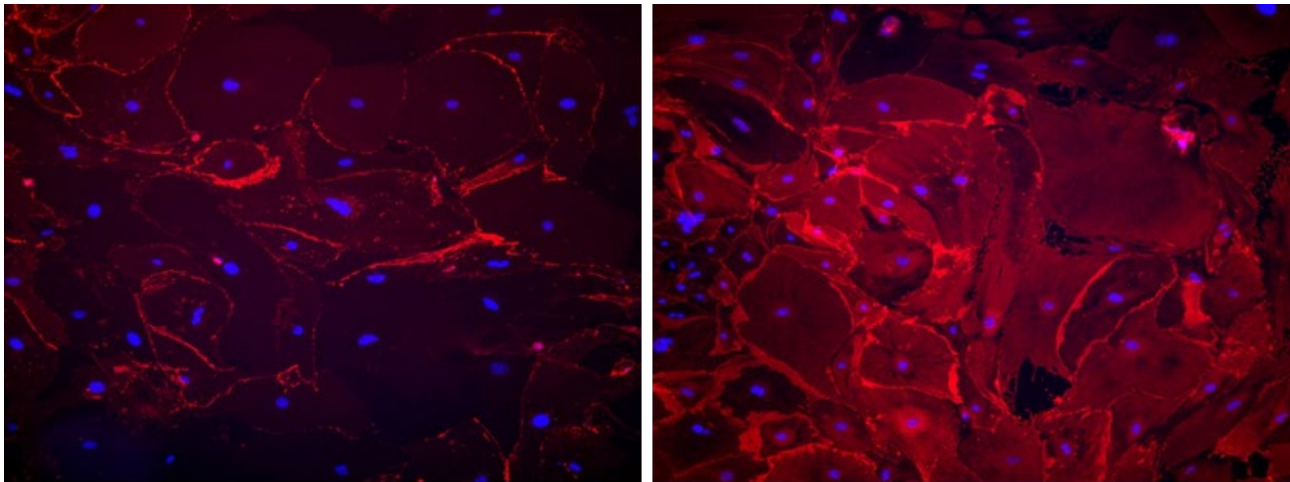


Figure 48 : RT-qPCR de l'ARNm de marqueurs de types cellulaires des cellules endothéliales primaires microvasculaires cérébrales de souris. Les résultats des cellules endothéliales de souris primaires sont en rouge foncé et les résultats des lignées endos de souris bend3 sont en rouge clair.

Un marquage après une décongélation et 24h en culture P1J1 montre que les jonctions serrées ZO1 sont toujours présentes (Figure 49).



CD31

ZO-1

Figure 49 : Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de souris. Observation au microscope à fluorescence x200 Le signal de l'anticorps couplé au fluorophore Alexa 594 est détecté en rouge, à gauche : CD31, à droite ZO-1, les noyaux sont marqués au Hoechst en bleu.

Ces résultats montrent que les marqueurs de fonctionnalité des jonctions serrées (*claudin5*, *Zo-1*, *occludin*), sont diminués après 7 jours de culture. Cette culture des cellules endothéliales de souris ne permet donc pas de maintenir une bonne fonctionnalité de la BHE *in vitro*. De plus, le rendement de ces cultures est médiocre. Il faut 30 cerveaux de souris adulte pour produire $1,5 \cdot 10^6$ cellules endothéliales. Cela va à l'encontre de la réduction du nombre d'animaux en recherche. Le modèle de souris est intéressant *in vivo* mais pour l'établissement de modèles de BHE *in vitro*, nous ne l'avons pas poursuivi.

En conclusion des expériences d'isolement, de caractérisation et de culture des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales, pour nos modèles de BHE *in vitro*, nous avons choisi d'utiliser la lignée humaine hCMEC/D3 et les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales primaires de primates. Ces dernières nous offrent également la solution que nous recherchions pour la génération d'un grand nombre de cellules primaires endothéliales de cerveau pour les expériences d'immunisation que nous présenterons plus loin.

3.1.3.2 Modèles de BHE *in vitro* statiques

Les modèles de BHE *in vitro* suivants ont tous été développés avec des Transwell®. C'est le moyen le moins coûteux et le plus facile à mettre en place (95).

3.1.3.2.1 « Pulse-chase »

Ce modèle est mis en place pour les cellules qui présentent un important passage paracellulaire (Figure 50). C'est-à-dire présentant des valeurs de TEER $< 150 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Il s'agit soit de cellules hCMEC/D3 soit de cellules primaires endothéliales microvasculaires cérébrales de singes avec un

TEER < 150 Ω .cm². Il se fait en deux phases : une phase de « *Pulse* » où les cellules sont chargées en molécule à tester. Ensuite des lavages permettent d'éliminer les molécules présentes dans le milieu et de ne retenir que celles qui sont entrées dans les cellules. La phase suivante est une phase de « *Chase* » qui se fait dans du milieu neuf. Si les molécules testées font de la transcytose elles doivent être relarguées dans le milieu par les cellules et idéalement dans le compartiment basolatéral des Transwell®.

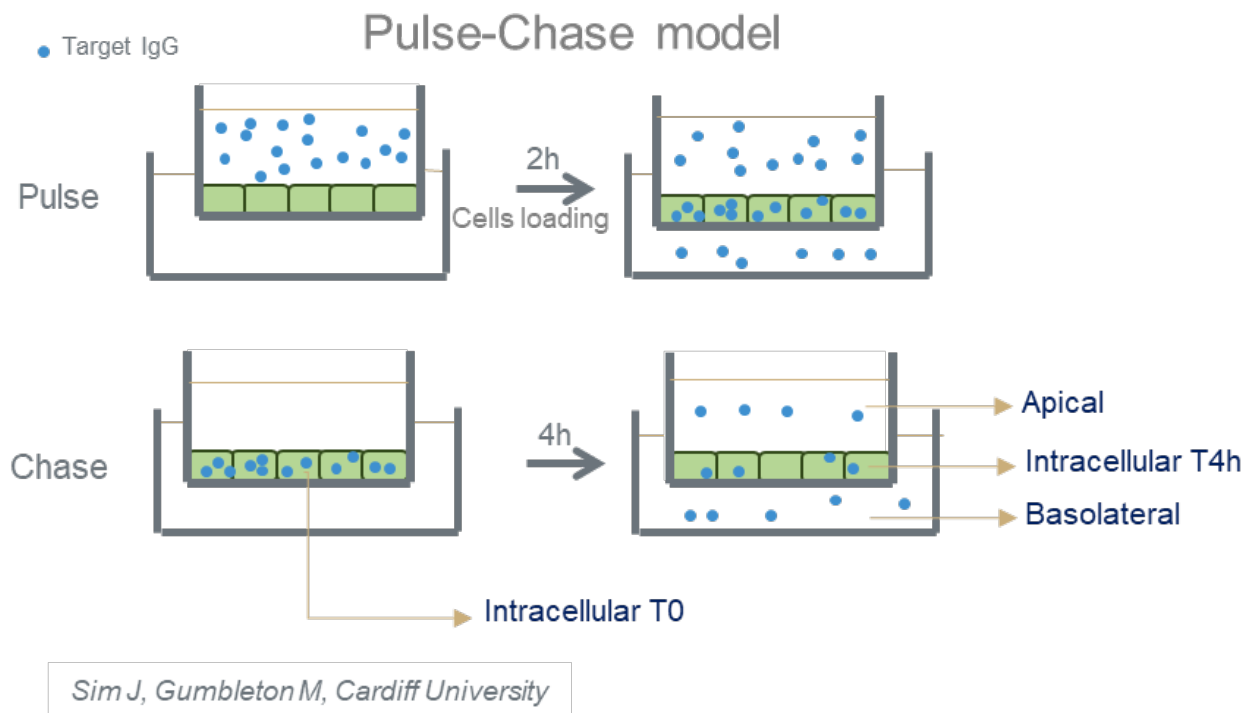


Figure 50: Représentation d'un modèle de « pulse-chase ». Lors du « *Pulse* », les cellules sont mises en présence de la molécule à tester. Des lavages permettent d'éliminer les molécules qui restent dans le milieu. Suit ensuite une phase de « *Chase* » où les molécules incorporées dans les cellules sont relarguées dans le milieu.

Après 4h de « *chase* », les milieux apicaux et basolatéraux sont prélevés et dosés par ELISA. Les cellules sont lysées et leur contenu est également dosé par ELISA. On détermine le ratio de « *pulse-chase* » PC_R

Les résultats obtenus par exemple avec un anticorps anti-TFRC et un anticorps contrôle sont présentés dans la Figure 51.

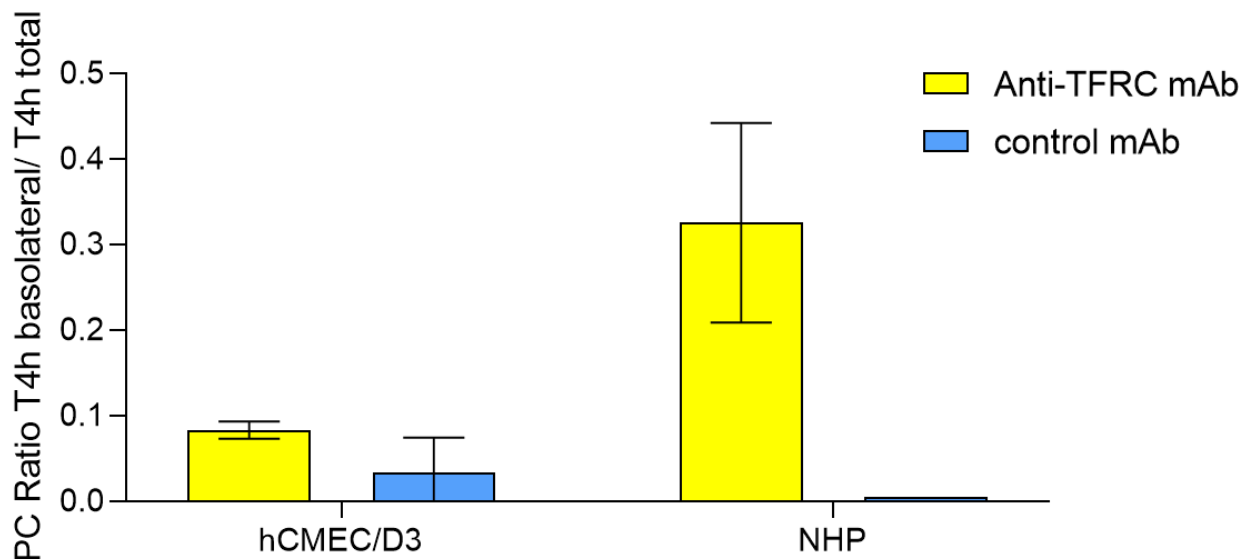


Figure 51 : Ratio de « pulse-chase » pour un anticorps anti-TFRC en jaune comparé à un anticorps qui ne fait pas de transcytose en bleu dans un modèle de BHE *in vitro* pulse chase. $n=3$ Transwell® par barre.

Dans ce test de transport, on voit que l'on peut distinguer un anticorps qui fait de la transcytose (anti-TFRC en jaune) d'un anticorps qui n'en fait pas (contrôle en bleu). Le premier modèle est basé sur une lignée cellulaire immortalisée qui a perdu une partie de son phénotype BHE, le second une lignée primaire fraîchement isolée. Les différences peuvent être liées à l'espèce ou à l'affinité de l'anticorps pour le récepteur des différentes espèces. Ce modèle est surtout utilisable pour classer les anticorps relativement les uns par rapport aux autres dans un modèle identique.

3.1.3.2.2 Transcytose Classique

Ce modèle est utilisé pour des cellules jointives qui ne présentent pas de passage paracellulaire et pour lesquels les TEER sont supérieurs à $150 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Figure 52). Nous utilisons ces modèles avec des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de singes produites en interne congelées à P0J7. Des astrocytes sont d'abordensemencés dans le fond du Transwell®. Au bout de 4 jours sont ajoutées les cellules endothéliales. Des mesures de TEER régulières permettent de déterminer à quel jour de culture peut être pratiqué le test de transport. On le fait 24h après une mesure de TEER $>150 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

Transcytose classique

- IgG cible
- IgG control

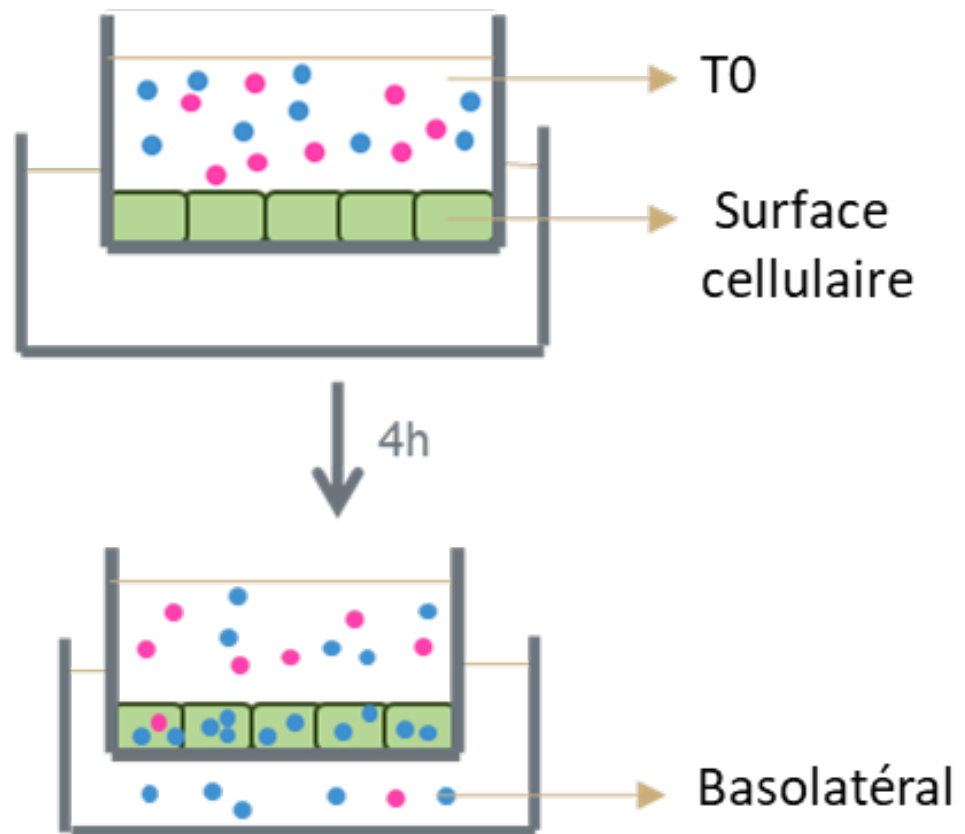


Figure 52 : Représentation d'un modèle de transcytose. Les cellules sont mises en présence d'un anticorps cible en bleu et d'un anticorps contrôle en rose. La quantité d'anticorps en basolatéral ainsi que la concentration de départ T0 sont déterminées par dosage ELISA.

Ce modèle permet de calculer la perméabilité apparente pour chaque anticorps.

Nous déterminons un ratio de P_{app} entre l'anticorps cible et l'anticorps contrôle. L'anticorps contrôle est produit dans une espèce différente de l'anticorps cible. Ainsi ils sont incubés ensemble dans le même Transwell® ce qui donne un contrôle garant de l'étanchéité du puits. Les données aberrantes sont éliminées lorsque le P_{app} de l'anticorps contrôle est supérieur à 150% de la médiane des P_{app} de tous les anticorps contrôles des expériences.

Nous utilisons deux autres modèles de transcytose classique de la même façon. C'est le modèle de PharmaCo-Cell® (Figure 53) qui utilise des cellules primaires endothéliales microvasculaires cérébrales de singes en tri-culture avec des astrocytes et des péricytes de rats.

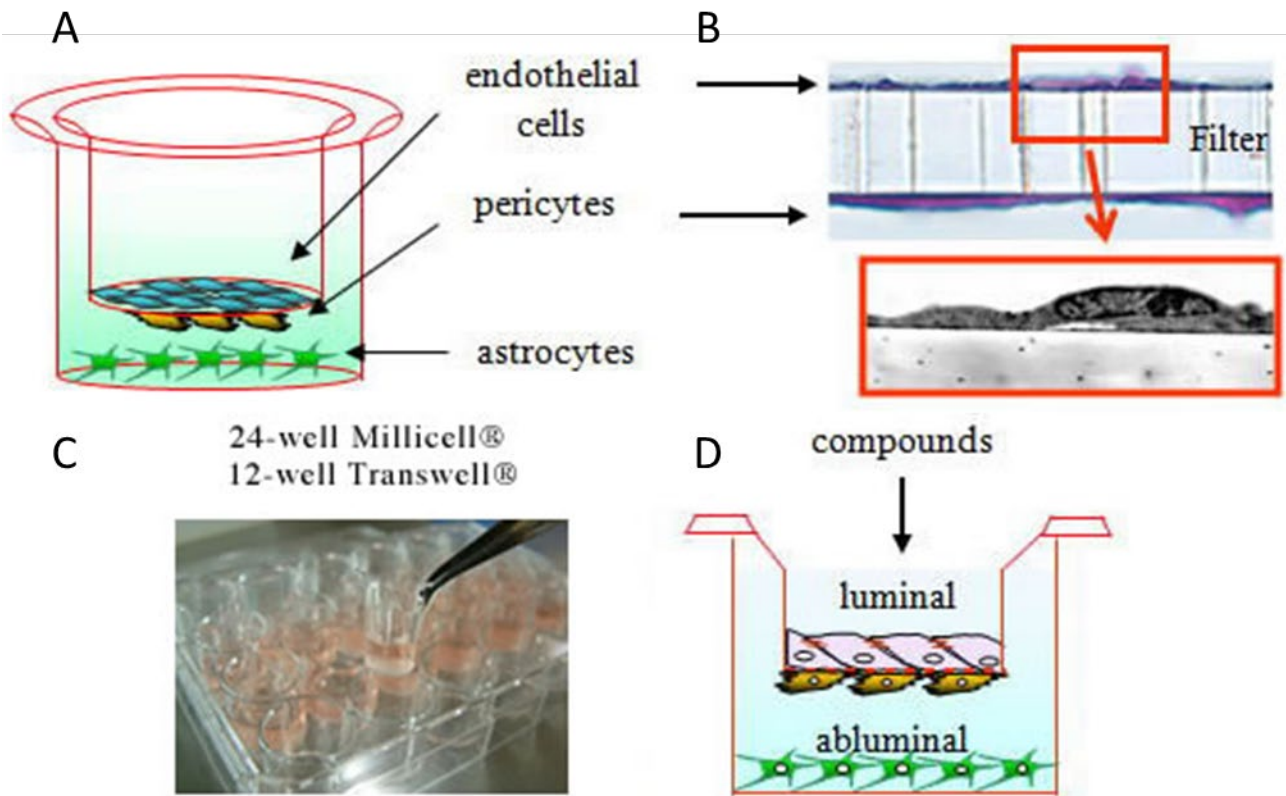


Figure 53 : Modèle de BHE in vitro primates de PharmaCo-Cell®. A : Vue d'ensemble du modèle de triculture B : Vue en coupe en microscopie électronique du filtre avec les cellules endothéliales ensemencées C : Photo du dispositif de Transwell® en plaque 24 puits D : Illustration d'une expérience de transcytose

Les cellules primaires endothéliales microvasculaires cérébrales de singes sont cultivées en triculture avec des astrocytes et des péricytes sur des membranes de Transwell® www.PharmaCoCell.co.jp/en/

Ce modèle est assez coûteux et l'importation de ces plaques de la France au Japon est complexe d'un point de vue administratif. Par ailleurs, le milieu qui est fourni avec, contient des immunoglobulines humaines, ce qui peut être un problème si on évalue des anticorps possédant un fragment Fc humain. Il faut dans ce cas ajouter une étape de changement de milieu lors de l'expérience de transport.

Le modèle de Brainplotting™ (Figure 54) utilise des cellules primaires endothéliales microvasculaires cérébrales humaines en coculture avec des astrocytes (91,324).

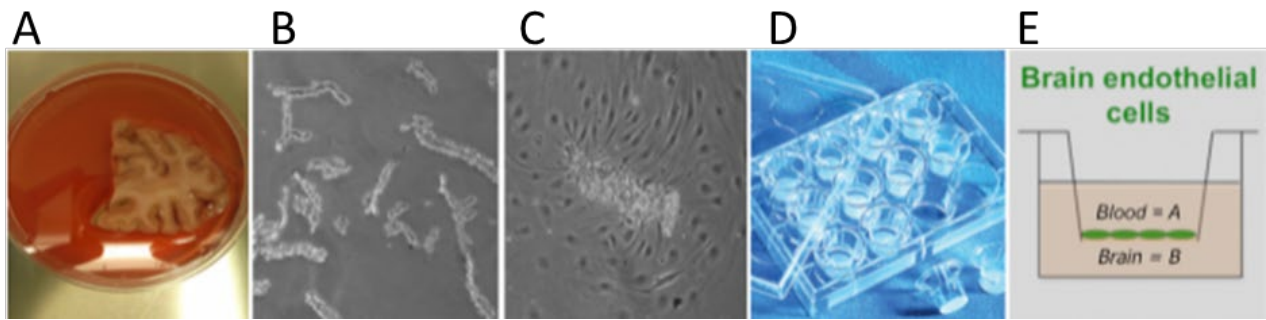


Figure 54: Modèle de BHE in vitro humaine de Brainplotting™. Les cellules primaires endothéliales microvasculaires cérébrales humaines sont cultivées en co-culture avec des astrocytes sur des membrane de Transwell®. A : Echantillon de cerveau humain B : Microvaisseaux cérébraux humains C : Cellules primaires endothéliales microvasculaires humaines en culture D : Photo du dispositif de Transwell® en plaque 12 puits E : Représentation du modèle de BHE humaine in vitro www.Brainplotting.com

Les mesures de variations du TEER et de perméabilité avec des fluorophores mettent en évidence l'étanchéité de la BHE.

Nous avons évalué le ratio de P_{app} entre un anticorps anti-TFRC et un anticorps de souris dans ces trois modèles de transcytose classique en Transwell® (Figure 55).

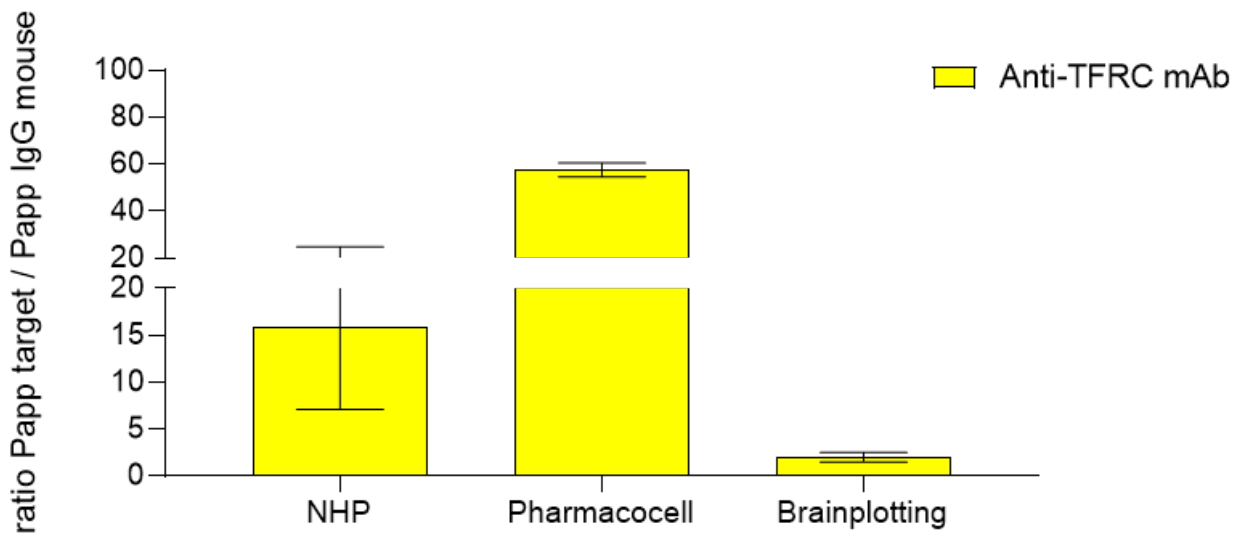


Figure 55 : Ratio de P_{app} pour un anticorps anti-TFRC dans trois modèles de BHE in vitro. NHP : n=3 Transwell®, PharmaCo-Cell® n=3 Transwell®, Brainplotting™ n=9 Transwell®

L'anticorps anti-TFRC montre un passage 16 fois supérieur à l'anticorps contrôle dans notre modèle de transcytose en Transwell®. Il montre un passage 60 fois supérieur dans le modèle NHP de PharmaCo-Cell® et un passage 2 fois supérieur dans le modèle humain de Brainplotting™. Nous avons donc des résultats différents en fonction des modèles mais au sein d'un même modèle on peut classer des anticorps en fonction de leur capacité à faire de la transcytose. Le modèle de

Transwell® est relativement facile à mettre en place une fois que l'on a une bonne source de cellules. Sa qualité est très dépendante des cellules utilisées et s'il y a eu coculture avec astrocytes et/ou péricytes. C'est un modèle peu coûteux, qui prend peu de place et qui ne nécessite pas d'équipement spéciaux pour son utilisation.

Une partie de ces travaux sur les modèles de BHE *in vitro* a donné lieu à un article de recherche dans lequel je suis co-auteur, publié en octobre 2020 dans le journal « Pharmaceuticals », qui porte sur la caractérisation de notre modèle de BHE *in vitro* réalisé avec des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de singes.

3.1.3.3 Modèle de BHE *in vitro* Dynamique Mimetas

Pour tenir compte de la contrainte de cisaillement subie par les cellules *in vivo*, nous avons évalué un modèle de BHE dynamique. Nous avons sélectionné celui de Mimetas (Figure 56 A) que nous connaissions bien au travers du consortium IM2PACT. Ce modèle permet d'éviter l'utilisation de pompe, il présente une utilisation simple et un haut débit d'expériences. La force de cisaillement de ce modèle est de 1,2 dyne/cm² (133). Nous avons pu nous former dans cette entreprise de biotechnologie en Hollande pour apprendre à mettre en œuvre ce modèle. Les cellules endothéliales sontensemencées dans le compartiment supérieur tandis que les cellules cocultivées sont dans le compartiment inférieur (Figure 56 D). Les cellules forment un tube dans lequel s'écoule le milieu de culture par gravité (Figure 56 B). La plaque est placée sur un rocker qui se balance (Figure 56 C). L'alternance de pente va contraindre le liquide à circuler. Le biais principal étant que le liquide fait un aller puis un retour sur les cellules ce qui ne se produit pas *in vivo*. Le tube formé est aussi trop grand comparé à la taille des microcapillaires cérébraux *in vivo* (Figure 56E), ce qui est toujours le cas dans les modèles de BHE *in vitro* (17,133). Le modèle dynamique de Mimetas est décrit, notamment pour reproduire le passage d'anticorps anti-TFRC (MEM189) dans des cellules TY10. Ils montrent un P_{app} plus élevé pour l'anticorps anti-TFRC que pour un anticorps contrôle (133).

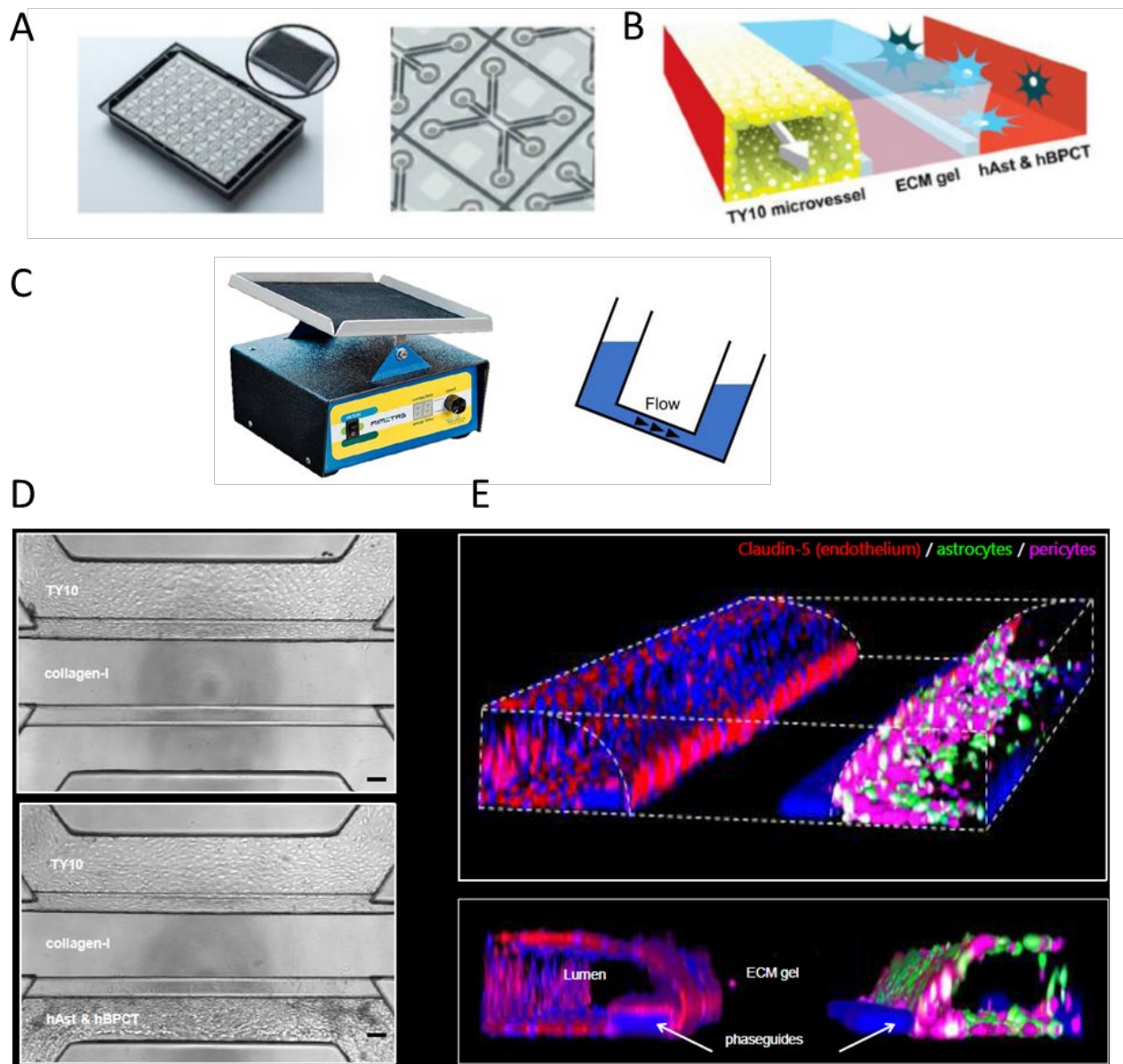


Figure 56 : Représentation du modèle dynamique de BHE *in vitro* de Mimetas. www.mimetas.com
 Nous avons évalué ce modèle avec des cellules hCMEC/D3 (Figure 57). Selon nos discussions avec Pierre-Olivier Couraud, le fait de mettre ces cellules sous un flux augmenterait l'étanchéité des BHE. *In vivo* chez l'homme la force de cisaillement des capillaires est comprise entre 5 et 23 dyne/cm² (334) donc le modèle de Mimetas présente une force de cisaillement inférieure.

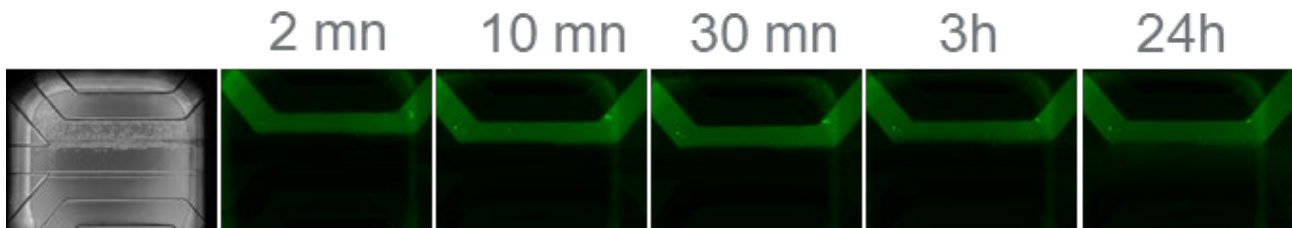


Figure 57: Evaluation de l'étanchéité des cellules hCMEC/D3 dans le modèle Mimetas avec un anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa 488 (A21206). Après 7 jours de culture dans l'Organoplate®, un anticorps fluorescent est incubé dans le compartiment luminal du tube de cellules endothéliales. Des photos sont prises à différents temps pour évaluer visuellement l'étanchéité du modèle.

Pour vérifier l'étanchéité du modèle, nous avons évalué un anticorps anti-lapin couplé à Alexa488. Si le modèle est étanche, l'anticorps fluorescent reste dans le tube de cellules endothéliales. Nous n'observons pas de fluorescence en dehors du tube de cellules hCMEC/D3. Dans ces conditions expérimentales, le modèle semble imperméable à un anticorps pendant 24h (Figure 57). Ce modèle doit maintenant être validé, dans nos conditions de test de transport, par le dosage en ELISA dans le compartiment basolatéral d'un anticorps anti-TFRC comparé à un anticorps contrôle.

3.1.4 Discussion

En conclusion, nous avons montré que l'obtention d'une quantité importante de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales primaires humaines était complexe à mettre en œuvre vu la difficulté d'accès à des cerveaux humains et de plus très rapidement après le décès. En revanche, nous avons pu mettre au point une procédure nous permettant d'accéder à ce nombre avec des cellules de primate de bonne qualité.

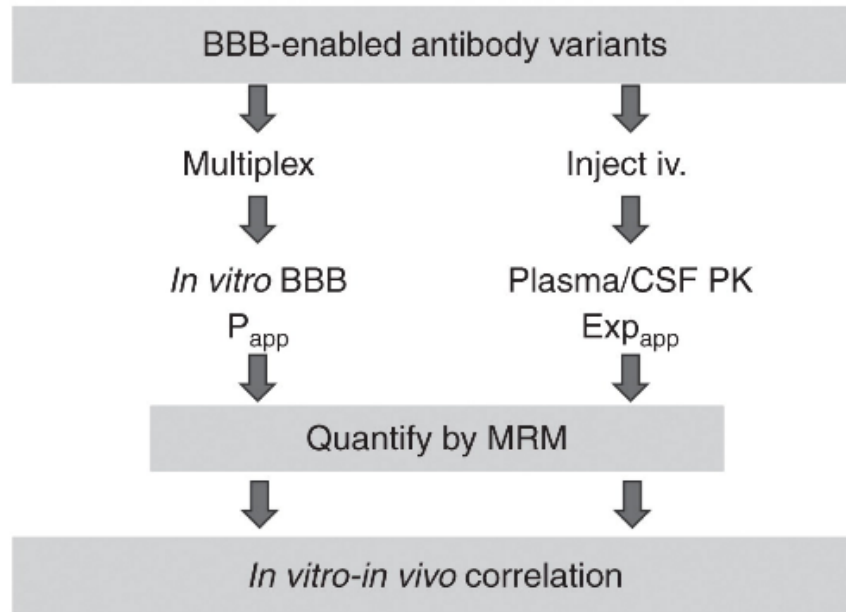
La mise en place de modèles de BHE *in vitro* requiert l'isolement de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de qualité. Nous avons vu ci-dessus les difficultés d'accès à aux cerveaux humains. Cette difficulté est mondiale au vu du peu d'articles utilisant ce type d'échantillons (209,246,251). De plus en plus d'équipes utilisent les iPSC pour tenter d'obtenir des cellules à phénotype endothélial (105,335). C'est d'ailleurs l'objectif du consortium européen auquel nous participons. Cependant, il existe autant de modèles de BHE que de protocoles de différenciation (336,337).

Des lignées humaines comme les hCMEC/D3 ont été créées et sont utilisées pour pallier ce problème (93). Elles sont très faciles à utiliser et présentent un phénotype endothélial (94,338). Cependant elles présentent un passage paracellulaire important. Nous les utilisons donc uniquement dans un modèle « *pulse-chase* » de BHE *in vitro* qui permet de s'affranchir du passage paracellulaire (195).

L'utilisation des modèles dynamiques pourrait apporter des améliorations substantielles au modèles de BHE *in vitro* (133,134). Cependant, leurs propriétés dépendent avant tout de la qualité des cellules endothéliales microvasculaires cérébralesensemencées pour les mettre en place.

Un point essentiel est la translabilité des modèles du *in vitro* au *in vivo*. Des corrélations ont pu être établies dans le cas de petites molécules avec un transport passif (339,340). Cependant, il existe peu de données dans la littérature concernant la translabilité des modèles *in vitro* en *in vivo* pour ce qui est des biothérapeutiques et en particulier ceux qui sont transportés par un mécanisme de RMT. On peut citer par exemple les travaux de Haqqani (341). Dans ce cas les auteurs ont utilisé plusieurs constructions différentes avec le VHH FC5 que nous avons discuté plus haut. Ils ont montré une certaine corrélation entre les résultats obtenus dans un modèle Adult Rat Brain microvascular Endothelial Cell (ARBEC) *in vitro* et les expositions des anticorps dans le LCR (Figure 58).

A.



B.

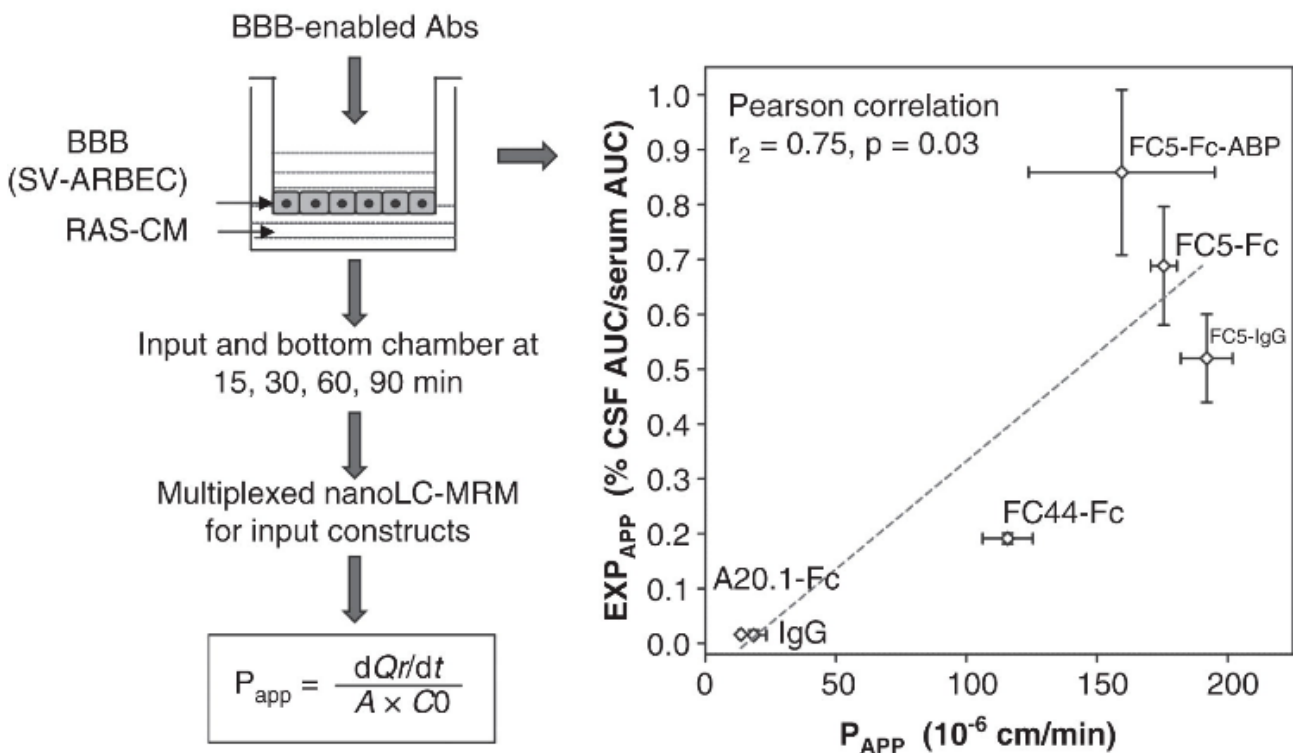


Figure 58 : Comparaison entre les expositions cérébrales de sept anticorps mesurées *in vivo* et les P_{app} mesurés *in vitro* chez le rat A : Déroulement de l'expérience B : Mesure du P_{app} *in vitro* et corrélation avec l'exposition cérébrale *in vivo* (341)

Dans un autre article, ils montrent alors une bonne corrélation entre le P_{app} mesuré *in vitro* dans un modèle de Transwell® avec des lignées de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de rat SV-ARBEC et la concentration dans le LCR de rats injectées (Figure 59 B) avec les six constructions (Figure 59 A) à la veine de la queue (342).

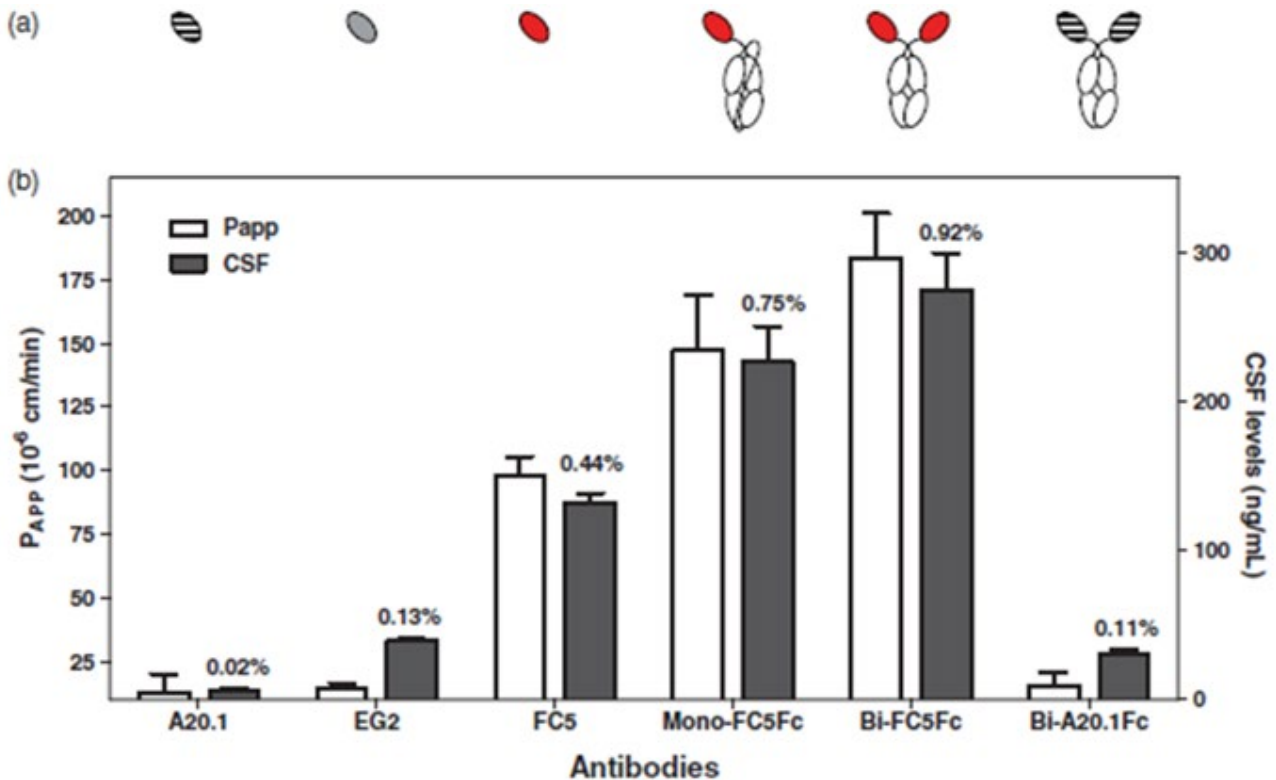


Figure 59 : Etude de franchissement de la BHE avec six anticorps différents *in vitro* et *in vivo*. A : Représentation de la structure des anticorps testés. B : Corrélation entre le P_{app} mesuré *in vitro* et la concentration dans les fractions de haute densité de l'endosome précoce des cellules endothéliales de rats (342)

Par ailleurs, ces constructions ainsi qu'un anti IGF1R ont été également utilisés dans un modèle de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales dérivé d'IPS iBEC (336). Les auteurs ont montré des résultats concordants entre le modèle iBEC et un modèle de lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de rats SV-ARBEC Figure 60 A. Ils associent les données de P_{app} mesurées *in vitro* à un ratio d'exposition cérébrale qui est un ratio de la quantité d'anticorps dans le LCR et le plasma (Figure 60 B).

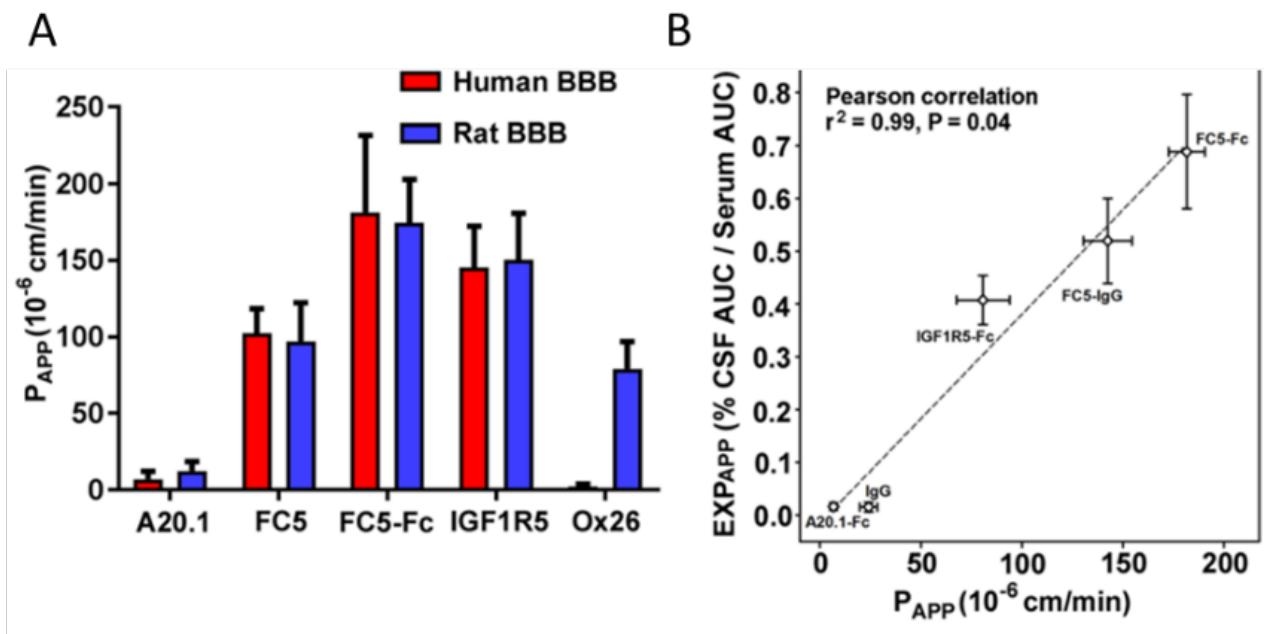


Figure 60 : Comparaison des résultats des anticorps FC5-IgG, FC5-Fc, IGF1R5-Fc et control (A20.1-Fc, IgG) A : Valeurs identiques des P_{app} mesurées dans un modèle de transcytose *in vitro* avec SV-ARBEK de rat ou de iBEC humains. B : Corrélation des données chez le rat entre les modèles *in vitro* et *in vivo* (336).

Il faut rester très prudent dans l'extrapolation et l'interprétation des résultats obtenus *in vitro* avec des biothérapeutiques (343). Les exemples de la littérature les plus convaincants de corrélations *in vitro* vs *in vivo* sont obtenus quand les modèles sont de la même espèce. Par ailleurs, les concentrations dans le LCR ne sont pas forcément toujours bien corrélées avec les concentrations cérébrales. Enfin, il faut garder à l'esprit que la pharmacocinétique et les effets pharmacologiques sont des phénomènes complexes et dynamiques résultant de la distribution, de l'élimination, de l'exposition cérébrale, de l'engagement du biothérapeutique sur les cibles. Il sera toujours difficile de prédire parfaitement l'exposition cérébrale *in vivo* d'un biothérapeutique par une simple approche *in vitro* (341).

3.1.5 Publication

La mise en place de notre modèle de BHE *in vitro* avec des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de primates non humains a fait l'objet d'une publication écrite par Catarina Chaves dans laquelle je suis co-autrice. Cet article "Non-Human Primate Blood–Brain Barrier and In Vitro Brain Endothelium: From Transcriptome to the Establishment of a New Model" est publié dans le journal « Pharmaceuticals »

Cette étude présente une comparaison du transcriptome des microcapillaires cérébraux fraîchement isolés et des cellules endothéliales cérébrales de primates non-humains sélectionnées *in vitro*. Nous avons étudié les jonctions serrées, les RMT et les transporteurs ABC et SLC par RNAseq. Les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales *in vitro* ont conservé la plupart des éléments clés de la BHE pour l'intégrité de la barrière et le contrôle du trafic moléculaire. La fonction de RMT a été caractérisée par l'étude de TFRC dans ce modèle NHP de BHE *in vitro*. Nous avons observé un passage augmenté de la transferrine humaine et l'anticorps anti-hTFRC du compartiment apical vers le compartiment basolatéral par rapport aux molécules témoins. En parallèle, nous avons étudié d'éventuelles différences de la BHE dans cinq structures cérébrales : le tronc cérébral, le cervelet, le cortex, l'hippocampe et le striatum. Notre analyse a permis de montrer une homogénéité dans l'endothélium cérébral entre ces différentes régions. Notre modèle de BHE *in vitro* dérivé de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de NHP imite étroitement la BHE physiologique, représentant ainsi un outil prêt à l'emploi pour évaluer la pénétration des produits biothérapeutiques dans le cerveau humain.



Article

Non-Human Primate Blood–Brain Barrier and In Vitro Brain Endothelium: From Transcriptome to the Establishment of a New Model

Catarina Chaves ¹, Tuan-Minh Do ¹, Céline Cegarra ¹, Valérie Roudières ¹, Sandrine Tolou ², Gilbert Thill ², Corinne Rocher ², Michel Didier ² and Dominique Lesuisse ^{1,*}

¹ Rare and Neurologic Diseases Research Therapeutic Area, Sanofi R&D, 91385 Chilly-Mazarin, France; catarina.chaves@sanofi.com (C.C.); Tuan-Minh.Do@sanofi.com (T.-M.D.); Celine.Cegarra@sanofi.com (C.C.); Valerie.Roudieres@sanofi.com (V.R.)

² Translational Sciences Unit, Sanofi R&D, 91385 Chilly-Mazarin, France; Sandrine.Tolou@sanofi.com (S.T.); Gilbert.Thill@sanofi.com (G.T.); Corinne.Rocher@sanofi.com (C.R.); Michel.Didier@sanofi.com (M.D.)

* Correspondence: dominique.lesuisse@sanofi.com; Tel.: +33-160496857

Received: 31 August 2020; Accepted: 9 October 2020; Published: 14 October 2020



Abstract: The non-human primate (NHP)-brain endothelium constitutes an essential alternative to human in the prediction of molecule trafficking across the blood–brain barrier (BBB). This study presents a comparison between the NHP transcriptome of freshly isolated brain microcapillaries and in vitro-selected brain endothelial cells (BECs), focusing on important BBB features, namely tight junctions, receptors mediating transcytosis (RMT), ABC and SLC transporters, given its relevance as an alternative model for the molecule trafficking prediction across the BBB and identification of new brain-specific transport mechanisms. In vitro BECs conserved most of the BBB key elements for barrier integrity and control of molecular trafficking. The function of RMT via the transferrin receptor (TFRC) was characterized in this NHP-BBB model, where both human transferrin and anti-hTFRC antibody showed increased apical-to-basolateral passage in comparison to control molecules. In parallel, eventual BBB-related regional differences were investigated in seven-day in vitro-selected BECs from five brain structures: brainstem, cerebellum, cortex, hippocampus, and striatum. Our analysis retrieved few differences in the brain endothelium across brain regions, suggesting a rather homogeneous BBB function across the brain parenchyma. The presently established NHP-derived BBB model closely mimics the physiological BBB, thus representing a ready-to-use tool for assessment of the penetration of biotherapeutics into the human CNS.

Keywords: blood–brain barrier; brain endothelial cells; non-human primate; receptor-mediated transcytosis; transcriptomics

1. Introduction

The blood–brain barrier (BBB) constitutes the main interface of molecular exchange between the periphery and the central nervous system (CNS) [1]. Given its extremely restrictive properties, the BBB plays a key role over the bi-directional passage of endogenous and exogenous compounds, and ultimately constitutes a formidable challenge for the entry of therapeutics into the brain [2]. In order to find new brain-specific mechanisms of transport and efficient CNS-active therapeutic alternatives, it is imperative to develop strategies to deepen the understanding of the BBB. Most in vitro BBB models derive from isolated brain capillary endothelial cells, from primary or immortalized cell line source, and rely on brain tissue from rat, mouse, porcine, bovine, and humans [3]. However, the underlying interspecies differences query the reliability and prediction capacity of most in vitro BBB models for the passage of therapeutic molecules across the human BBB and into the CNS [4,5].

More recently, human BBB models from induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived endothelial cells have been developed, but it is still uncertain to what extent they may recapitulate the BBB and predict *in vivo* exposures [6].

As access to fresh human brain tissue is extremely scarce, a non-human primate (NHP)-derived BBB model may represent a valuable replacing tool for the prediction of the passage of biotherapeutics across the human BBB. To this date, apart from a commercially available model [7] very few efforts have been made to develop an NHP-derived BBB model. Furthermore, as opposed to many omics studies reported on human brain [8–10], there is a considerable gap in sequencing and proteomic data published regarding the primate brain endothelium. Finally, even though distribution of some drugs within the brain have been documented [11], fundamental knowledge of the BBB in distinct regional brain structures is lacking.

The objective of the present study is: (1) to establish, characterize and validate an NHP BBB model using freshly isolated endothelial cells from microvascular brain vessels of *Macaca fascicularis* and (2) to molecularly assess potential regional differences of the BBB across five brain structures: brainstem, cerebellum, cortex, hippocampus, and striatum. The NHP-derived BBB model was characterized molecularly, using RNA sequencing (RNAseq) tools, and functionally by focusing on its capacity to predict receptor-mediated transcytosis (RMT) phenomena via the transferrin receptor (TFRC). Through an RNAseq approach, we compared the transcriptomic profiles of freshly isolated NHP-derived brain endothelial cells (BECs) with those set in culture in order to investigate their potential evolution over time and passage *in vitro*, along with a pairwise comparison of the transcriptomic profiles of the brain microvascular endothelial cells obtained from the aforementioned five brain regions.

In brief, *in vitro* selected NHP-derived BECs maintained the expression of key BBB features, endothelial cell markers, and activity for the transferrin receptor-mediated transcytosis, essential in the maintenance of the BBB role. The brain microvascular endothelium revealed few molecular differences from distinct regions, suggesting a closely homogeneous function of the BBB across the CNS. The present characterization of the NHP-derived BBB constitutes a potent tool for prediction of the BBB permeability *in vivo* to biologic compounds, and for the identification of new brain-specific mechanisms for improved drug delivery.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Male and Female *Cynomolgus* monkeys (*Macaca fascicularis*) aged from 4.8 to 5.9 years were purchased from Le Tamarinier and Noveprim Ltd. (Mahebourg, Mauritius). Six animals were group-housed in aviaries or interconnected mobile cages and two animals were individually housed in interconnected mobile cages. Animals were housed under controlled conditions (20–24 °C, 40–70% humidity, 10–15 renewals per hour of filtered, non-recycled air, 12-h light cycle) with free access to filtered tap water and daily distribution of expanded diet (SDS, France) and fruits or vegetables. Animals used for the isolation of brain microvessels were at disposal following pre-clinical studies. Prior to the isolation of brain cortical microvessels, animals were submitted to a washout period of a minimum of 1 month. All animal experimental protocols were reviewed and approved by the Ethics Committee for the Protection of Laboratory Animals (CEPAL #21) of Sanofi, Vitry-Alfortville Research Center, France, and are in compliance with the ARRIVE guidelines

2.2. Isolation of Brain Microvessels from Cynomolgus Monkey Cortex, Brainstem, Cerebellum, Hippocampus and Striatum

Brains from Cynomolgus monkeys were collected shortly after the euthanasia of the animal into ice-cold Hibernate A medium (ThermoFisher, Illkirch-Graffenstaden, France). All subsequent steps were performed at 4 °C and under a biological safety cabinet. Brain cortex, brainstem, cerebellum, hippocampus, and striatum structures were isolated, and the subsequent brain tissue placed in petri dishes containing ice-cold HBSS. The meninges and the cortical white matter were removed. The collected tissues were transferred into a new sterile container with HBSS, finely minced with a scalpel, and then pelleted by centrifugation (5 min at 600× g, 4 °C). The pellet was resuspended in a collagenase/dispase[®] solution (Roche, Meylan, France, Collagenase 0.1 U/mL; Dispase 0.8 U/mL prepared in Ca²⁺/Mg²⁺ free HBSS) containing type I DNase at 20 U/mL and TLCK at 0.147 µg/mL, and incubated at 37 °C for 60 min, under vigorous agitation. The digested tissue was carefully homogenized, and centrifuged for 5 min at 600× g, 4 °C. The resultant pellet was resuspended in HBSS containing 20% BSA and centrifuged at for 30 min at 2000× g, 4 °C. The myelin ring-containing supernatants were discarded, and the vessel-containing pellet was resuspended and re-incubated in the collagenase/dispase[®] solution in presence of DNase and TLCK for 30 min at 37 °C. This suspension was re-pelleted by centrifugation (5 min at 600× g, 4 °C), and the final pellet (named P0D0 fraction from this point onwards) is resuspended in endothelial cell medium (EBM-2 supplemented with Kit EGM-2 MV SingleQuots, Lonza, Basel, Switzerland) containing 3 µg/mL puromycin, before set up in pre-coated (collagen IV 100 µg/mL, fibronectin 10 µg/mL, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) cell culture flasks, and incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 7 days. Every 2 days the cell medium was changed and the supplemented puromycin concentration lowered to 2 µg/mL, and subsequently removed. Following 7 days of expansion, BECs from cortex, but not from the other 4 brain structures (named P0D7 fraction from here onwards) were further singularized and re-plated de novo for further 7-day cell expansion (P1D7) (Figure 1A).

2.3. Transcriptome Sequencing (RNAseq) and Expression Analysis

2.3.1. RNA Samples for Library Preparation

Frozen cell pellets from the cellular P0D0 (cortex), P0D7 (cortex, brainstem, cerebellum, hippocampus, striatum) and P1D7 (cortex) fractions were lysed using QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, #79306, Courtaboeuf, France). Total RNA was then isolated from the lysates on a QIAcube instrument (Qiagen) using the RNeasy Mini QIAcube kit (Qiagen, #74116) and following the manufacturer's instructions. The RNA concentration was determined using the Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen, #Q32852, Illkirch-Graffenstaden, France) and the quality and integrity (RIN) was assessed on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology, Les Ulis, France) with an Agilent RNA 6000 nano kit (Agilent Technology, #5067-1511).

2.3.2. RNA Sequencing (RNAseq)

The RNAseq libraries were prepared with 30 ng of input total RNA using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, #E-7765S, Évry-Courcouronnes, France) with the NEBNext rRNA Depletion Kit (New England Biolabs, #E6310L) and following the manufacturer's instructions. The libraries were then paired end sequenced (75 cycles \times 2) on the NovaSeq 6000 instrument (Illumina, Paris, France) using the NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (300 cycles; #20027465, Illumina).

RNA-seq data analysis was performed using ArrayStudio (Qiagen, Courtaboeuf, France). Briefly, raw data QC is performed then a filtering step is applied to remove reads corresponding to rRNAs as well as reads having low quality score or shorter than 25 nt. Reads were further mapped to the Cyno.WashU 2013 genome, based on the contigs assembled from a WGS project submitted by Washington University (WashU) in 2013, using OSA4 [12] (Omicsoft Sequence Aligner, version 4, Qiagen) and quantified using Ensembl.R94 model of transcriptome, paired reads were counted at gene level. Differential analysis of gene expression was performed at gene level using DESeq2 [13]. The variable multiplicity was taken into account and false discovery rate (FDR) adjusted p-values calculated with the Benjamini-Hochberg (BH) correction [14]. Functional analysis of differentially expressed genes was performed using IPA (Qiagen) [15]. Gene Set Enrichment analysis was performed using Ingenuity and GSEA software [16,17]. High-throughput sequence data are available on the Gene Expression Omnibus (GEO) under the GSE154901 accession number. Read depth from RNAseq was counted as fragments per kilobase per million mapped fragments (FPKM). FPKM read counts were obtained for each BEC fraction (P0D0, P0D7, P1D7). A minimum of 1 FPKM in at least half of the observations per group, and in at least one of the groups, was required for a gene to be considered as expressed and included in the analysis.

2.4. Co-Culture Experiments

NHP-derived BECs were seeded onto 12-well plate transwells (Corning Transwell polycarbonate filters, 0.4 μ m pore diameter; 1.12 cm², Corning, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France), previously coated with collagen IV/fibronectin (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) at a density of 60,000 cells/well in supplemented EBM-2 medium. Immediately following plating, BEC-coated transwells were then placed into plates with either no other cell type (monoculture), or with rat primary astrocytes (80,000 cells/well) plated onto the bottom of the plate 4 days before, in MEM- α /F-12 cell medium (1:1), 10% FBS, 1% PSN and 5 ng/mL bFGF. All transcytosis experiments occurred immediately following 4 days or 7 days in monoculture or co-culture.

2.5. Resistance Measurements

Trans-endothelial electrical resistance (TEER) was measured every 24 h following the sub-culture of BMECs onto transwell filters. Resistance was recorded using an EVOM2 epithelial voltohmmeter coupled to a cell culture cup chamber (ENDOHEM-12G) (World Precision Instruments, Hitchin, Hertfordshire, United Kingdom). TEER values were presented as $\Omega \times \text{cm}^2$ following the

subtraction of an un-seeded Transwell and multiplication by 1.12 cm² to account for the surface area. TEER measurements were taken three independent times on each sample and at least in triplicate filters for each experimental condition.

2.6. *In Vitro* Transcytosis and Permeability Measurements

Test (2 µg/mL human holo-Transferrin or 1 µg/mL of internally developed anti-human/cynomolgus TFRC antibody) and control molecules (10 µg/mL of FITC-coupled 70 kDa Dextran or 1 µg/mL mouse IgG, clone MG1-45, BioLegend) were added onto the upper chamber on day 4 (96 h following NHP-derived BMEC seeding on transwell). Fresh EC medium with none of these compounds was added onto the bottom chamber. Final aliquots from both chambers were taken 240 min following incubation at 37 °C, 5% CO₂. Compound levels in mother solutions ($T = 0$ min), upper and lower compartments ($T = 240$ min) were determined by electrochemiluminescent immunoassay (MESOQuickPlex SQ120, MesoScale Discovery, Rockville, MD, USA) and by fluorescence measurement (485 nm excitation and 530 nm emission, using a multiwell-plate reader). Permeability coefficients were calculated based on the cleared volume of Dextran or holo-Transferrin from the top chamber to the bottom chamber using the following formula:

$$P_{app} \text{ (cm/min)} = \left(\frac{V}{A \cdot C_{luminal}} \right) \cdot \left(\frac{C_{abluminal}}{t} \right) \quad (1)$$

where V = volume of cell medium in the bottom chamber (mL), A = surface area of the insert (cm²), $C_{luminal}$ = compound concentration loaded in the upper chamber (µM), $C_{abluminal}$ = compound concentration measured in the bottom chamber (µM); t = time of the assay (min).

2.7. Western Blot

NHP-derived BECs were lysed using ice-cold RIPA buffer (CST) containing protease inhibitor cocktail (ThermoFisher). Lysates were sonicated for 5 min, centrifuged at 15,000× g for 15 min, and supernatant fractions were collected. These were loaded into 4–12% Tris-Glycine SDS-page gels (Invitrogen, Illkirch-Graffenstaden, France), and let to migrate for 1h at 180V. Samples were then transferred onto PVDF membranes using an iBlot™ 2 Dry Blotting System (Invitrogen) on the P0 program (20 V for 1 min, 23 V for 4 min, 25 V for 2 min). PVDF membranes were then rinsed with Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) and blocked for 1 h in 5% non-fat dry milk in TBST (blocking buffer). Membranes were first probed overnight at 4 °C with primary antibodies in blocking buffer, and then probed with secondary antibodies diluted in TBST for 1 h at room temperature (1:10,000 diluted HRP-coupled goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG, GE Healthcare). Following secondary antibody incubation, membranes were rinsed thoroughly with TBST, imaged using a LICOR Odyssey Imager and bands quantified using Multi-Gauge v3.0.

2.8. Immunocytochemistry of Tight Junctions

Immunocytochemistry was conducted on NHP-derived BECs following mono-culture conditions. Cultured cells were fixed in 4% p-formaldehyde for 15 min, at room temperature, and subsequently permeabilized and blocked in Blocking Buffer Odyssey LiCor containing 0.2% Triton X-100. Primary antibodies were incubated overnight (Anti-Claudin 5 Monoclonal (4C3C2) 1:200 #35-2500; Anti-ZO-1 Polyclonal, 1:200 #61-7300; Anti-Occludin Monoclonal (OC-3F10), 1:100 #33-1500, ThermoFisher; Anti-VE Cadherin Polyclonal, 1:500 #ab33168, Abcam, Amsterdam, The Netherlands), and appropriate secondary antibodies conjugated with Alexa fluorophores (Invitrogen) and Hoechst 33432 (Invitrogen) for nuclei staining were subsequently used. Images were acquired on a Perkin Elmer Operetta CLS™ system.

2.9. Statistical Analysis

The statistical significance of differences between groups was analyzed using GraphPad Prism v7.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) t -test (unpaired, parametric, equal standard

deviation, two-tailed), Mann–Whitney *t*-test (unpaired, nonparametric, two-tailed) and Friedman test (matched data, nonparametric) with post hoc Dunn's multiple comparison test. The application of these statistical methods to specific experiments is noted in the figure legends.

3. Results

3.1. Transcriptional Profiling of Brain Microvasculature

For the detection of differentially expressed genes, we performed statistical analysis with DESeq2 [13]. Transcriptional profiles of the different cortical EC populations were compared to one another, while ECs from different brain regions were compared to those obtained from brain cortex, always using a threshold of 1.5-fold difference in the expression and a BH-adjusted *p*-value ($p_{\text{adj}} \leq 0.05$).

In the principal components analysis (PCA), a clustering of independent replicates is seen for each fraction, supporting a low variability between independent samples (Figure 1(B1)). The PCA of the different endothelium transcriptomes also evidences that brain ECs set in culture (P0D7, P1D7) have molecular signatures that are relatively distinct from the freshly obtained BEC-enriched fraction P0D0 (Figure 1(B1)). Such difference of P0D7 and P1D7 towards the P0D0 fraction is partially due to the presence of RNA from cell types other than endothelial cells in the P0D0 fraction. In fact, the enzymatic digestion and gradient centrifugation procedure used for obtention of brain microvessels (P0D0) yields a highly enriched fraction yet presents RNA of pericyte, glial, neuronal, and circulating blood cell origin. This also explains the important set of genes seeing their expression downregulated in P0D7 vs. P0D0 (5089 out of a 13,485 gene population, see Figure S1). On the other hand, an up-regulation of 3884 out of 13,485 genes is seen from P0D0 to P0D7 (≥ 1.5 -fold, $p \leq 0.05$), most probably representing endothelial-specific genes, and thus reflecting the *in vitro* selection of the endothelial cell population. The degree of purity of P0D0 and *in vitro*-selected P0D7 and P1D7 samples was assessed through probing the transcriptome data for the expression of 5 acknowledged cell type specific genes [18–21] for astrocytes (*BMP1B*, *GFAP*, *ALDH1L1*, *SOX9*, *AQP4*), neurons (*TMEM130*, *RELN*, *STMN2*, *SYT1*, *SYN1*), oligodendrocytes (*MAG*, *PLP1*, *MOG*, *MOBP*, *MBP*), and microglia (*AIF1*, *C1QA*, *C1QB*, *CX3CR1*, *TNF*), and 10 genes for endothelial cells (*SLC2A1/GLUT1*, *EPAS1*, *ITM2A*, *CLDN5*, *BSG*, *CD34*, *VWF*, *PECAM1*, *CDH5*, *ESAM*) (Figure 1(B2)). All non-endothelial cell markers see their expression being switched-off in P0D7 and P1D7 cell populations, while the expression of the selected endothelial genes is either maintained or even increased in both the P0D7 and P1D7 cell populations, in comparison to P0D0 (Figure 1(C1)).

All BEC samples from five brain regions (brainstem, cerebellum, cortex, hippocampus, striatum) qualified according to the raw data quality control analysis, with the exception of 2 cerebellum with low RNA levels (consequently excluded from the subsequent analyses). The PCA analysis and hierarchical clustering suggest low variability between independent samples (Figure 1(B2)), and similar molecular signatures of endothelium transcriptomes from different brain structures as no distinct clustering of samples belonging to the same structure is formed (Figure 1(C2)). Accordingly, only 173 genes were found to be differentially expressed (fold-change $> \pm 1.5$, $p < 0.05$) in BECs from other brain structures vs. those from brain cortex (Figure S2).

3.2. Endothelial Junction Mediators: Expression Levels and Transcriptional Changes

The present RNAseq analysis evidences *CLDN5* as the major claudin transcript present in the cynomolgus brain vasculature, but *CLDN1*, *CLDN12*, and *CLDN15* expression at the 3 different *in vitro* stages is also detected, at considerably lower levels (Figure 2A). *CLDN3* and *CLDN6*, previously reported at the mouse BBB [22,23] were not detected. Other key participants in the formation of tight junctions at the BBB, in particular JAMs (*F11R*, *JAM3*), *TJP1* (ZO-1), and cadherins *CDH5*, *CDH2*, and *ESAM* seem to maintain high levels of expression in isolated BECs, even after sub-culturing *in vitro* (Figure 2A). *JAM2* and to a lesser extent *OCLN* are progressively downregulated from P0D0 to

P1D7, but present nonetheless relevant levels of expression. The expression of *CTNNB1* (β -catenin), regulator of CNS-specific angiogenesis and of the expression of tight junctions at the BBB [23–26], is dominant over the three endothelial fractions, along with other genes associated to tight junction correct assembly and maintenance, such as *USP53*, *PDCD6IP*, *ARHGEF2*, *MPDZ*, and *AMOTL1-2* (Figure 2A), further sustaining the robustness of the NHP-derived BBB model. Lipolysis stimulated receptor (*LSR*), although downregulated (3.5-fold, $p < 0.001$, P0D7 vs. P0D0), together with stable levels of *CGNL1* *MARVELD2* found in vitro, which are known to participate in the formation of epithelial and endothelial junctions, and enriched in mouse BECs versus periphery [27,28] were also identified in our analysis.

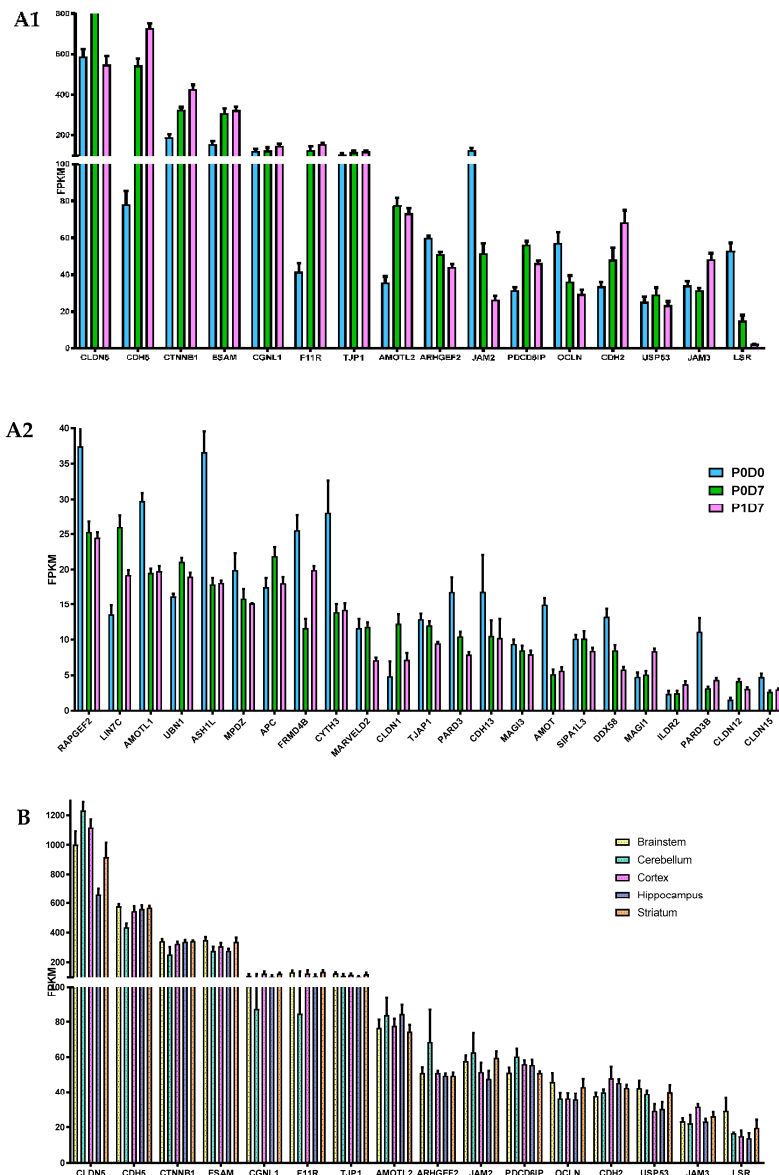


Figure 2. Comparison of the expression levels of several molecular participants in the formation of tight junctions at the brain microvasculature. (A) Gene levels of tight junction elements are globally maintained across P0D0, P0D7 and P1D7 fractions, where (A1) represents the most expressed genes associated with tight junction formation and regulation, and (A2) genes showing lower average FPKM values. Results are expressed as average FPKM and are expressed and mean \pm SEM ($n = 6-8$). (B) Comparison of the expression levels of several molecular participants in the formation of tight junctions in brain microvascular endothelial cells from 5 different brain regions. Results are expressed as average FPKM and are expressed and mean \pm SEM ($n = 2-8$).

Most major participants in the regulation and formation of cellular junctions, such as *CDH5*, *TJP1*, or *OCLN*, did not see their expression levels differ between endothelial cells obtained from the brain microvasculature of the five analyzed regions, except for increased transcript levels of *CLDN5* and *CLDN1* found in BECs from the brainstem and cortex vs. hippocampus ($p < 0.05$).

3.3. Transporter Systems at the BBB: Expression Levels and Transcriptional Changes

3.3.1. Receptor-Mediated Transcytosis

RMT constitutes a reference strategy to overcome the BBB and promote efficient and specific delivery into the CNS of therapeutic agents. TFRC, highly expressed and enriched in the brain microvasculature [29,30], and the only validated RMT-mechanism evidencing an enhanced brain exposure of biotherapeutics [31–35], sees its expression levels being downregulated from P0D0 to P1D7, but retaining substantial expression levels in vitro (Figure 3A). Insulin receptor (INSR) [36–39], LRP1 [37,40–42], IGF1R [43], LDLR [44], basigin (BSG), and SLC2A1/GLUT1 [37] have been targeted using antibodies and/or peptides as attempts to improve brain uptake, but such studies did not generate much encouraging results. Shuttles targeting novel receptors have also been described, such as SLC3A2/CD98hc [37] and TMEM30 [45,46], yet poorly characterized. A sustained relevant expression from P0D0 to P1D7 is seen for the transcript levels of most of these receptors, except for *LRP1*, which is considerably suppressed in vitro (Figure 3(A1)). The absent expression of *LRP1* is coherent with previous findings revealing strong LRP1 expression levels found in pericytes [47,48] but not in selected brain endothelial cells [47,49]. *TMEM30A* and *IGF2R* levels see a relative increase in vitro, likely due to the endothelial cell selection in culture. Expression levels of *TFRC* did not differ between endothelial cells from the different analyzed brain structures (Figure 3B). Increased *IGF2R* and *TMEM30A* transcript levels were found in the brainstem-derived endothelium vs. cortex-derived endothelium ($p < 0.05$), while *INSR* showed to be significantly inferior in hippocampus vs. brainstem (≥ 1.5 -fold change, $p < 0.05$, vs. striatum and cortex (≥ 1.5 -fold change, $p > 0.05$)).

Clathrin [36,50–52] and caveolin-mediated endocytosis [53–56] constitute the major pathways of internalization in RMT. The expression of clathrin (*CLTC*), caveolin-1 and 2 (*CAV1*, *CAV2*) found in P0D0 brain microvessels is up-regulated and preserved at P0D7 and P1D7 timepoints (Figure 3(A2)). Transcript levels of *MFSD2A* are downregulated in vitro, suggesting a suppression of the negative regulation of caveolae formation, which may consequently be exacerbated in this context (Figure S3). No gene implicated in RMT internalization pathways registered a differential expression pattern in BECs obtained from the different five brain regions.

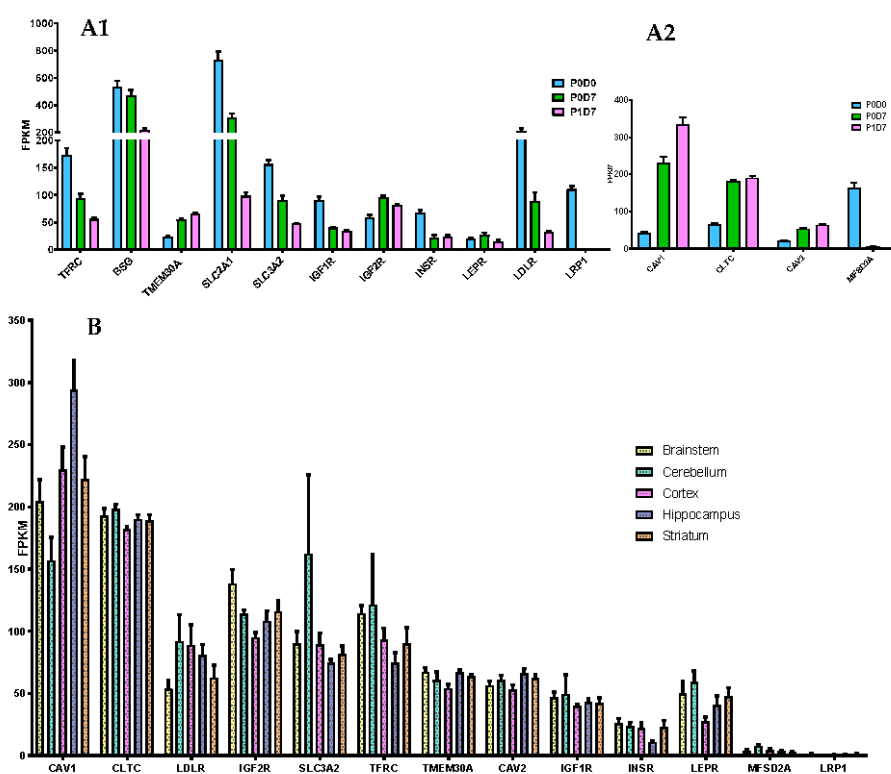


Figure 3. Expression of receptors capable of mediating transcytosis. (A) Comparison of the expression levels (FPKM) of selected receptors (A1) and key internalization pathway genes (A2) present in the brain microvascular P0D0, P0D7 and P1D7 fractions. Results represent average FPKM and are expressed as mean \pm SD ($n = 6-8$). (B) Comparison of the expression levels (FPKM) of selected receptors and key internalization pathway genes present in the brain microvascular endothelial cells from different brain regions. Results represent average FPKM and are expressed as mean \pm SEM ($n = 2-8$).

3.3.2. Carrier Transporters

Comparison of Cortical Brain Endothelial P0D0, P0D7 and P1D7 Fractions

The presence of cell membrane transporters at the BBB allows a perfect control of the flux of molecules between the blood and the brain, either by efflux ATP-binding cassette (ABC) transporters (e.g., ABCB1/MDR1/P-glycoprotein) [57], or highly specific solute carriers (SLC) (e.g., SLC2A1/GLUT1) [58]. Expression trends of such transporters were therefore investigated across the three studied cell fractions. Based on the overall samples, we detected a total of 398 transporters, 249 of these detectable at ≥ 1 FPKM in at least half of the samples from at least one of the analyzed groups.

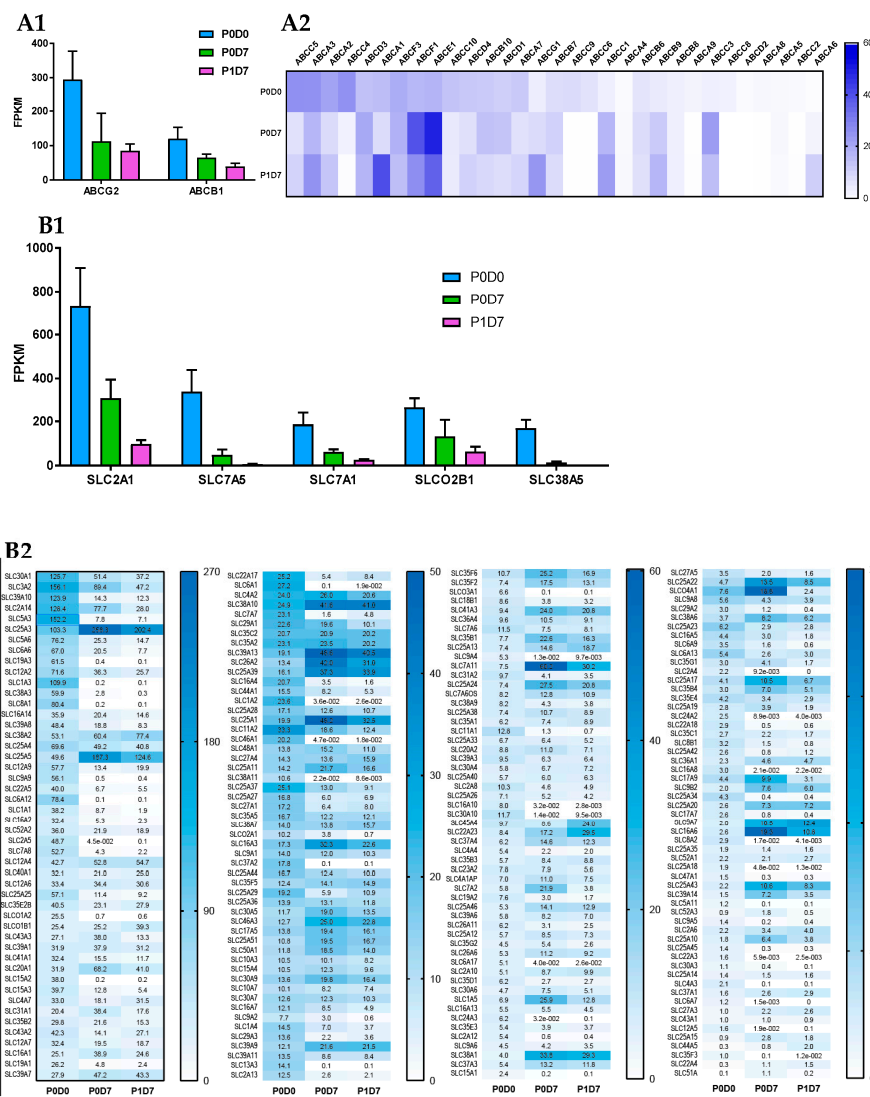
ABC transporters: Known major drug efflux transporters, like ABCG2 (BCRP) and ABCB1, presented the highest expression levels among the 33 ABC transporters found in the three studied endothelial cell populations. ABCG2 and ABCB1 transporters were downregulated in vitro, but nonetheless remained the most expressed ABC transporters in the P0D7 and P1D7 sampling groups (Figure 4A). ABCC4 expression levels showed to be third highest among ABC transporters in the P0D0 fraction, but its expression is considerably depleted in vitro. Similarly, ABCC6 and ABCC9 were detected in freshly isolated brain microvessels, followed by downregulation in vitro. ABCC9, but not ABCC6, have previously been reported to be present at the BBB microvasculature [59,60], but it likely originates from pericytes [61]. On the other hand, expression of ABCC1 is considerably upregulated from P0D0 to P0D7 and P1D7 culture conditions (despite controversial prior reports [62–64]), and similar trends are also observed for ABCB9 (reported in rat brain microvessels [60], ABCC3 and the lipid transporter ABCG1 (reported in porcine brain endothelium [65]). The upregulation of these 5 ABC transporters versus P0D0 is most likely due to the positive selection of endothelial cells in culture, and not a cell

derivation in vitro, given that these very same five ABC transporters showed to be positively correlated with the trend of *PECAM1* expression across the three endothelial cell fractions (Pearson correlation, $p < 0.001$, Figure S5). Other transporters which showed considerable expression at P0D0 and for which their expression was relatively maintained in vitro are the cholesterol efflux transporters *ABCA1*, *ABCA2* (reported in human brain microvessels [66,67]) and *ABCA3*, the multidrug transporter *ABCC5*, but also those of *ABCD3* [60], *ABCE1* (expression associated with cell growth and apoptosis inhibition) and *ABCF1* (Figure 4A), for which the eventual played role at the BBB is absolutely unknown. A global heatmap plot representation of a hierarchical clustering of the FPKM variability of ABC transporters expressed genes across fractions is available in Figure S4.

SLC transporters: The SLC superfamily comprises known transporters of energy metabolites (e.g., SLC2A, SLC16A families), amino acids and neurotransmitters (e.g., SLC1A, SLC7A families), ions (e.g., folate/thiamine transporter family SLC19A, zinc transporter family SLC39A), organic anions (SLCO family), organic cations (SLC22A family), and others. Transporters such as SLC2A1 (GLUT1) [68,69], SLC7A5 (LAT1) [70,71], SLC7A1 (CAT1) [72], or SLCO2B1 (OATP2B1) [73,74] are known to participate in mediated-transport at the BBB. The analysis of the transcriptomic data indicates that the glucose transporter *SLC2A1*, the amino acid transporters *SLC7A5*, *SLC7A1* and *SLC3A2* (the latter known to form heterodimers with SLC7 family members, e.g., with SLC7A5 to form the neutral large amino acid transporter LAT-1), *SLCO2B1*, but also *SLC38A5* [75,76] (SNAT5, carrier for glycine, alanine, serine, glutamine, asparagine, and histidine) are the most abundantly expressed SLC transporters in P0D0 (Figure 4B). Their expression was downregulated in P0D7 and P1D7 endothelial fraction yet maintaining relevant levels of expression as they remained the most expressed SLCs. *SLC7A5* and *SLC38A5* although known to be prominently expressed at the BBB [76–78] represented important exceptions as their expression dramatically dropped from an average 339 or 169 FPKM, respectively, at P0D0 to approximately 6 and 2 FPKM, respectively, at P1D7. As SLC7A5 heterodimerizes with SLC3A2 to function as a sodium-independent, high-affinity transporter mediating uptake of large neutral amino acids such as phenylalanine, tyrosine, L-DOPA, leucine, histidine, methionine and tryptophan, its modest expression might limit the formation of such complexes and partially compromise LAT-1 activity. Expression of *SLC7A11* (xCT, cystine/glutamate antiporter, also forming dimers with SLC3A2) is considerably upregulated in vitro, finding that has already been described [75], and which is associated with increased oxidative stress conditions [79]. Given the similar transcript levels of SLC3A2 and SLC7A11 found at P0D7-P1D7, formation of this heterodimer in vitro should be sustained.

Some SLC38A transport family members (Na⁺-dependent transport of neutral amino acids), namely *SLC38A1* (transport of glutamine), *SLC38A2*, and *SLC38A10* (proton antiporter, orphan transporter) are mainly upregulated in vitro, and account for high levels of expression among SLCs, notably *SLC38A2* (Figure 4B). Other simple sugar transporters from the SLC2A family were found to be significantly expressed in the cynomolgus brain microvascular enriched fraction, such as *SLC2A5* (corroborated by [80]) and *SLC2A13-14*. Although the expression of *SLC2A5* was also depleted in vitro, an important expression of both *SLC2A10* and *SLC2A14* was found at both P0D7 and P1D7. The expression levels of some SLC12A (cation-coupled chloride transporters)—*SLC12A2*, *SLC12A4*, *SLC12A6*—and SLC16A (proton-coupled monocarboxylate uptake, such as lactate and pyruvate, but also drugs, including statins) members—*SLC16A1*, *SLC16A3*, *SLC16A14*—were also among the most relevant SLC transporter expressed at the cynomolgus BBB, coherent with previous reports [81,82], and whose levels of expression were maintained in vitro. On the other hand, even though a broad expression level was found at P0D0 for *SLC16A2*, known to carry cellular import of thyroid hormones, its expression was substantially downregulated across both P0D7 and P1D7 fractions. High levels of expression of SLC25A transporter family members (mitochondrial carriers, e.g., exchange of ADP/ATP, citrate, phosphate), namely *SLC25A1*, *SLC25A3*, *SLC25A4*, *SLC25A5*, were also observed from P0D0 to P0D7/P1D7 conditions (Figure 4B). They account for nine out of 25 SLC transporter expression positively correlated with the expression of *PECAM1* across the three endothelial cell populations (Figure S5).

Other SLC transporters found to be present across the three endothelial cell fractions are the zinc efflux family SLC30A (*SLC30A1*, *SLC30A9*) and the zinc uptake family SLC39A (*SLC39A1*, *SLC39A7*, *SLC39A9*, and *SLC39A13*), suggesting the importance of the fine tuning of the zinc intracellular concentration levels for the cellular homeostasis and proper functioning. Our present findings allow to better establish a set of BBB highly expressed transporters which may provide novel insights into its role for the maintenance of the CNS homeostasis and nutrient requirements, but also for identifying novel molecules to target to enhance drug delivery into the CNS. A global heatmap plot representation of a hierarchical clustering of the FPKM variability of SLC transporters expressed genes across the 3 fractions can be consulted in the (Figure S4).



Comparison of Brain Microvascular Endothelial Cells from 5 Brain Regions at POD7

No ABC transporter genes were found to be differentially expressed in the brain endothelium from either brainstem, cerebellum, hippocampus, or striatum in comparison to that from brain cortex. As in the cortical-derived brain endothelium, *ABCG2*, *ABCB1*, and *ABCE1* were the most expressed ABC transporters at the BBB from the analyzed four brain regions (Figure 5A). *ABCG2* levels displayed a tendency to be higher in the brainstem and striatum when opposed to those from cortex and hippocampus. *ABCA6* expression levels also showed trendily increased in hippocampus-derived endothelial cells versus brain cortex, although with no statistical difference (≥ 1.5 -fold change, $p > 0.05$).

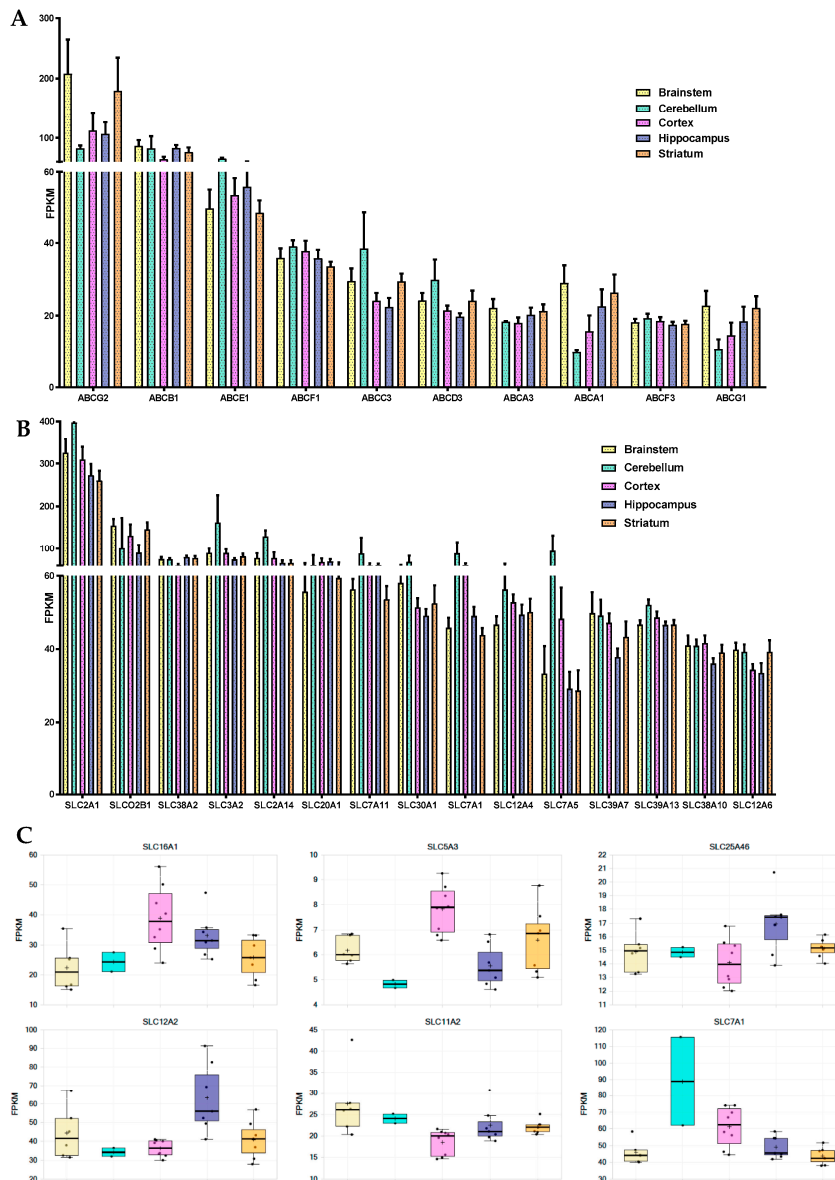


Figure 5. Differences in the mRNA levels of ABC and SLC transporters in the brain endothelium from brainstem, cerebellum, cortex, hippocampus and striatum. (A) Representation of the 10 ABC transporters with highest transcript levels in BECs from across the 5 studies brain regions. Expression levels are represented as average FPKM \pm SEM. (B) Representation of the 15 SLC transporters (typically at plasmatic membrane, excludes SLC25A family, mitochondrial transporters) with highest transcript levels in BECs from across the 5 studies brain regions. Expression levels are represented as average FPKM \pm SEM. (C) Representation of the 6 SLC transporters for which there is a differential expression ($p < 0.05$) in BECs cultivated from a given brain structure in comparison to another brain region.

The 16 SLC transporters found to be differentially expressed across the endothelium from the 5 brain structures are represented in Figure 5C. Among the SLC transporters with the highest expression levels across the five studied structures are *SLC2A1*, *SLCO2B1*, *SLC38A2*, *SLC3A2*, *SLC2A14*, and *SLC20A1* (Figure 5B). Endothelial cells derived from the hippocampal BBB were shown to be richer in *SLC12A2* and *SLC25A46* in comparison to cortex, but poorer in *SLC5A3* ($p < 0.05$). Levels of expression of *SLC7A1* and *SLC16A1* were found to be lower in BECs from both brainstem and striatum in comparison to brain cortex, while levels of *SLC11A2* were shown to be higher in brainstem vs. brain cortex endothelial cells ($p < 0.05$).

Cerebellum-derived brain endothelial cell transcript levels of *SLC3A2*, *SLC1A5*, *SLC7A1*, *SLC7A5*, *SLC6A9*, and *SLCO4A1*, although with no statistical value given its size sample ($n = 2$), showed to be increased than those found in the brainstem, striatum, and hippocampal BBB. The expression of other major SLC transporters in BECs, such as *SLC7A11*, *SLC30A1*, or *SLC12A4*, did not seem to differ between the five studies brain structures.

3.4. Function of Transferrin Receptor-Mediated Transcytosis

Following puromycin purification in vitro during the P0 selection, NHP-derived BECs at P1 evidenced the formation of a tight monolayer, continuous and with growth inhibition at confluence. NHP-derived BECs at P1 in monoculture or co-cultured with rat astrocytes were set in culture for four (P1D4) or seven (P1D7) days for further molecular and functional characterization. Paracellular permeability of the endothelial layer was also monitored through TEER measurement, where monolayers in monoculture presented a maximal $140 \Omega \cdot \text{cm}^2$, while brain endothelial monolayers in co-culture with astrocytes evidenced a maximal TEER of $245 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Figure 6A). The expression of claudin5, ZO-1 and occludin proteins were found at the cell-cell junctions (Figure 6B). Time in culture or co-culture with astrocytes represented no changes in the protein expression in P1D7 vs. P1D4 regarding claudin5, ZO-1, and occludin (Figure 6C), except for VE-cadherin (1.4-fold decrease found by WB, $p < 0.001$, Figure 6C). TFRC-mediated transcytosis activity was investigated by measuring the transport of human holo-transferrin from the apical to the basolateral compartment (Figure 7A), which showed to be significantly higher vs. Dextran 70 kDa, used as marker of paracellular passage (3.2-fold, $p < 0.001$, Figure 7B). TFRC-mediated transcytosis activity was statistically no different when NHP-BECs were co-cultured with or without astrocytes for seven days (P1D7). Similarly, the RMT transport of an internally developed antibody against the human and cynomolgus TFRC, was evaluated in the present model (co-culture with rat astrocytes, P1D4) vs. a control mouse IgG. A 5.7-fold higher apparent permeability was found for the anti-TFRC antibody vs. control mouse IgG (Figure 7C, $p < 0.001$). Taken together, these results indicate TFRC actively participates in RMT in the BEC-derived model.

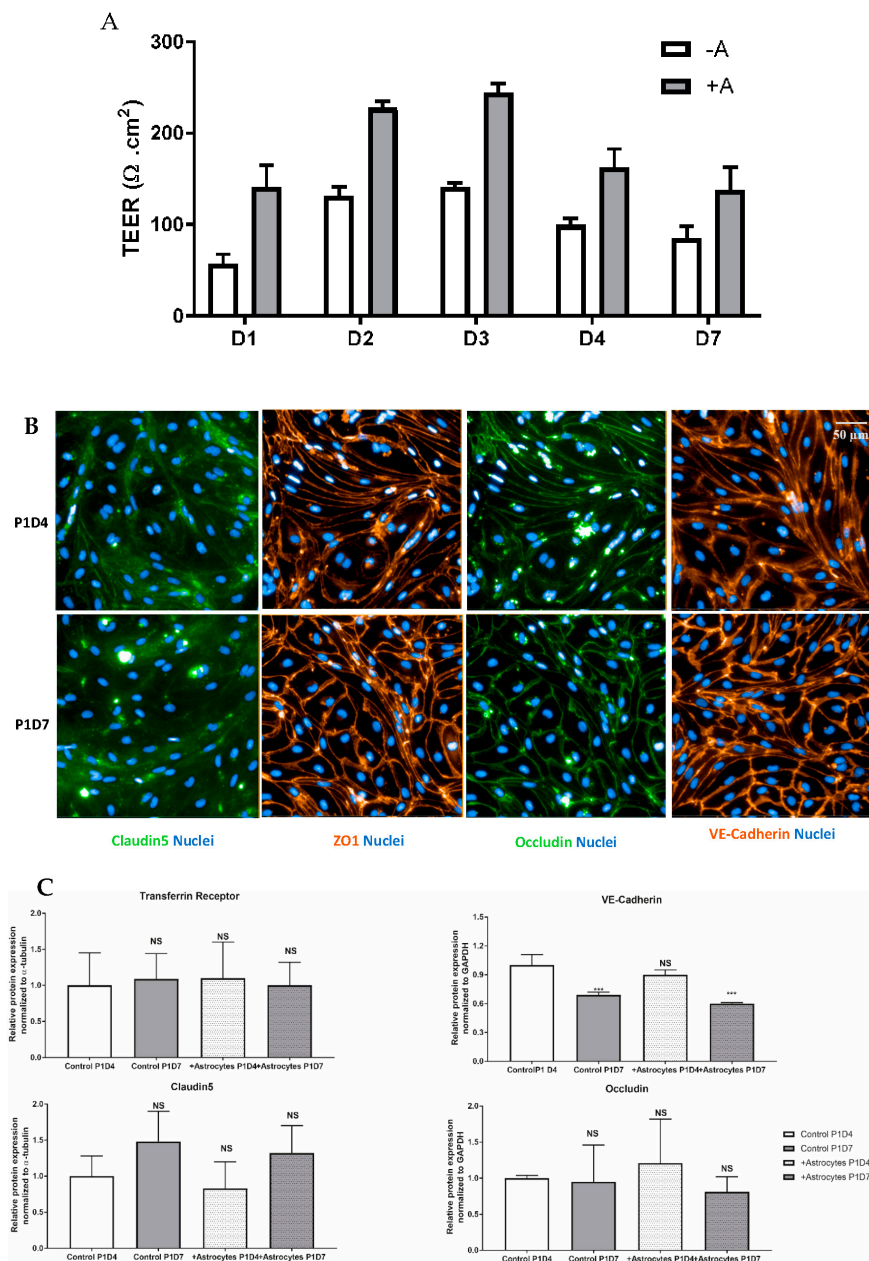


Figure 6. Profiling of essential proteins for maintenance of a BBB phenotype and transport properties in NHP-derived BECs. (A) TEER values registered across endothelial cells following several days in monoculture (−A) or in co-culture with astrocytes (+A). Data are presented as mean values from 3 independent experiments, each containing 4–8 filter inserts. (B) Immunofluorescence staining of several cell-cell junction proteins in BECs. Protein staining was obtained in the NHP-derived BBB model at P1 following either 4 or 7 days in vitro (P1D4 and P1D7, respectively) in the absence of primary rat astrocytes. (C) Relative protein expression of cell-cell junction and TFRC proteins in BECs. Relative protein levels were obtained in the NHP-derived BBB model at P1 following either 4 or 7 days in vitro (P1D4 and P1D7, respectively) in the absence or presence of primary rat astrocytes (control and +Astrocytes, respectively) and were assessed by western blotting (levels normalized to α -tubulin). Results are expressed and means of each group \pm SD ($n = 3$ independent experiments); p -values were obtained by One-way ANOVA with Dunnett’s multiple comparison test vs. Ctrl P1D4 groups, NS = $p > 0.05$, * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$.

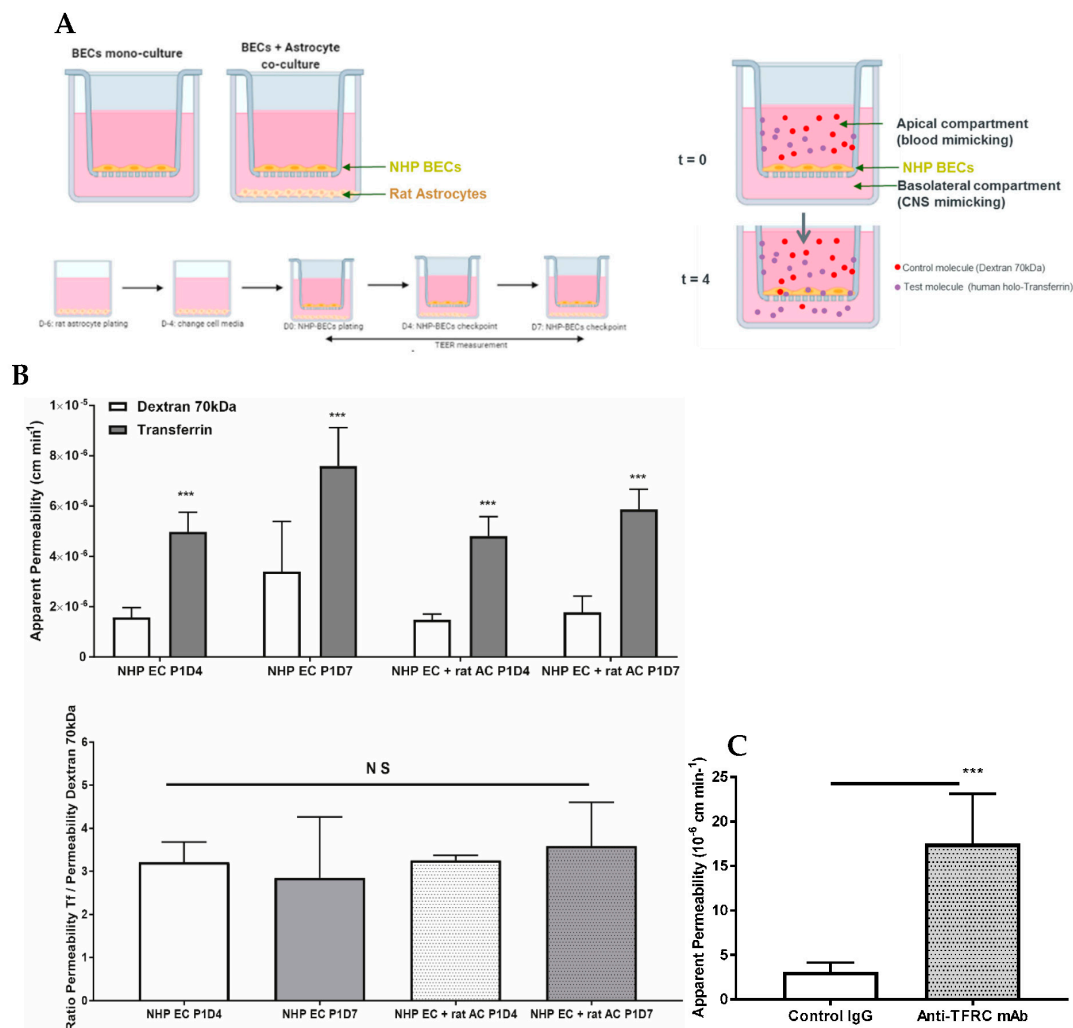


Figure 7. Proof of concept of the use of the present NHP-derived BBB model for evaluation of the apical to basolateral passage of selected molecules. (A) Schematic representation of the set-up of NHP-derived BBB model. NHP-derived BECs at P1 are plated on the insert, and rat astrocytes are optionally plated at the bottom of the well. Plating of rat primary astrocytes is performed 6 days before BECs are plated onto collagen and fibronectin-coated membrane filter inserts. This model is used at P1 following either 4 or 7 days in vitro. At the beginning of the assay, test molecules (human holo-transferrin and dextran 70 kDa) were incubated apically for 4 h at 37 °C. After 4 h, media from the apical and basolateral chambers were collected to assess paracellular flux (dextran 70 kDa) or transcytosis (transferrin). Such molecules present in the media from the apical and basolateral chambers were quantified by fluorescence or by IgG ELISA. (B) Permeability (10^{-6} cm min^{-1}) from apical to basolateral passage of human holo-Transferrin (Tf) versus Dextran 70 kDa measured in the NHP BBB model. This model was used at P1 following either 4 or 7 days in vitro (P1D4 and P1D7, respectively) in the absence or presence of primary rat astrocytes (control and + rat AC, respectively). Results are expressed as mean \pm S.D. ($n = 3$ independent experiments, performed in triplicate or quadruplicate). p -values were obtained by Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test or One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test vs. NHP EC P1D4 group. NS: no statistical significance = $p > 0.05$, *** = $p < 0.001$. (C) Permeability (10^{-6} cm min^{-1}) from apical to basolateral passage of an anti-TFRC antibody versus a control mouse IgG measured in the NHP BBB model. This model was used at P1 following either 4 days in vitro in the presence of primary rat astrocytes. Results are expressed as mean \pm S.D. ($n = 3$ independent experiments, performed in quadruplicate). p -values were obtained by Student t -test NS: no statistical significance = $p > 0.05$, *** = $p < 0.001$.

4. Discussion

Decades Investigated in the search of CNS-active drugs have proven the formidable challenge of the BBB in the fight against diverse neurologic disorders. Primate studies may bring insights in the human BBB-focused research, as rhesus monkeys share greater transcriptomic similarities with human brains than mouse [83,84]. The NHP brain endothelium transcriptome is currently underrepresented, hampering a clearer elucidation of the primate BBB [10,85]. The establishment of the NHP-derived BBB model hereby presented constitutes a serious asset in comparison to cell line-based (hCMEC/D3, bEnd.3) and primary BBB models: (1) the starting material obtained from one animal is considerably greater and access to fresh post mortem tissue is much easier than for human, (2) BECs are obtained from freshly isolated post-mortem material, and therefore the BBB molecular features are well-preserved, (3) there is an evidently low variability between cultures from the same starting material, and (4) considerable retention of endothelial characteristics after several days in culture and cellular passaging. Furthermore, previous studies comparing isolated brain microvessels from rodents, primates and humans have reported consistent similarities between NHPs and humans from a molecular and pharmacokinetic standpoint, but significant differences have been retrieved between rodents and humans [10,66,86], favorizing the use of NHP or human-derived over rodent-derived BBB models as a tool in the prediction of CNS exposure of drugs and biologics in NHP and humans, as well as for target validation of novel drug targets at the primate level. On the other hand, commercially available human brain endothelial cells, such as hCMEC/D3 or human primary BECs, even though expressing some typical endothelial cell markers, they are reported to (1) have very low levels of expression of tight junctions, which are translated into low TEER values and relative high permeability towards small tracer molecules indicating paracellular leakiness, and (2) present major differences in the SLC and ABC transporter families and in diverse cell surface receptors, in comparison to freshly isolated brain microvessels, which have direct consequences when assessing transport mechanisms in these models [87]. As an alternative to the present model, PharmaCo-Cell Company has commercialized a BBB model prepared from primary cultures of monkey (*Macaca irus*) brain capillary endothelial cells, co-cultured with rat brain pericytes and astrocytes. However, its full characterization has not yet been published, with little information on how cells are obtained, and the model established. This newly generated dataset may therefore constitute a powerful tool for better understanding the BBB biology.

BECs constituting the BBB are in close contact with pericytes, encapsulated by the basement membrane, and surrounded by astrocytic endfeet processes and other cell types like microglia and neurons [88]. Consequently, the obtention of pure BECs, and thus of an accurate gene expression data on the BBB constitutes a real challenge. In the present study, brain microvessel isolation from a cynomolgus monkey brain was obtained through enzymatic digestion and gradient centrifugation, which yielded a highly enriched fraction of microvascular endothelial cells, but yet contaminated with pericyte, glial and circulating blood cell material. To eliminate any source of contamination, the isolated fraction was set in vitro and BECs selected through further exposure to puromycin [89].

Previously published comparisons of BBB gene expression profiles from freshly isolated rodent BECs versus primary cultures revealed evidence of dedifferentiation and/or down-regulation of BEC qualities (i.e., reduced levels of tight junction proteins, transporters and receptors) [75,90,91]. This is not surprising as cells cultivated in vitro are often at different stages of proliferation and differentiation. Nevertheless, we were willing to accept such limitations, as using an in vitro BBB model may yield some important insights into BEC response to external stimuli or stress, and for the prediction of passage of biotherapeutics. Nonetheless, the presented model was not thoroughly characterized at a molecular and functional level over P2, and therefore remains to be proven as an alternative model for high-throughput testing. Some authors have claimed the maintenance of barrier function properties, along with other phenotypic and cell purity properties in primary BECs following multiple passages [92,93], as inferred from the analysis of junction proteins (ZO-1 and β -catenin), endothelial cell markers (GLUT-1, vWF), and TEER measurement. However, it is very likely that more than one passage will be detrimental to the quality of the model, as documented in primary mouse models [94].

A key BBB feature is the presence of tight junctions between adjacent endothelial cells [95], where claudins (CLDN family), occludin (OCLN), and junctional adhesion molecules (JAMs) interact with cytoplasmic adaptors, including zona occludens and cingulin (CGNL1), establishing a linkage to the cytoskeleton and adherens junctions. In BECs, CLDN5 has shown to be the dominant CLDN family member and critical for the barrier formation and function [96,97]. The transcriptomic analysis hereby presented evidences CLDN5 as the highest expressed tight junction element within the cynomolgus brain vasculature, and likewise maintaining considerable high levels in vitro. A substantial expression following sub-culturing in vitro is also seen for other tight junctions, such as TJP1, OCLN, JAMs, and cadherins. The confirmation of protein expression of major tight junctions in our NHP-derived BECs, and notably their morphological distribution at the cell-to-cell interaction further hallmarks the tightness of the cell monolayer formed. Such results support that NHP-derived BECs maintain a relevant level of differentiation, representative of the brain microvasculature in its physiological state. The co-culture of BECs with astrocytes resulted in an increase on the average TEER measurements, but not in the global expression of tight junction and transporter proteins, findings corroborated by previous studies [98].

One of the most defining features of the BBB is the polarized expression of different transporters at the brain microvascular endothelium. The two major ABC transporters known at the BBB, ABCG2 and ABCB1, confirmed the highest expression levels among the ABC transporter superfamily in the NHP brain endothelium, a feature maintained in vitro, regardless of the downregulation observed for both transporters. These findings are consistent with reported transcriptomic and proteomic analyses [10,57,78], and evidence that ABCG2 greater expression over ABCB1 prevails among the primate BBB. Our analysis also confirmed ABCC4 as the third major efflux transporter present at the NHP BBB, corroborating previous studies [10,66,78]. The expression of several ABC transporters has been demonstrated to be species-dependent, where similar protein levels are found among rodents' species, and among primates, but not from rodents to primates. The human [66], cynomolgus monkey [10], and marmoset [86] BBB's are estimated to present 3–4-fold lower levels of ABCB1 than the rodent BBB. Likewise, consistent results regarding the expression levels of ABCC4 at the human and cynomolgus monkey BBB were also found [10,66], while the rodent BBB presents 5–8-fold higher abcc4 levels than those at the human and NHP BBB. Consequently, extrapolation of the BBB permeability obtained from rodent studies tends to underestimate the brain distribution of ABCB1 and ABCC4 substrates in human. In the present genomic analysis, we also identified the most abundant SLC transporters present at the primate BBB—SLC2A1, SLC7A5, SLC7A1, and SLC3A2, SLCO2B1, and SLC38A5, confirming previous findings [75–78]. These transporters remain the most expressed SLCs in vitro, except for SLC7A5 and SLC38A5 whose expressions considerably dropped in vitro. Therefore, SLC7A5 modest expression might compromise LAT-1 heterodimer activity in this model.

Our present study was also dedicated to exploring eventual differences of the vascular tree across regions of the brain, which is yet poorly addressed. In fact, regional specificities of the BBB have been reported in disease, injury [99–102], and aging [103], but to the best of our knowledge no report explores regional specificities of the BBB in the healthy brain. Given the circumventricular organs of the brain (e.g., posterior pituitary gland, pineal gland, median eminence of the hypothalamus) display a fenestrated endothelium with intercellular gaps [104], these were not included in the analyses. The present data suggest a considerable overlap of the molecular signatures of the brain endothelium obtained from the brainstem, cerebellum, cortex, hippocampus, and striatum, suggesting a rather homogeneous structure of the BBB, and therefore of its role across these brain regions. Nonetheless, these are important in the consolidation of our understanding regarding the heterogeneity of the BBB and how it may regulate brain function.

We also evaluated this NHP-derived BBB model in terms of RMT. Up to this date, TFRC remains the best validated RMT-mechanism allowing the enhancement brain exposure of biotherapeutics, widely reported by independent research groups [31–35]. Our study identified a TFRC-mediated transcytosis activity, as both transferrin and the anti-human/anti-cynomolgus TFRC were successfully

transported from the apical to the basolateral compartment. Despite the downregulation of TFRC mRNA expression levels from isolated brain capillaries to P1, substantial expression levels are kept, which was also confirmed at protein level by WB. The present model presents improved tightness of the cell monolayer in comparison to cell line models such as hCMEC/D3, which displays low TEER values ($\sim 40 \Omega \cdot \text{cm}^2$, [3]) and for which an evaluation of the transcytosis of macromolecules across the model may only be carried using the so-called pulse-chase assay [105]. On the other hand, iPSC-derived BBB models have reported high TEER values (up to $2500 \Omega \cdot \text{cm}^2$, [106]), close to the ones reported in a physiological human BBB ($\sim 5000 \Omega \cdot \text{cm}^2$, [107]), however their differentiation conditions need to be carefully controlled to avoid an epithelial rather than endothelial phenotype [108,109]. In addition, no report can be found demonstrating transcytosis of anti-TfR antibodies in iPSC-derived BBB models, and comparable permeabilities for transferrin vs. human IgG have been shown [110].

The expression of other receptors participating in RMT was also confirmed by RNAseq in the present NHP-derived BBB model. Nonetheless, most RMT mechanisms reported to-date are ubiquitously expressed raising potential specificity and safety concerns. The identification of a novel RMT mechanism that is specifically and highly expressed at the BBB would represent a considerable asset in such competitive field, and the present transcriptomic analysis constitutes an important asset in the pursuit of such achievement. In fact, this NHP model probably represents one of the most adequate tools for the prediction of the human blood-to-brain permeability of macromolecules utilizing RMT mechanisms.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4923/12/10/967/s1>, Figure S1: Transcriptional changes from P0D0 to P1D7 fractions, Figure S2: Transcriptional differences found across NHP brainstem, cerebellum, cortex, hippocampus and striatum, Figure S3: Schematic representations of the clathrin-mediated endocytosis and the caveolae-mediated endocytosis signaling pathways, and downregulation/upregulation prediction profiles, Figure S4: Expression of ABC and SLC transporters across P0D0, P0D7 and P1D7 fractions, Figure S5: ABC and SLC transporters positively correlated with the expression of PECAM1 across P0D0, P0D7 and P1D7 NHP cortical samples.

Author Contributions: Conceptualization, C.C. (Catarina Chaves), T.-M.D., M.D., and D.L.; Formal analysis, C.C. (Catarina Chaves), G.T., and C.R.; Investigation, C.C. (Catarina Chaves), M.D., and D.L.; Methodology, C.C. (Catarina Chaves), T.-M.D., C.C. (Céline Cegarra), V.R., S.T., and G.T.; Project administration, D.L.; Resources, M.D. and D.L.; Software, C.C. (Catarina Chaves) and C.R.; Supervision, C.R., M.D., and D.L.; Validation, C.R., M.D., and D.L.; Visualization, C.C. (Catarina Chaves); Writing—original draft, C.C. (Catarina Chaves); Writing—review & editing, C.C. (Catarina Chaves) and D.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: Authors would like to thank Amilcar Flores Morales and Bruno Biton for the contributive output and review of the manuscript, and Alexandre Secq, Céline Gomet (Veterinary Services), and the technical teams from In Vivo Research Support and Technics in Pathology from the Alfortville Research Center for the handling of NHPs and brain collection.

Conflicts of Interest: All authors are Sanofi employees, and may hold shares and/or stock options in the company. The company had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. The authors declare no other conflict of interest.

References

1. Ballabh, P.; Braun, A.; Nedergaard, M. The blood–brain barrier: An overview. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *16*, 1–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Banks, W.A. From blood–brain barrier to blood–brain interface: New opportunities for CNS drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2016**, *15*, 275–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Helms, H.C.; Abbott, N.J.; Burek, M.; Cecchelli, R.; Couraud, P.-O.; Deli, M.A.; Förster, C.; Galla, H.J.; A Romero, I.; Shusta, E.V.; 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. *Br. J. Pharmacol.* **2016**, *36*, 862–890. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Alanne, M.H.; Pummi, K.; Heape, A.M.; Grønman, R.; Peltonen, J.; Peltonen, S. Tight Junction Proteins in Human Schwann Cell Autotypic Junctions. *J. Histochem. Cytochem.* **2009**, *57*, 523–529. [[CrossRef](#)]

5. Cecchelli, R.; Berezowski, V.; Lundquist, S.; Culot, M.; Renftel, M.; Dehouck, M.-P.; Fenart, L. Modelling of the blood–brain barrier in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2007**, *6*, 650–661. [[CrossRef](#)]
6. Workman, M.J.; Svendsen, C.N. Recent advances in human iPSC-derived models of the blood–brain barrier. *Fluids Barriers CNS* **2020**, *17*, 1–10. [[CrossRef](#)]
7. BBB Kit™ (MBT-24H)/(MBT-24F). Available online: https://www.pharmacocell.co.jp/en/products/mbt24h_e.html (accessed on 26 August 2020).
8. Khaitovich, P.; Muetzel, B.; She, X.; Lachmann, M.; Hellmann, I.; Dietzsch, J.; Steigele, S.; Do, H.-H.; Weiss, G.; Enard, W.; et al. Regional Patterns of Gene Expression in Human and Chimpanzee Brains. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1462–1473. [[CrossRef](#)]
9. Khaitovich, P.; Tang, K.; Franz, H.; Kelso, J.; Hellmann, I.; Enard, W.; Lachmann, M.; Pääbo, S. Positive selection on gene expression in the human brain. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, R356–R358. [[CrossRef](#)]
10. Ito, K.; Uchida, Y.; Ohtsuki, S.; Aizawa, S.; Kawakami, H.; Katsukura, Y.; Kamiie, J.; Terasaki, T. Quantitative Membrane Protein Expression at the Blood–brain Barrier of Adult and Younger Cynomolgus Monkeys. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 3939–3950. [[CrossRef](#)]
11. Loryan, I.; Melander, E.; Svensson, M.; Payan, M.; König, F.; Jansson, B.; Hammarlund-Udenaes, M. In-depth neuropharmacokinetic analysis of antipsychotics based on a novel approach to estimate unbound target-site concentration in CNS regions: Link to spatial receptor occupancy. *Mol. Psychiatry* **2016**, *21*, 1527–1536. [[CrossRef](#)]
12. Hu, J.; Ge, H.; Newman, M.; Liu, K. OSA: A fast and accurate alignment tool for RNA-Seq. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1933–1934. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Reiner, A.; Yekutieli, D.; Benjamini, Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. *Bioinformatics* **2003**, *19*, 368–375. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis (QIAGEN IPA). Available online: <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis> (accessed on 26 August 2020).
16. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 15545–15550. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Mootha, V.K.; Lindgren, C.M.; Eriksson, K.F.; Subramanian, A.; Sihag, S.; Lehar, J.; Puigserver, P.; Carlsson, E.; Ridderstråle, M.; Laurila, E.; et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **2003**, *34*, 267–273. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Dusart, P.; Hallstrom, B.M.; Renne, T.; Odeberg, J.; Uhlen, M.; Butler, L.M. A Systems-Based Map of Human Brain Cell-Type Enriched Genes and Malignancy-Associated Endothelial Changes. *Cell Rep.* **2019**, *29*, 1690–1706 e1694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Zhang, Y.; Sloan, S.A.; Clarke, L.E.; Caneda, C.; Plaza, C.A.; Blumenthal, P.D.; Vogel, H.; Steinberg, G.K.; Edwards, M.S.; Li, G.; et al. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron* **2016**, *89*, 37–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. He, L.; Vanlandewijck, M.; Mae, M.A.; Andrae, J.; Ando, K.; Del Gaudio, F.; Nahar, K.; Lebouvier, T.; Lavina, B.; Gouveia, L.; et al. Single-cell RNA sequencing of mouse brain and lung vascular and vessel-associated cell types. *Sci. Data* **2018**, *5*, 180160. [[CrossRef](#)]
21. McKenzie, A.T.; Wang, M.; Hauberg, M.E.; Fullard, J.F.; Kozlenkov, A.; Keenan, A.; Hurd, Y.L.; Dracheva, S.; Casaccia, P.; Roussos, P.; et al. Brain Cell Type Specific Gene Expression and Co-expression Network Architectures. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 8868. [[CrossRef](#)]
22. Munji, R.N.; Soung, A.L.; Weiner, G.A.; Sohet, F.; Semple, B.D.; Trivedi, A.; Gimlin, K.; Kotoda, M.; Korai, M.; Aydin, S.; et al. Profiling the mouse brain endothelial transcriptome in health and disease models reveals a core blood–brain barrier dysfunction module. *Nat. Neurosci.* **2019**, *22*, 1892–1902. [[CrossRef](#)]
23. Liebner, S.; Corada, M.; Bangsow, T.; Babbage, J.; Taddei, A.; Czupalla, C.J.; Reis, M.; Felici, A.; Wolburg, H.; Fruttiger, M.; et al. Wnt/beta-catenin signaling controls development of the blood–brain barrier. *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 409–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Stenman, J.M.; Rajagopal, J.; Carroll, T.J.; Ishibashi, M.; McMahon, J.; McMahon, A.P. Canonical Wnt signaling regulates organ-specific assembly and differentiation of CNS vasculature. *Science* **2008**, *322*, 1247–1250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Zhou, Y.; Nathans, J. Gpr124 controls CNS angiogenesis and blood–brain barrier integrity by promoting ligand-specific canonical wnt signaling. *Dev. Cell* **2014**, *31*, 248–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Zhou, Y.; Wang, Y.; Tischfield, M.; Williams, J.; Smallwood, P.M.; Rattner, A.; Taketo, M.M.; Nathans, J. Canonical WNT signaling components in vascular development and barrier formation. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 3825–3846. [[CrossRef](#)]
27. Masuda, S.; Oda, Y.; Sasaki, H.; Ikenouchi, J.; Higashi, T.; Akashi, M.; Nishi, E.; Furuse, M. LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 548–555. [[CrossRef](#)]
28. Daneman, R.; Zhou, L.; Agalliu, D.; Cahoy, J.D.; Kaushal, A.; Barres, B.A. The mouse blood–brain barrier transcriptome: A new resource for understanding the development and function of brain endothelial cells. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13741. [[CrossRef](#)]
29. Jefferies, W.A.; Brandon, M.R.; Hunt, S.V.; Williams, A.F.; Gatter, K.C.; Mason, D.Y. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature* **1984**, *312*, 162–163. [[CrossRef](#)]
30. Pardridge, W.M.; Eisenberg, J.; Yang, J. Human blood–brain barrier transferrin receptor. *Metabolism* **1987**, *36*, 892–895. [[CrossRef](#)]
31. Niewoehner, J.; Bohrmann, B.; Collin, L.; Urich, E.; Sade, H.; Maier, P.; Rueger, P.; Stracke, J.O.; Lau, W.; Tissot, A.C.; et al. Increased brain penetration and potency of a therapeutic antibody using a monovalent molecular shuttle. *Neuron* **2014**, *81*, 49–60. [[CrossRef](#)]
32. Bien-Ly, N.; Yu, Y.J.; Bumbaca, D.; Elstrott, J.; Boswell, C.A.; Zhang, Y.; Luk, W.; Lu, Y.; Dennis, M.S.; Weimer, R.M.; et al. Transferrin receptor (TfR) trafficking determines brain uptake of TfR antibody affinity variants. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 233–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Yu, Y.J.; Atwal, J.K.; Zhang, Y.; Tong, R.K.; Wildsmith, K.R.; Tan, C.; Bien-Ly, N.; Hersom, M.; Maloney, J.A.; Meilandt, W.J.; et al. Therapeutic bispecific antibodies cross the blood–brain barrier in nonhuman primates. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 261ra154. [[CrossRef](#)]
34. Karaoglu Hanzatian, D.; Schwartz, A.; Gizatullin, F.; Erickson, J.; Deng, K.; Villanueva, R.; Stedman, C.; Harris, C.; Ghayur, T.; Goodearl, A. Brain uptake of multivalent and multi-specific DVD-Ig proteins after systemic administration. *MAbs* **2018**, *10*, 765–777. [[CrossRef](#)]
35. Webster, C.I.; Hatcher, J.; Burrell, M.; Thom, G.; Thornton, P.; Gurrell, I.; Chessell, I. Enhanced delivery of IL-1 receptor antagonist to the central nervous system as a novel anti-transferrin receptor-IL-1RA fusion reverses neuropathic mechanical hypersensitivity. *Pain* **2017**, *158*, 660–668. [[CrossRef](#)]
36. Azizi, P.M.; Zyla, R.E.; Guan, S.; Wang, C.; Liu, J.; Bolz, S.S.; Heit, B.; Klip, A.; Lee, W.L. Clathrin-dependent entry and vesicle-mediated exocytosis define insulin transcytosis across microvascular endothelial cells. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 740–750. [[CrossRef](#)]
37. Zuchero, Y.J.; Chen, X.; Bien-Ly, N.; Bumbaca, D.; Tong, R.K.; Gao, X.; Zhang, S.; Hoyte, K.; Luk, W.; Huntley, M.A.; et al. Discovery of Novel Blood–brain Barrier Targets to Enhance Brain Uptake of Therapeutic Antibodies. *Neuron* **2016**, *89*, 70–82. [[CrossRef](#)]
38. Boado, R.J.; Zhang, Y.; Zhang, Y.; Pardridge, W.M. Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood–brain barrier. *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *96*, 381–391. [[CrossRef](#)]
39. Pardridge, W.M.; Kang, Y.S.; Buciak, J.L.; Yang, J. Human insulin receptor monoclonal antibody undergoes high affinity binding to human brain capillaries in vitro and rapid transcytosis through the blood–brain barrier in vivo in the primate. *Pharm. Res.* **1995**, *12*, 807–816. [[CrossRef](#)]
40. Bertrand, Y.; Currie, J.C.; Poirier, J.; Demeule, M.; Abulrob, A.; Fatehi, D.; Stanimirovic, D.; Sartelet, H.; Castaigne, J.P.; Beliveau, R. Influence of glioma tumour microenvironment on the transport of ANG1005 via low-density lipoprotein receptor-related protein 1. *Br. J. Cancer* **2011**, *105*, 1697–1707. [[CrossRef](#)]
41. Neves, A.R.; Queiroz, J.F.; Lima, S.A.C.; Reis, S. Apo E-Functionalization of Solid Lipid Nanoparticles Enhances Brain Drug Delivery: Uptake Mechanism and Transport Pathways. *Bioconjug. Chem.* **2017**, *28*, 995–1004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Demeule, M.; Beaudet, N.; Regina, A.; Besserer-Offroy, E.; Murza, A.; Tetreault, P.; Belleville, K.; Che, C.; Larocque, A.; Thiot, C.; et al. Conjugation of a brain-penetrant peptide with neurotensin provides antinociceptive properties. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 1199–1213. [[CrossRef](#)]

43. Stanimirovic, D.; Kemmerich, K.; Haqqani, A.S.; Farrington, G.K. Engineering and pharmacology of blood–brain barrier-permeable bispecific antibodies. *Adv. Pharmacol.* **2014**, *71*, 301–335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Molino, Y.; David, M.; Varini, K.; Jabes, F.; Gaudin, N.; Fortoul, A.; Bakloul, K.; Masse, M.; Bernard, A.; Drobecq, L.; et al. Use of LDL receptor-targeting peptide vectors for in vitro and in vivo cargo transport across the blood–brain barrier. *FASEB J.* **2017**, *31*, 1807–1827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Abulrob, A.; Sprong, H.; Van Bergen en Henegouwen, P.; Stanimirovic, D. The blood–brain barrier transmigration single domain antibody: Mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J. Neurochem.* **2005**, *95*, 1201–1214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Farrington, G.K.; Caram-Salas, N.; Haqqani, A.S.; Brunette, E.; Eldredge, J.; Pepinsky, B.; Antognetti, G.; Baumann, E.; Ding, W.; Garber, E.; et al. A novel platform for engineering blood–brain barrier-crossing bispecific biologics. *FASEB J.* **2014**, *28*, 4764–4778. [[CrossRef](#)]
47. Candela, P.; Saint-Pol, J.; Kuntz, M.; Boucau, M.C.; Lamartiniere, Y.; Gosselet, F.; Fenart, L. In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: Focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res.* **2015**, *1594*, 15–26. [[CrossRef](#)]
48. Gosselet, F.; Candela, P.; Sevin, E.; Berezowski, V.; Cecchelli, R.; Fenart, L. Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood–brain barrier: Use of an in vitro model. *Brain Res.* **2009**, *1249*, 34–42. [[CrossRef](#)]
49. Ohtsuki, S.; Ikeda, C.; Uchida, Y.; Sakamoto, Y.; Miller, F.; Glacial, F.; Decleves, X.; Scherrmann, J.M.; Couraud, P.O.; Kubo, Y.; et al. Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood–brain barrier model. *Mol. Pharm.* **2013**, *10*, 289–296. [[CrossRef](#)]
50. Bitsikas, V.; Correa, I.R., Jr.; Nichols, B.J. Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *Elife* **2014**, *3*, e03970. [[CrossRef](#)]
51. Kaksonen, M.; Roux, A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2018**, *19*, 313–326. [[CrossRef](#)]
52. McMahon, H.T.; Boucrot, E. Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 517–533. [[CrossRef](#)]
53. Kirkham, M.; Parton, R.G. Clathrin-independent endocytosis: New insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1746*, 349–363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Zhao, Y.L.; Song, J.N.; Zhang, M. Role of caveolin-1 in the biology of the blood–brain barrier. *Rev. Neurosci.* **2014**, *25*, 247–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Andreone, B.J.; Chow, B.W.; Tata, A.; Lacoste, B.; Ben-Zvi, A.; Bullock, K.; Deik, A.A.; Ginty, D.D.; Clish, C.B.; Gu, C. Blood–brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. *Neuron* **2017**, *94*, 581–594 e585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Ben-Zvi, A.; Lacoste, B.; Kur, E.; Andreone, B.J.; Mayshar, Y.; Yan, H.; Gu, C. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood–brain barrier. *Nature* **2014**, *509*, 507–511. [[CrossRef](#)]
57. Chaves, C.; Shawahna, R.; Jacob, A.; Scherrmann, J.M.; Decleves, X. Human ABC transporters at blood-CNS interfaces as determinants of CNS drug penetration. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 1450–1462. [[CrossRef](#)]
58. Nalecz, K.A. Solute Carriers in the Blood–brain Barrier: Safety in Abundance. *Neurochem. Res.* **2017**, *42*, 795–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Suhy, A.M.; Webb, A.; Papp, A.C.; Geier, E.G.; Sadee, W. Expression and splicing of ABC and SLC transporters in the human blood–brain barrier measured with RNAseq. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2017**, *103*, 47–51. [[CrossRef](#)]
60. Al Feteisi, H.; Al-Majdoub, Z.M.; Achour, B.; Couto, N.; Rostami-Hodjegan, A.; Barber, J. Identification and quantification of blood–brain barrier transporters in isolated rat brain microvessels. *J. Neurochem.* **2018**, *146*, 670–685. [[CrossRef](#)]
61. He, L.; Vanlandewijck, M.; Raschperger, E.; Andaloussi Mae, M.; Jung, B.; Lebouvier, T.; Ando, K.; Hofmann, J.; Keller, A.; Betsholtz, C. Analysis of the brain mural cell transcriptome. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 35108. [[CrossRef](#)]
62. Liow, J.S.; Zoghbi, S.S.; Hu, S.; Hall, M.D.; Hines, C.S.; Shetty, H.U.; Araneta, M.D.; Page, E.M.; Pike, V.W.; Kreis, W.C.; et al. (18)F-FCWAY, a serotonin 1A receptor radioligand, is a substrate for efflux transport at the human blood–brain barrier. *Neuroimage* **2016**, *138*, 134–140. [[CrossRef](#)]
63. Cisternino, S.; Rousselle, C.; Lorico, A.; Rappa, G.; Scherrmann, J.M. Apparent lack of Mrp1-mediated efflux at the luminal side of mouse blood–brain barrier endothelial cells. *Pharm. Res.* **2003**, *20*, 904–909. [[CrossRef](#)]

64. Nies, A.T.; Jedlitschky, G.; Konig, J.; Herold-Mende, C.; Steiner, H.H.; Schmitt, H.P.; Keppler, D. Expression and immunolocalization of the multidrug resistance proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in human brain. *Neuroscience* **2004**, *129*, 349–360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Kober, A.C.; Manavalan, A.P.C.; Tam-Amersdorfer, C.; Holmer, A.; Saeed, A.; Fanaee-Danesh, E.; Zandl, M.; Albrecher, N.M.; Bjorkhem, I.; Kostner, G.M.; et al. Implications of cerebrovascular ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1) and apolipoprotein M in cholesterol transport at the blood–brain barrier. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* **2017**, *1862*, 573–588. [[CrossRef](#)]
66. Uchida, Y.; Ohtsuki, S.; Katsukura, Y.; Ikeda, C.; Suzuki, T.; Kamiie, J.; Terasaki, T. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood–brain barrier transporters and receptors. *J. Neurochem.* **2011**, *117*, 333–345. [[CrossRef](#)]
67. Ohtsuki, S.; Watanabe, Y.; Hori, S.; Suzuki, H.; Bhongsatiern, J.; Fujiyoshi, M.; Kamoi, M.; Kamiya, N.; Takanaga, H.; Terasaki, T. mRNA expression of the ATP-binding cassette transporter subfamily A (ABCA) in rat and human brain capillary endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1437–1440. [[CrossRef](#)]
68. Pardridge, W.M.; Oldendorf, W.H. Kinetics of blood–brain transport of hexoses. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *382*, 377–392. [[CrossRef](#)]
69. Pardridge, W.M.; Boado, R.J.; Farrell, C.R. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood–brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 18035–18040.
70. Pardridge, W.M.; Oldendorf, W.H. Kinetic analysis of blood–brain barrier transport of amino acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1975**, *401*, 128–136. [[CrossRef](#)]
71. Boado, R.J.; Li, J.Y.; Nagaya, M.; Zhang, C.; Pardridge, W.M. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood–brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12079–12084. [[CrossRef](#)]
72. Stoll, J.; Wadhwani, K.C.; Smith, Q.R. Identification of the cationic amino acid transporter (System y⁺) of the rat blood–brain barrier. *J. Neurochem.* **1993**, *60*, 1956–1959. [[CrossRef](#)]
73. Gao, B.; Vavricka, S.R.; Meier, P.J.; Stieger, B. Differential cellular expression of organic anion transporting peptides OATP1A2 and OATP2B1 in the human retina and brain: Implications for carrier-mediated transport of neuropeptides and neurosteroids in the CNS. *Pflugers Arch.* **2015**, *467*, 1481–1493. [[CrossRef](#)]
74. Geier, E.G.; Chen, E.C.; Webb, A.; Papp, A.C.; Yee, S.W.; Sadee, W.; Giacomini, K.M. Profiling solute carrier transporters in the human blood–brain barrier. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2013**, *94*, 636–639. [[CrossRef](#)]
75. Lyck, R.; Ruderisch, N.; Moll, A.G.; Steiner, O.; Cohen, C.D.; Engelhardt, B.; Makrides, V.; Verrey, F. Culture-induced changes in blood–brain barrier transcriptome: Implications for amino-acid transporters in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2009**, *29*, 1491–1502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Agarwal, N.; Lippmann, E.S.; Shusta, E.V. Identification and expression profiling of blood–brain barrier membrane proteins. *J. Neurochem.* **2010**, *112*, 625–635. [[CrossRef](#)]
77. Peura, L.; Malmioja, K.; Huttunen, K.; Leppanen, J.; Hamalainen, M.; Forsberg, M.M.; Gynther, M.; Rautio, J.; Laine, K. Design, synthesis and brain uptake of LAT1-targeted amino acid prodrugs of dopamine. *Pharm. Res.* **2013**, *30*, 2523–2537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Shawahna, R.; Uchida, Y.; Declèves, X.; Ohtsuki, S.; Yousif, S.; Dauchy, S.; Jacob, A.; Chassoux, F.; Daumas-Duport, C.; Couraud, P.O.; et al. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 1332–1341. [[CrossRef](#)]
79. Hosoya, K.; Tomi, M.; Ohtsuki, S.; Takanaga, H.; Saeki, S.; Kanai, Y.; Endou, H.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Terasaki, T. Enhancement of L-cystine transport activity and its relation to xCT gene induction at the blood–brain barrier by diethyl maleate treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302*, 225–231. [[CrossRef](#)]
80. Dahlin, A.; Royall, J.; Hohmann, J.G.; Wang, J. Expression profiling of the solute carrier gene family in the mouse brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2009**, *329*, 558–570. [[CrossRef](#)]
81. Tsuji, A.; Saheki, A.; Tamai, I.; Terasaki, T. Transport mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors at the blood–brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**, *267*, 1085–1090.
82. Bhattacharya, I.; Boje, K.M. GHB (gamma-hydroxybutyrate) carrier-mediated transport across the blood–brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *311*, 92–98. [[CrossRef](#)]
83. Bernard, A.; Lubbers, L.S.; Tanis, K.Q.; Luo, R.; Podtelezchnikov, A.A.; Finney, E.M.; McWhorter, M.M.; Serikawa, K.; Lemon, T.; Morgan, R.; et al. Transcriptional architecture of the primate neocortex. *Neuron* **2012**, *73*, 1083–1099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

84. Zeng, H.; Shen, E.H.; Hohmann, J.G.; Oh, S.W.; Bernard, A.; Royall, J.J.; Glattfelder, K.J.; Sunkin, S.M.; Morris, J.A.; Guillozet-Bongaarts, A.L.; et al. Large-scale cellular-resolution gene profiling in human neocortex reveals species-specific molecular signatures. *Cell* **2012**, *149*, 483–496. [[CrossRef](#)]
85. Bakken, T.E.; Miller, J.A.; Ding, S.L.; Sunkin, S.M.; Smith, K.A.; Ng, L.; Szafer, A.; Dalley, R.A.; Royall, J.J.; Lemon, T.; et al. A comprehensive transcriptional map of primate brain development. *Nature* **2016**, *535*, 367–375. [[CrossRef](#)]
86. Hoshi, Y.; Uchida, Y.; Tachikawa, M.; Inoue, T.; Ohtsuki, S.; Terasaki, T. Quantitative atlas of blood–brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmoset. *J. Pharm. Sci.* **2013**, *102*, 3343–3355. [[CrossRef](#)]
87. Urich, E.; Lazic, S.E.; Molnos, J.; Wells, I.; Freskgard, P.O. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood–brain barrier models. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e38149. [[CrossRef](#)]
88. Abbott, N.J. Dynamics of CNS barriers: Evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol. Neurobiol.* **2005**, *25*, 5–23. [[CrossRef](#)]
89. Perriere, N.; Demeuse, P.; Garcia, E.; Regina, A.; Debray, M.; Andreux, J.P.; Couvreur, P.; Scherrmann, J.M.; Temsamani, J.; Couraud, P.O.; et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood–brain barrier-specific properties. *J. Neurochem.* **2005**, *93*, 279–289. [[CrossRef](#)]
90. Calabria, A.R.; Shusta, E.V. A genomic comparison of in vivo and in vitro brain microvascular endothelial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2008**, *28*, 135–148. [[CrossRef](#)]
91. Fujimoto, T.; Morofuji, Y.; Nakagawa, S.; Kovac, A.; Horie, N.; Izumo, T.; Niwa, M.; Matsuo, T.; Banks, W.A. Comparison of the rate of dedifferentiation with increasing passages among cell sources for an in vitro model of the blood–brain barrier. *J. Neural. Transm. (Vienna)* **2020**. [[CrossRef](#)]
92. Bernas, M.J.; Cardoso, F.L.; Daley, S.K.; Weinand, M.E.; Campos, A.R.; Ferreira, A.J.; Hoying, J.B.; Witte, M.H.; Brites, D.; Persidsky, Y.; et al. Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood–brain barrier. *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 1265–1272. [[CrossRef](#)]
93. Meresse, S.; Dehouck, M.P.; Delorme, P.; Bensaïd, M.; Tauber, J.P.; Delbart, C.; Fruchart, J.C.; Cecchelli, R. Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. *J. Neurochem.* **1989**, *53*, 1363–1371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Bernard-Patrzynski, F.; Lecuyer, M.A.; Puscas, I.; Boukhatem, I.; Charabati, M.; Bourbonniere, L.; Ramassamy, C.; Leclair, G.; Prat, A.; Roullin, V.G. Isolation of endothelial cells, pericytes and astrocytes from mouse brain. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0226302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Luissint, A.C.; Artus, C.; Glacial, F.; Ganeshamoorthy, K.; Couraud, P.O. Tight junctions at the blood brain barrier: Physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* **2012**, *9*, 23. [[CrossRef](#)]
96. Furuse, M.; Hata, M.; Furuse, K.; Yoshida, Y.; Haratake, A.; Sugitani, Y.; Noda, T.; Kubo, A.; Tsukita, S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: A lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* **2002**, *156*, 1099–1111. [[CrossRef](#)]
97. Nitta, T.; Hata, M.; Gotoh, S.; Seo, Y.; Sasaki, H.; Hashimoto, N.; Furuse, M.; Tsukita, S. Size-selective loosening of the blood–brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 653–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Canfield, S.G.; Stebbins, M.J.; Morales, B.S.; Asai, S.W.; Vatine, G.D.; Svendsen, C.N.; Palecek, S.P.; Shusta, E.V. An isogenic blood–brain barrier model comprising brain endothelial cells, astrocytes, and neurons derived from human induced pluripotent stem cells. *J. Neurochem.* **2017**, *140*, 874–888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Villasenor, R.; Kuennecke, B.; Ozmen, L.; Ammann, M.; Kugler, C.; Gruninger, F.; Loetscher, H.; Freskgard, P.O.; Collin, L. Region-specific permeability of the blood–brain barrier upon pericyte loss. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2017**, *37*, 3683–3694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Mans, A.M.; Biebuyck, J.F.; Shelly, K.; Hawkins, R.A. Regional blood–brain barrier permeability to amino acids after portacaval anastomosis. *J. Neurochem.* **1982**, *38*, 705–717. [[CrossRef](#)]
101. Juhler, M.; Blasberg, R.G.; Fenstermacher, J.D.; Patlak, C.S.; Paulson, O.B. A spatial analysis of the blood–brain barrier damage in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1985**, *5*, 545–553. [[CrossRef](#)]

102. Rascher, G.; Fischmann, A.; Kroger, S.; Duffner, F.; Grote, E.H.; Wolburg, H. Extracellular matrix and the blood–brain barrier in glioblastoma multiforme: Spatial segregation of tenascin and agrin. *Acta Neuropathol.* **2002**, *104*, 85–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Montagne, A.; Barnes, S.R.; Sweeney, M.D.; Halliday, M.R.; Sagare, A.P.; Zhao, Z.; Toga, A.W.; Jacobs, R.E.; Liu, C.Y.; Amezcua, L.; et al. Blood–brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron* **2015**, *85*, 296–302. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Miyata, S. New aspects in fenestrated capillary and tissue dynamics in the sensory circumventricular organs of adult brains. *Front Neurosci.* **2015**, *9*, 390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Sade, H.; Baumgartner, C.; Hugenmatter, A.; Moessner, E.; Freskgard, P.O.; Niewoehner, J. A human blood–brain barrier transcytosis assay reveals antibody transcytosis influenced by pH-dependent receptor binding. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e96340. [[CrossRef](#)]
106. Mantle, J.L.; Min, L.; Lee, K.H. Minimum Transendothelial Electrical Resistance Thresholds for the Study of Small and Large Molecule Drug Transport in a Human in Vitro Blood–brain Barrier Model. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 4191–4198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Lauschke, K.; Frederiksen, L.; Hall, V.J. Paving the Way Toward Complex Blood–brain Barrier Models Using Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **2017**, *26*, 857–874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Aoki, H.; Yamashita, M.; Hashita, T.; Iwao, T.; Matsunaga, T. Laminin 221 fragment is suitable for the differentiation of human induced pluripotent stem cells into brain microvascular endothelial-like cells with robust barrier integrity. *Fluids Barriers CNS* **2020**, *17*, 25. [[CrossRef](#)]
109. Delsing, L.; Donnes, P.; Sanchez, J.; Clausen, M.; Voulgaris, D.; Falk, A.; Herland, A.; Brolen, G.; Zetterberg, H.; Hicks, R.; et al. Barrier Properties and Transcriptome Expression in Human iPSC-Derived Models of the Blood–brain Barrier. *Stem Cells* **2018**, *36*, 1816–1827. [[CrossRef](#)]
110. Ruano-Salguero, J.S.; Lee, K.H. Antibody transcytosis across brain endothelial-like cells occurs nonspecifically and independent of FcRn. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 3685. [[CrossRef](#)]

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

3.2 Approche transcriptomique via un consortium européen IMI COMPACT : Etude d'ITM2A

Une fois nos modèles de BHE *in vitro* caractérisés, nous avons mis en place deux stratégies différentes afin de trouver de nouveaux récepteurs spécifiques du cerveau capables de faire de la transcytose avec des anticorps.

La première stratégie a découlé des résultats d'un consortium européen IMI COMPACT dont un des groupes de travail était consacré à l'étude de la BHE. Une analyse transcriptomique comparative de cellules primaires commerciales endothéliales microvasculaires humaines issues de cerveaux, de poumons et de foies a été réalisée. Pour l'analyse protéomique, les cellules ont été cultivées, les protéines membranaires ont été biotinylées, extraites et analysées. Ils ont cherché les protéines transmembranaires avec une expression enrichie dans le cerveau par rapport au foie et aux poumons. Sanofi a pris en charge l'étude de la cible ITM2A qui est une protéine transmembranaire dont l'ARN est enrichi dans le cerveau.


Nous avons voulu vérifier si ITM2A pouvait être un « cheval de Troie » pour faire de la transcytose à travers la BHE. Ces travaux expérimentaux ont donné lieu à un article de recherche publié en mars 2022 dans le journal « Fluids and Barriers of the CNS »

RESEARCH

Open Access



Exploring ITM2A as a new potential target for brain delivery

Céline Cegarra^{1*} , C. Chaves¹, C. Déon², T. M. Do¹, B. Dumas³, A. Frenzel⁴, P. Kuhn⁴, V. Roudieres¹, J. C. Guillemot² and D. Lesuisse¹

Abstract

Background: Integral membrane protein 2A (ITM2A) is a transmembrane protein expressed in a variety of tissues; little is known about its function, particularly in the brain. *ITM2A* was found to be highly enriched in human brain versus peripheral endothelial cells by transcriptomic and proteomic studies conducted within the European Collaboration on the Optimization of Macromolecular Pharmaceutical (COMPACT) Innovative Medicines Initiative (IMI) consortium. Here, we report the work that was undertaken to determine whether ITM2A could represent a potential target for delivering drugs to the brain.

Methods: A series of *ITM2A* constructs, cell lines and specific anti-human and mouse ITM2A antibodies were generated. Binding and internalization studies in Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) cells overexpressing ITM2A and in brain microvascular endothelial cells from mouse and non-human primate (NHP) were performed with these tools. The best ITM2A antibody was evaluated in an in vitro human blood brain barrier (BBB) model and in an in vivo mouse pharmacokinetic study to investigate its ability to cross the BBB.

Results: Antibodies specifically recognizing extracellular parts of ITM2A or tags inserted in its extracellular domain showed selective binding and uptake in ITM2A-overexpressing cells. However, despite high RNA expression in mouse and human microvessels, the ITM2A protein was rapidly downregulated when endothelial cells were grown in culture, probably explaining why transcytosis could not be observed in vitro. An attempt to directly demonstrate in vivo transcytosis in mice was inconclusive, using either a cross-reactive anti-ITM2A antibody or in vivo phage panning of an anti-ITM2A phage library.

Conclusions: The present work describes our efforts to explore the potential of ITM2A as a target mediating transcytosis through the BBB, and highlights the multiple challenges linked to the identification of new brain delivery targets. Our data provide evidence that antibodies against ITM2A are internalized in ITM2A-overexpressing HEK293 cells, and that ITM2A is expressed in brain microvessels, but further investigations will be needed to demonstrate that ITM2A is a potential target for brain delivery.

Keywords: Blood brain barrier, ITM2A, Antibodies, Transcytosis

Background

Under normal physiological conditions, endothelial cells form biological barriers that regulate exchanges and maintain a low and selective permeability to fluid and solutes. The endothelial cells lining blood vessels in the brain, unlike those found in peripheral blood vessels, are extremely tightly packed, non-fenestrated and equipped with many efflux systems. These brain endothelial cells

*Correspondence: celine.cegarra@sanofi.com

¹ Rare and Neurologic Diseases Research Therapeutic Area, Sanofi, Chilly Mazarin, France

Full list of author information is available at the end of the article



are part of the blood brain barrier, which, with its network of tight junctions, efflux pumps and specific metabolic systems, is mostly permeable to very small lipophilic compounds but actively prevents most molecules, in particular large or polar molecules such as biotherapeutics and antibodies, from entering the brain [1, 2]. As a consequence, there are few biologics in drug development in therapeutic areas such as neurology, oncology (e.g., central nervous system (CNS) lymphoma or glioblastoma) or rare brain diseases. For instance, the use of therapeutic antibodies for CNS disorders such as Alzheimer's, Parkinson's, and Huntington's diseases or brain cancers has been very limited so far [3], largely owing to the presence of the BBB. The biologics that are on the market in neurology act peripherally (or else are given intrathecally) [4]. Therefore, strategies to increase brain exposure of biotherapeutics will be key to their success in this field.

So far, the most successful strategy to deliver biotherapeutics to the brain following systemic administration has been to use a ligand or antibody against receptor-mediated transcytosis (sometimes referred to as the 'Trojan horse' approach). Several receptors such as insulin [5], transferrin [6], lipoprotein-related proteins [7, 8], low density lipoprotein [9] or Insulin-like Growth Factor 1 [10] receptors have been used in preclinical models and in the clinic for the three first ones. The most advanced results have been reported with the transferrin receptor, with a few clinical candidates in development; one of these, IZCARGO[®], a fusion of an anti-TfR antibody and iduronate sulfatase has been approved in Japan as an enzyme replacement therapy for the treatment of mucopolysaccharidosis [11, 12]. Several challenges however remain in the field. One of them is linked to the fact that all these receptors are ubiquitously expressed, leading to exposure in other tissues than the brain, which could potentially lead to pleiotropic and adverse effects. Discovering brain-specific mechanisms remains the ultimate unreach goal and is the active focus of current research in this area.

Identifying endothelial cell-specific or enriched membrane proteins is an essential first step towards facilitating drug delivery to specific organs. Two main workflows have been described for the search of new mechanisms of brain delivery. The first strategy relies on transcriptomic and proteomic approaches from either brain microvessels or endothelial cells of human [40], cynomolgus monkey [41], bovine [42], rat [33, 43] or mouse [14, 44–47], including human [34, 48–50] diseased brains. A second approach is based on phenotypic *in vitro* or *in vivo* screening of antibodies and peptide libraries displayed in various formats including phage and yeast [51–53]. Only a few attempts have uncovered new brain delivery

targets. Proteomics of rodent BECs have led to identifying CD98 heavy chain (a solute carrier) and Basigin (a matrix metalloprotease) along with the previously known LDL Receptor Related Protein 1 (Lrp1) and Insulin receptor (InsR). Phenotypic panning of naive llama single-domain antibody phage display for binding and internalization in primary human BEC versus primary human lung endothelial cells led to the discovery of FC5 and FC44 [52]. It was later shown that FC5 binds to Cdc50A (energy-dependent clathrin endocytosis) [54]. Our approach combines both strategies.

Within the COMPACT IMI consortium (<https://www.imi.europa.eu/projects-results/project-factsheets/compact>) a collaborative effort aimed at understanding biological differences among tissue barriers and developing drugs to target specific organs, a variety of proteomic, MicroArray and RNA sequencing studies were conducted using human primary endothelial cells from brain, liver and lung [13]. The resulting over 60,000 RNAs were then processed through several filters, downsizing to mRNAs not detected at all in liver and/or lung or with high differential levels in the brain, mRNAs with mostly transmembrane expression, association to the BBB vasculature, expression and selectivity comparable between rodents and humans and a high degree of conservation between orthologs. Finally annotation of human tissue, cell type and membrane localization using several public databases led to a few mRNAs such as those corresponding to basigin [14] and Low-density lipoprotein receptor-related protein 8 (LRP8) [15], which had already been identified as brain transport mechanisms, thus validating the approach. *ITM2A* was among these mRNAs. *ITM2A* had been identified in previous omics studies in rat [33, 34] and pig [35] BECs and reported to be specifically expressed in brain endothelial cells. However, the function of the ITM2A protein remains largely unknown, and it has never been characterized as a transporter in the brain.

ITM2A (alias E25A or BRICD2A) is a 263-amino acid protein with a single transmembrane domain [16]. Its ubiquitous expression is high in thymus, where it was shown to be an activation marker of thymocyte development [17]. ITM2A is mainly believed to be associated with cell differentiation during myogenesis [18, 19], chondrogenesis [20–24] and odontogenesis [25]. The overall homology between mouse and human ITM2A is more than 95% in the extracellular domain [26]. The ITM2A protein has a motopsin-binding Brichos domain within the C-terminal extracellular domain, but the significance of this domain is poorly understood [27]. The Brichos domains appear to bear a chaperone function in different biological situations and has been shown to bind amyloid fibrils [28]. The expression of ITM2A has

recently been shown to negatively regulate autophagic flux by inhibiting lysosomal function, through a physical interaction with vacuolar Adenosyl Tri Phosphatase [29].

Transcriptional expression of *Itm2a* in mouse and human brain has been reported to be homogenous in all brain regions (Protein Atlas) and quite specific of endothelial cells versus neurons, microglia, oligodendrocytes or astrocytes as shown in brain RNA-seq databases: *ITM2A* mRNA quantification by RNA-seq from <http://www.brainrnaseq.org/> shows high levels in mouse and human brain endothelial cells [30]. In fact, *ITM2A* is commonly referred to as an endothelial cell-specific gene [30]. An analysis of five human and murine cell type-specific transcriptome-wide RNA expression datasets generated within the past several years also identified *ITM2A* as one of the top expressed genes in endothelial cells [31]. A recent single cell RNA-seq analysis of 20 organs in mice also established the *Itm2a* gene as specific for brain endothelial cells [32].

Two precedents point to an association of *Itm2a* with the blood brain barrier. *Itm2a* was identified as microvasculature-specific through the screening of subtractive cDNA libraries from rat brain capillaries versus kidney/liver on one hand [33, 34] and from porcine brain and aortic endothelial cells on the other hand [35]. In addition, the expression of *Itm2a* found in freshly isolated porcine Brain Microvascular Endothelial Cells (BMECs) was shown to be lost when these cells were grown in culture, similarly to some other known BBB markers [35].

ITM2A as an endothelial brain specific transmembrane protein has not been associated in the literature with brain transcytosis or transport. The present report describes the work we undertook to characterize ITM2A and investigate the potential of targeting ITM2A to enhance drug delivery to the CNS.

Materials and methods

Animals

Male and Female cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) aged from 4.8 to 5.9 years were purchased from Le Tamarinier and Noveprim Ltd. (Mahebourg, Mauritius). Six animals were group-housed in aviaries or interconnected mobile cages and two animals were individually housed in interconnected mobile cages. Animals were housed under controlled conditions (20–24 °C, 40–70% humidity, 10–15 renewals per hour of filtered, non-recycled air, 12-h light cycle) with free access to filtered tap water and daily distribution of expanded diet (sodium dodecyl sulfate SDS, France) and fruits or vegetables. The animals from which brain microvessels were harvested had previously been used in pre-clinical studies; they were submitted to a drug washout period of at least 1 month before euthanasia and brain collection.

Male C57BL6/J mice aged from 6 to 8 weeks were purchased from Charles River Laboratories (France).

Pregnant C57BL/6J mice were purchased from Janvier Labs (France) between E10 and E12.

Upon arrival, mice were housed individually (for pregnant mice) or grouped (for male mice, 6 animals per cage) in an enriched environment in a pathogen-free facility at a constant temperature of 22 ± 2 °C and humidity ($50 \pm 10\%$) on a 12-h light/dark cycle with ad libitum access to food and water.

Male Wistar rats were purchased from Charles River Laboratories (Germany). Upon arrival, rats were housed individually in an enriched environment in a pathogen-free facility at a constant temperature of 22 ± 2 °C and humidity ($50 \pm 10\%$) on a 12-h light/dark cycle with ad libitum access to food and water.

Isolation of brain microvessels from cynomolgus monkey and rodent cortex

Brains from cynomolgus monkeys or rodents were collected immediately following euthanasia and placed in ice-cold Hibernate A medium (ThermoFisher). All subsequent steps were performed at 4 °C and under a biological safety cabinet. Brain cortices were isolated and placed in petri dishes containing ice-cold Hanks' Balanced Salt solution HBSS. The meninges and the cortical white matter were removed. The collected tissues were transferred into a new sterile container with HBSS, finely minced with a scalpel, and then pelleted by centrifugation (5 min at 600 g, 4 °C). The pellet was resuspended in a collagenase/dispase solution (Roche, Meylan, France, Collagenase 0.1 U/mL; Dispase 0.8 U/mL prepared in $(\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+})$ -free HBSS) containing type I DNase at 20 U/mL and Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride (TLCK) at 0.147 g/mL, and incubated at 37 °C for 60 min, under vigorous agitation. The digested tissue was carefully homogenized, and centrifuged for 5 min at 600g, 4 °C. The resultant pellet was resuspended in HBSS containing 20% Bovine serum albumin (BSA) and centrifuged at for 30 min at 2000g, 4 °C. The myelin ring-containing supernatants were discarded, and the vessel-containing pellet was resuspended and re-incubated in the collagenase/dispase solution in presence of DNase and TLCK for 30 min at 37 °C (except for microvessels from mice). This suspension was re-pelleted by centrifugation 5 min at 600g, 4 °C, and the final pellet [named passage 0 Day in vitro 0 (POD0) fraction from this point onwards] was resuspended in endothelial cell medium (endothelial basal medium EBM-2) supplemented with endothelial cell growth medium micro vascular (EGM-2 MV, Single Quots, Lonza, Basel, Switzerland) containing 3 g/mL puromycin, then seeded in pre-coated (collagen IV 100 g/mL, fibronectin 10 g/mL, Sigma, Saint Quentin

Fallavier, France) cell culture flasks, and incubated at 37 °C, 5% CO₂ for 7 days. Every 2 days the cell medium was changed; the puromycin concentration was lowered to 2 g/mL after 4 days, and subsequently removed. Following 7 days of expansion at P0D7, Brain Endothelial Cells (BECs) from cortex were further singularized and re-plated de novo for a further 7-day cell expansion (P1D7).

Stable cell line generation

Plasmid constructs

Several human influenza hemagglutinin (HA) human *ITM2A* cDNA with coding sequence NM_004867 and its variants were synthetically made by GeneART and introduced in a PiggyBac[®] transposon mammalian expression vector pBH 6450 with a Cytomegalovirus (CMV) promoter. The HA tag was inserted at different positions in the *ITM2A* sequence: at the NH₂ or the COOH side or in the Brichos domain; at the NH₂ or the COOH side of the Brichos domain or in the middle of this domain, in order to potentially disrupt its function. Plasmids were named: pBH-h*ITM2A* HA NH₂, pBH-h*ITM2A* HA COOH, pBH-h*ITM2A* wild type (wt), pBH-h*ITM2A* Brichos HA COOH, pBH-h*ITM2A* Brichos HA NH₂, pBH-h*ITM2A*4 Brichos HA mid.

Several Green Fluorescent Protein (GFP) *ITM2A* constructs with coding sequence: NM_004867 for human and NM_008409 for mouse were introduced in pcDNA6.2[™]C-Emerald (Em)GFP or pcDNA6.2[™]N-EmGFP expression vectors with CMV promoter and blasticidin resistance. The GFP tag was inserted at different positions in mouse or human *ITM2A* sequences: at NH₂ or COOH sides. Plasmids were named: pcDNA6.2[™]N-EmGFP-h*ITM2A*, pcDNA6.2[™]N-EmGFP-m*Itm2a*, pcDNA6.2[™]C-EmGFP-h*ITM2A*, pcDNA6.2[™]C-EmGFP-m*Itm2a*.

Cells and cloning

HEK293/CVCL_0045 cells were obtained from Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). For thawing: cells were thawed rapidly in a water bath at 37 °C, centrifuged at 900 g for 4 mn, and the pellet was re-suspended in culture medium. Cells were cultured in the following medium: Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco 21969; glutamine-free: selection pressure for HA tag or Blasticidin 15 µg/mL: selection pressure for GFP tag); 10% Foetal Calf Serum (Eurobio CVFSVF06 heat inactivated Australian), 100 U/mL Penicillin/Streptomycin Gibco 15140. At confluence, the cells were rinsed with Phosphate-buffered saline (PBS) (– Ca²⁺, – Mg²⁺), detached by enzymatic treatment (Accutase Sigma A6964 or trypsin) at 37 °C for 3 mn, centrifuged at 900g for 4 mn. The pellet was re-suspended

in culture medium and diluted 1/10 in fresh medium for seeding in new flasks.

Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell (hCMEC)/D3 cells were obtained from Cedarlane. Cells were cultured in the “Cell biologics” medium supplemented with H1168.

Bend3 and Madin-Darby Canine Kidney (MDCK1) cells were donated as a gift from Pr Gumbleton. Cells were cultured in 90% DMEM+GlutaMAX[™] with high glucose and sodium pyruvate (Life Technologies—10,569,010), 10% Fetal Bovine Serum (FBS).

HEK293/CVCL_0045 cells were transfected with pcDNA6.2[™]-*EmGFP* or co-transfected with PiggyBac[®] transposon expression vectors bearing wild-type or variant *ITM2A* cDNAs and transposase plasmids 6209 (10:1) using Lipofectamine 2000[®], following the manufacturer's instructions. Transfections were performed at 50% confluence in 24-well plates with 500 ng of plasmid. For stable transfections, clones were obtained by limit dilution in 96-well plates with blasticidin selection for pcDNA 6.2 or in glutamine-free media corresponding to the glutamine synthase selection marker of pBH 6450. Each individual cell was amplified in a 6-well plate, then *ITM2A* expression was checked first by visual inspection of the cells under a fluorescence microscope to detect the GFP tag, then by Western Blot for all the *ITM2A* constructs.

Antibody generation

Antigen preparation

The human and murine *ITM2A* extra-cellular domain (ECD) gene sequence was synthesized and fused to a human Fc in a mammalian expression vector. After preparation of transfection-grade DNA, a transient transfection of HEK293 cells was performed. After 7 days of culture, the *ITM2A*-Fc containing culture supernatant was isolated and purified by Protein A affinity chromatography according to standard protocols. After buffer exchange to PBS, the purified antigen was analyzed by UV/VIS spectrometry and SDS-PAGE.

Antibody-phage selection

The target protein (*ITM2A*-human Fc) and negative antigen (Protein N Standard, Siemens, QQIM13) were immobilized onto the wells of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) plate (Corning, 9018) for 1 h at room temperature (RT) (1 µg each). After removal of non-bound antigen, ELISA wells were blocked with a 2% BSA solution for 16 h at 4 °C. After washing of the plates with PBS-T (PBS containing 0.05% Tween 20), the antibody-phage library was added to the immobilized negative antigen and incubated for 1 h at RT to remove Fc specific or polyreactive antibody-phage. Additionally,

5 µg Protein N Standard was added as soluble competitor. Non-bound antibody-phage were recovered and incubated on the immobilized target antigen for 2 h at RT. Non-bound or weakly bound antibody-phage were removed by washing with PBS-T (10x) before antigen-specific phage were recovered by Trypsin (10 µg/mL) elution for 30 min at 37 °C. The antibody-phage were rescued by infection of TG1 cells (OD600 = 0.5) for 30 min at 37 °C. After propagation of the cells for an additional 30 min at 37 °C and 500 rpm, ampicillin (100 µg/mL) and glucose (100 mM) were added to the 2YT culture medium. Bacterial propagation was continued for 1 h at 37 °C and 500 rpm. Then, bacteria were co-infected with M13K07 helper phage, incubated at 30 min at 37 °C followed by another incubation for 30 min, 37 °C and 500 rpm. Double-infected bacteria were centrifuged (4000g, 10 min) and the cell pellet was resuspended in fresh 2YT, containing Ampicillin (100 µg/mL) and Kanamycin (50 µg/mL). For the amplification of antibody-phage particles, the incubation was continued for 16 h at 30 °C. Then, the culture was centrifuged (4000g, 10 min) and antibody-phage containing supernatant was recovered and used for the next panning cycle. Three panning cycles were performed in total. In each cycle, the number of washing steps was increased (cycle 2: 20 ×, Cycle 3: 30 ×) to increase the stringency of the selection.

Antibody screening and sequence analysis

After the third panning cycle, the eluted phage were used to infect XL1 (OD600 = 0.5) for 30 min at 37 °C and streaked out on 2YT agar plates, containing ampicillin (100 µg/mL), glucose (100 mM) and tetracycline (20 µg/mL). Incubation was continued at 37 °C until single colonies were observed. Single clones were isolated and transferred into 96-well plates, containing 2YT, ampicillin (100 µg/mL), glucose (100 mM) and tetracycline (20 µg/mL). The bacteria were cultured for 16 h at 37 °C and 300 rpm. Then, 15 µL of the overnight cultures were used to inoculate new 96-well plates, containing 2YT medium, ampicillin (100 µg/mL), tetracycline (20 µg/mL) and IPTG (50 µM). The bacteria were cultured for 16 h at 30 °C and 300 rpm. The cultures were centrifuged (4000g, 10 min) and Single-Chain Variable Fragment (scFv) containing supernatants recovered. The scFv containing supernatants were used for antibody screening. In brief, supernatants were diluted with a 2% BSA solution (in PBS, containing 0.05% Tween20), added to the immobilized antigens in a 384 well ELISA plate (20 ng/well) and incubated for 1 h at RT. After washing, binding of the scFv antibodies to human ITM2A-human Fc, murine ITM2A-human Fc, Protein N Standard or BSA was detected via a Myc-tag using a secondary horseradish Peroxidase (HRP) conjugated antibody. The binding

was quantified by TMB reaction and absorbance reading at 450 nm. Target specific antibody clones were isolated, and the DNA sequence of the respective scFv antibody analyzed by Sanger sequencing.

Immunoglobulin G (IgG) expression

The VH and VL sequence of selected antibody clones was amplified by PCR and cloned into mammalian IgG expression vectors. After preparation of transfection-grade DNA, a transient transfection of HEK293 cells was performed. After 7 days of culture, the IgG containing culture supernatant was isolated and purified by Protein A affinity chromatography according to standard protocols. After buffer exchange to PBS, purified antibodies were analyzed by UV/VIS spectrometry, SDS-PAGE and flow cytometry analysis for cell binding.

Transcriptomics

Transcriptome Sequencing (RNAseq) and mRNA Expression Analysis were conducted within COMPACT IMI (Li et al. [13]).

RNA samples for library preparation

As described previously by Chaves et al. [36], frozen cell pellets from the cellular P0D0, P0D7 and P1D7 fractions were lysed using QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, #79306, Courtaboeuf, France). Total RNA was then isolated from the lysates on a QIAcube instrument (Qiagen) using the RNeasy Mini QIAcube kit (Qiagen, #74116) and following the manufacturer's instructions. The RNA concentration was determined using the Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen, #Q32852, Illkirch-Graenstaden, France) and the quality and integrity was assessed on a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technology, Les Ulis, France) with an Agilent RNA 6000 nano kit (Agilent Technology, #5067-1511).

RNA sequencing (RNAseq)

As described previously by Chaves et al. [36], the RNAseq libraries were prepared with 30 ng of input total RNA using the NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, #E-7765S, Évry-Courcouronnes, France) with the NEBNext rRNA Depletion Kit (New England Biolabs, #E6310L) and following the manufacturer's instructions. The libraries were then paired-end sequenced (75 cycles × 2) on the NovaSeq 6000 instrument (Illumina, Paris, France) using the NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (300 cycles; #20027465, Illumina).

Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RTqPCR)

Cells or tissues were lysed with RLT buffer from Qiagen with 1% β-mercapto-ethanol according to the

manufacturer's instructions. mRNA was extracted with Qiagen MiniKit followed by DNase step using the Qiacube robot. Reverse Transcription was achieved from 250 ng of mRNA with High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit from AppliedBiosystem (ref. 4,368,813). qPCR was performed from cDNA diluted 1/20 using QuantStudio™ 7 in 384 wells with the TaqMan system standard mode and following the manufacturer's instructions. Taqman primers and probes were from ThermoFisher scientific inventoried assay (ref. 4,331,182): *Itm2a*: Mm00515208_m1; *Actin*: Mm01205647_g1; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) Mm99999915_g1; Platelet endothelial cell adhesion molecule (*Pecam*) 1 Mm01242576_m1. Raw data were analyzed with QuantStudio™ Real-Time PCR software.

Proteomics

Immunocytochemistry

Cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, at RT, and subsequently permeabilized and blocked in Odyssey LiCor Blocking Buffer containing 0.2% Triton X-100. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C (anti-ITM2A polyclonal AF4876 and 14407-1-AP, monoclonal non-commercial provider Yumab: Yu093-G04, Yu147-A01, Yu147-E02, Yu147-H07, anti-EmGFP A31852 or A11122, anti-HA 901509), and appropriate secondary antibodies conjugated with Alexa fluorophores (Invitrogen) and Hoechst 33342 (Invitrogen) for nuclei staining were subsequently used for 2 h at RT. Images were acquired on a Perkin Elmer Operetta CLS system.

Confocal imaging colocalization

Confocal microscope images were acquired with SP8 LEICA microscope, 40X objectives. For the acquisition ITM2A was directly visualized by EmGFP 488. Organelles were stained with the following primary antibodies: anti Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) ab24170 for lysosome detection, anti-giantin ab37266 for Golgi. Anti-organelle antibodies were detected by staining with appropriate secondary antibody Alexa 633 goat anti mouse A21050 1/1000 or goat anti rabbit A21070 1/1000.

Western blot

NHP-derived BEC were lysed using ice-cold radio-immunoprecipitation assay (RIPA) or cell lysis buffer containing protease inhibitor cocktail (ThermoFisher) centrifuged at 15,000g for 15 min, and supernatant fractions were collected. Samples were added to SDS and loading buffer then denatured by heat at 95 °C for

5 min. Denatured samples were loaded into 4–12% Tris–Glycine SDS-page gels (Invitrogen), and left to migrate for 1 h at 180 V. Samples were then transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) or nitrocellulose membranes using an iBlot 2 Dry Blotting System (Invitrogen) on the P0 program (20 V for 1 min, 23 V for 4 min, 25 V for 2 min). PVDF membranes were then rinsed with Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20 (TBST) and blocked for 1 h in 5% non-fat dry milk in TBST (blocking buffer). Membranes were first probed overnight at 4 °C with primary antibodies in blocking buffer (anti-ITM2A polyclonal AF4876 and 18306-1-AP, EmGFP A11122, anti-HA 901509, anti α -tubulin T9026) and then probed with secondary antibodies diluted in TBST for 1 h at RT (1:10,000 diluted HRP-coupled goat anti-mouse IgG or goat anti-rabbit IgG, GE Healthcare). Following secondary antibody incubation, membranes were rinsed thoroughly with TBST, imaged using a LICOR Odyssey Imager and bands quantified using Multi-Gauge v3.0.

Mass spectrometry

Post-mortem human brain samples (occipital cortex, devoid of pathological findings) from three 69 to 79-year-old, male, non-demented, control donors were obtained from external biological resource centers in full accordance with legislation and ethical standards. Microvessels were isolated as described above for monkeys. Tissues or cells were lysed in Preomics 2X buffer then crushed gently with MACS Dissociator (Miltenyi Biotec, program Protein for 1 min). Samples were centrifuged 10 min at 4000g, 4 °C, supernatants were collected and diluted in 1X Preomics buffer. Benzamide 1/100 was added and incubated 10 min at 95 °C, 1000 rpm. Samples were centrifuged 20 min at 13000g and supernatants were collected. Proteins were quantified by spectrophotometry using the bicinchoninic acid method and spectraMax i3x. 25 μ g of protein were digested on Preomics filter in 50 μ L following the manufacturer's instructions for 3 h at 37 °C; after evaporation, samples were diluted to 0.5 μ g/ μ L in 50 μ L LC-Load buffer, vortexed and sonicated. Heavy peptides were added to the sample solution to inject 5 fmol of heavy peptides and 2 μ g of proteins. Seven heavy stable isotope labelling (SIL) peptides were spiked in final digest prior to Parallel Reaction Monitoring-Mass Spectrometry analysis on Q-Exactive HF /NanoRSLC 3500. From ITM2A_MOUSE Integral membrane protein 2A Q61500, spiked SIL peptides for detection were: IAFNTPAVQK, NLVELFGK, EDLVAVEEIR, DLLLGFNK. Spiked SIL peptides used for hTFCR detection

were: DSAQNSVIVDK, LTVSNVLK, SGVGTALLLK, AAAEVAGQFVIK, LTTDFGNAEK.

Transport assays

Internalization assay

HEK293 ITM2A cells were cultured on 96-well plates coated with poly-L-lysine at 50,000 cells/well. After 24 h cells were incubated for 1 h at 4 °C in culture medium with 5 µg/mL of antibody (Anti ITM2A RandDsystem AF4876, Yumab antibodies anti ITM2A Yu147-A01, E02 and H07, Yu093-G04, GFP antibodies A31852 or A11122, anti-HA 901509). Cells were washed with ice cold PBS then incubated for 1 h at 37 °C or at 4 °C for control. Cells were washed twice with ice-cold PBS, then for 2 mn with acidic buffer (glacial acetic acid 1/167 in PBS, pH=2.5) and finally twice with ice cold PBS. Cells were fixed and stained as described above. Images were acquired with Operetta High Content Screening (PerkinElmer) objective 40X water confocal mode.

In vitro transcytosis and permeability measurements brainplotting models

All human samples were provided by Brainplotting [37] (iPEPS, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Hôpital Universitaire de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France) in partnership with Sainte-Anne Hospital, Paris (neurosurgeon Dr. Johan Pallud) and harvested during tumor scheduled resection surgery with written informed consent from the patients (authorization number CODECOH DC-2014-2229). Human brain microvessels were obtained from surgical resections of one patient: a 35-year-old female suffering from a diffuse oligo-astrocytic grade III glioma. Microvessels were isolated from peritumoral or healthy brain tissue using an enzymatic procedure [36] adapted from methods previously published for rats [38, 39]. Briefly, tissue samples were carefully cleaned of meninges and excess blood; then, an enzymatic mix was used to dissociate the tissues and microvessels were isolated by retention on a 10 µm mesh. Cells were cultured in EBM-2 medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 20% serum and growth factors (Sigma) [38, 39]. After seeding brain capillaries in petri dishes, brain primary microvascular endothelial cells were amplified and seeded (P1D0) on Transwell (Corning) with microporous membranes (pore size: 0.4 mm) in monoculture.

Test (1 µg/mL of internal anti-human/cynomolgus Transferrin Receptor C (TFRC) antibody or anti-ITM2A Yu093-G04) and control antibodies (1 µg/mL mouse IgG, clone MG1-45, BioLegend) were added to the upper chamber on the day adapted to the transport assay defined by Brainplotting as a function of TEER values. Fresh endothelial cell medium with none of these

compounds was added to the bottom chamber. Final aliquots from both chambers were taken 240 min following incubation at 37 °C, 5% CO₂. Compound levels in the original solutions (t=0 min), and in the upper and lower chambers (t=240 min) were determined by ELISA (MESOQuickPlex SQ120, MesoScale Discovery, Rockville, MD, USA). Apparent permeability (Papp) coefficients were calculated using the following formula:

$$Papp \text{ (cm/min)} = [V/(A \times Cluminal) \times (Cabluminal/t)]$$

where V=volume of cell medium in the bottom chamber (mL), A=surface area of the insert (cm²), Cluminal=compound concentration loaded in the upper chamber (µM), Cabluminal=compound concentration measured in the bottom chamber (µM); t=time of the assay (min).

ELISA immunoassay (in vitro and in vivo studies)

Standard 96-well sector plates (Meso Scale Discovery) were coated with 0.5 µg/mL of Fab'2 anti-Human (709–006-098 Jackson Immuno Research Labs) or anti-mouse (M0284 Sigma-Aldrich) IgG in PBS and then incubated for 1 h under agitation at RT. After incubation, plates were washed three times with PBS-Tween 0.05% (Calbiochem, 524653) and blocked for 1 h at RT with 0.1% BSA solution (A7030, Sigma). After blocking the plates, samples collected in the transport assay and standards were incubated on plates for 2 h at RT. After incubation, plates were washed three times with PBS-Tween 0.05%, and bound antibody was detected with SULFO-TAG conjugated goat anti-mouse antibody (R32AC-1, Meso Scale Discovery) or goat anti-human antibody (R32AJ-1, Meso Scale Discovery) using Tripropylamine containing read buffer (R92TC-2, Meso Scale Discovery). Concentrations were determined from the standard curve using a four-parameter non-linear regression program (Discovery Workbench version 4.0 software).

In vivo experiments

Mouse brain collection

Each mouse was anaesthetized in an isoflurane gas chamber then perfused through the heart with Li-heparinate solution at a final concentration of 20 U/mL in sterile PBS, using 48 mL of perfusion solution delivered at 8 mL/mn. Brain samples were collected. Each mouse was decapitated immediately after perfusion. The perfused brain was removed, cerebellum and brainstem were separated and eliminated. Brain cortices were washed in ice-cold PBS, collected in pre-weighed Precellys tubes and stored immediately at – 80 °C or on dry ice until use. Then, the pre-weighed hemispheres were thawed and homogenized in 5 vol. (v/w) of brain lysis buffer (1% NP-40 in PBS containing complete mini ethylene diamine

tetra-acetic acid—free protease inhibitor cocktail tablets, Pierce) using a bead homogenizer. Homogenized brain samples were then gently agitated at 4 °C for 1 h before centrifugation at 20,000g for 20 min.

Pharmacokinetic study in vivo in mouse

Five–ten mg/kg (35–70 nmol/kg) in a single dose of anti-ITM2A (clone Yu093-G04) or control [anti-trinitrophenyl (TNP), batch VA2-17-419-1, internal production] antibodies were administered by intravenous caudal injection into C57Bl/6 male mice weighing 20–25 g ($n = 3$ /condition). 5 h post-injection, plasma and saline-perfused brains were collected and antibody concentrations were determined by ELISA as described above.

In vivo panning in mice

Yumab provided an amplified phage library to Sanofi. First, a naïve human antibody phage library was enriched for antigen-specific antibodies against ITM2A proteins. The antibody phage output was amplified and purified by poly-ethylene glycol (PEG)/NaCl purification. Purified antibody phages were directly used for the in vivo panning: 10^{11} antibody phage particles ($\sim 10 \mu\text{l}$) were mixed from each panning output. The antibody phage mix was injected into the mouse. Brains were isolated after 1 h and 24 h ($2 \times$ each). Brains were collected as described above.

Antibody phages in the homogenate were used for infection of *E. coli*. Bacteria were selected and used for production of monoclonal scFv antibodies. About 800 clones were picked and screened by scFv in ELISA.

Statistical analysis

The statistical significance of differences between groups was analyzed using GraphPad Prism v9.0.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and Ordinary one-way Analysis of Variance (ANOVA) (non-parametric or mixed) with Dunnett's multiple comparisons test, Ordinary two-way ANOVA (mixed) with Sidak's, Kruskal Wallis or Mann–Whitney multiple comparison test or unpaired t test (non-parametric). The application of these statistical methods to specific experiments is noted in the figure legends.

Results

Our strategy is outlined in Fig. 1A: the first objective was to produce tools to study the mechanisms, cells overexpressing ITM2A and the extracellular domain of the protein to enable producing anti-ITM2A antibodies with affinity for both human and mouse ITM2A. With these antibodies, experiments measuring uptake, internalization, and trafficking in either the above overexpressing cells or in BECs provide the first filter. Subsequent

evidence of transcytosis and in vivo brain pharmacokinetics would lead to final validation of ITM2A as a potential brain delivery target (Fig. 1A).

Generating cell lines overexpressing ITM2A

In the absence of available monoclonal antibodies, we devised a strategy that could bring clues on the potential of this protein to carry biologics into the brain using specific well-characterized cargos. To this end, we engineered several constructs of human or murine *ITM2A*. One plasmid, named wt, was designed with no tag, the others bearing either an HA-tag (i.e., amino acids 98–106 of human influenza hemagglutinin glycoprotein) or a GFP-tag at different positions, namely on the C-Terminal (C-Ter) extracellular domain or on the N-Terminal (N-Ter) intracellular domain of ITM2A; in addition, the HA tags were positioned at three distinct locations of the Brichos domain within the extracellular portion (Table 1) to bring additional insight on the potential position involved in internalization. We selected adherent HEK293 cells since they are well suited for immunofluorescence analyses and produced 10 clonal cell lines by recombination with the various tagged or untagged mouse or human plasmids displayed in Fig. 1B and Table 1. Clones were obtained after limit dilution and selection by either fluorescence and Western Blot for GFP tag or by Western Blot for HA tag and wt *ITM2A* (Additional file 1).

Fluorescence visualization of ITM2A

After cell line validation for the ITM2A construct protein expression by Western Blot (WB), cellular localization of both human and mouse ITM2A was visualized by fluorescence microscopy in cell lines using GFP fluorescence (Fig. 1C). GFP fluorescence was detected in all N-Ter and C-Ter constructs in HEK293 cells overexpressing either human or mouse ITM2A.

Cellular localization of ITM2A

Aside from membrane localization, ITM2A was found to be localized in the Golgi system of the overexpressing HEK293 cells, as shown by co-localization with Giantin (Fig. 1D). No ITM2A could be seen in the lysosomes as shown by LAMP1 co-labeling (Fig. 1D).

Cell uptake of antibodies

With these cell lines in hand, we went on to evaluate their capacity to uptake antibodies after binding with the protein, using several approaches.

First, we performed immunofluorescence studies on HEK293 cells overexpressing human ITM2A with two commercially available polyclonal antibodies against extracellular epitopes of human ITM2A: AF4876 and

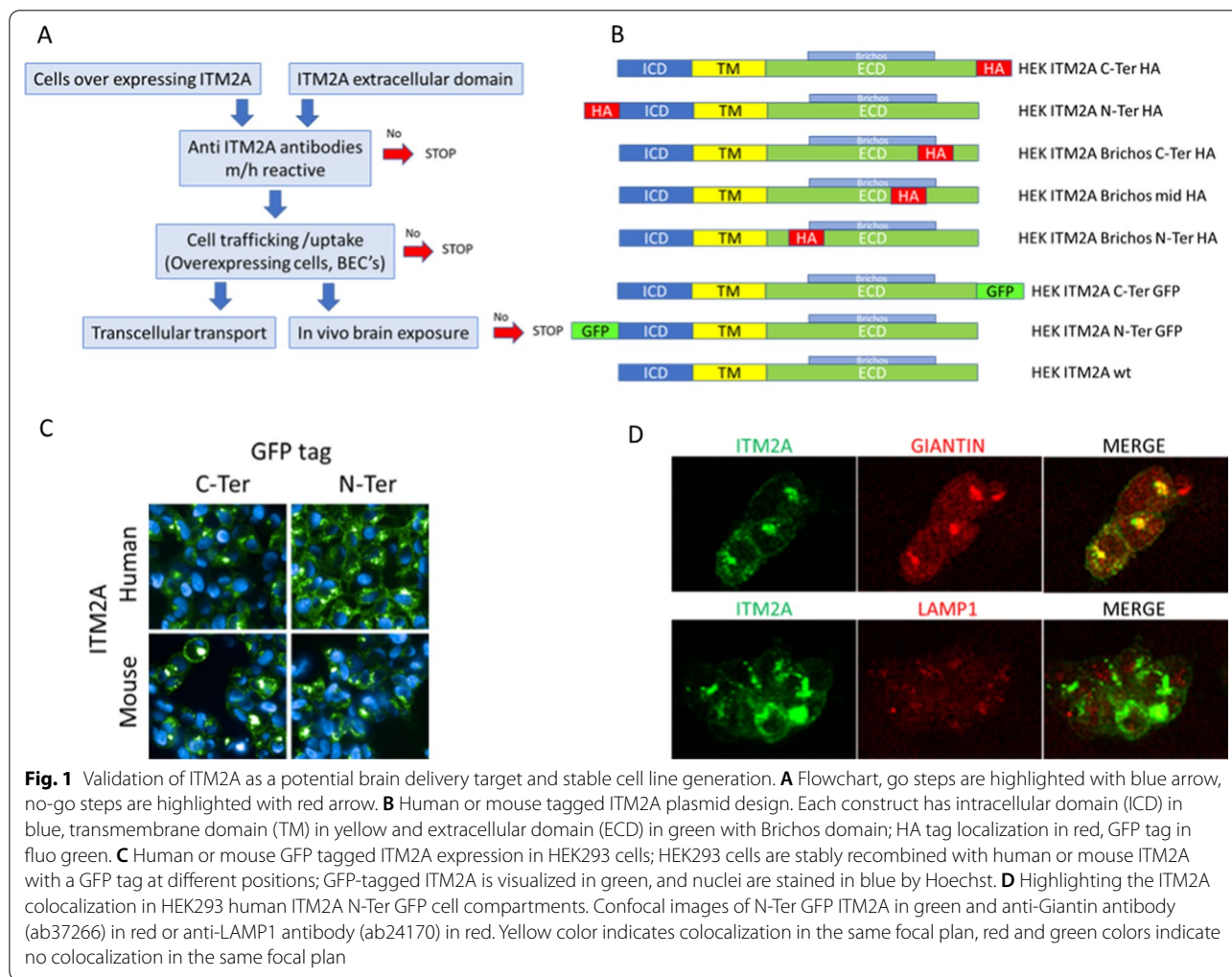


Table 1 Engineered HEK293 cells overexpressing various tagged or untagged human or mouse *ITM2A*

Mouse <i>itm2a</i>		Human <i>ITM2A</i>	
GFP tag	HA tag	GFP tag	No tag
N-Ter	N-Ter	N-Ter	wt
C-Ter	C-Ter	C-Ter	
	Brichos 1 C-Ter		
	Brichos 2 N-Ter		
	Brichos 3 Mid		

14407-1-AP (Fig. 2A). The first one displayed membrane labeling at 4 °C while the second one could not be detected at 4 °C, possibly due to a lower affinity or different behavior after acid washing (performed before analysis). Both antibodies readily internalized at 37 °C leading to punctate labelling, demonstrating active uptake. The weaker signal observed with AF4876 on the C-Ter GFP cell line could result from steric hindrance

of the GFP tag for antibody binding. The same results were obtained using fluorescent anti-GFP antibodies (A31852), or after detection of an unlabeled anti-EmGFP antibody (A11122) with a secondary labeled Alexa 647 anti-Fc rabbit antibody (Fig. 2C). In both cases, very clear membrane labeling could be observed at 4 °C followed by internalization at 37 °C with the HEK293 cells overexpressing human and murine C-Ter GFP ITM2A, but not N-Ter GFP ITM2A, confirming the need for the GFP tag to be extracellular for recognition.

We generated analogous results in HEK293 cells with anti HA antibodies (Fig. 2A), where clear internalization could be observed when the label was in C-Ter, leading to punctate labelling, confirming that ITM2A was functional and able to internalize cargos such as antibodies into cells.

Similar results were obtained with anti GFP antibodies and mouse ITM2A GFP constructs in HEK293 cells overexpressing mouse ITM2A with C-Ter and N-Ter

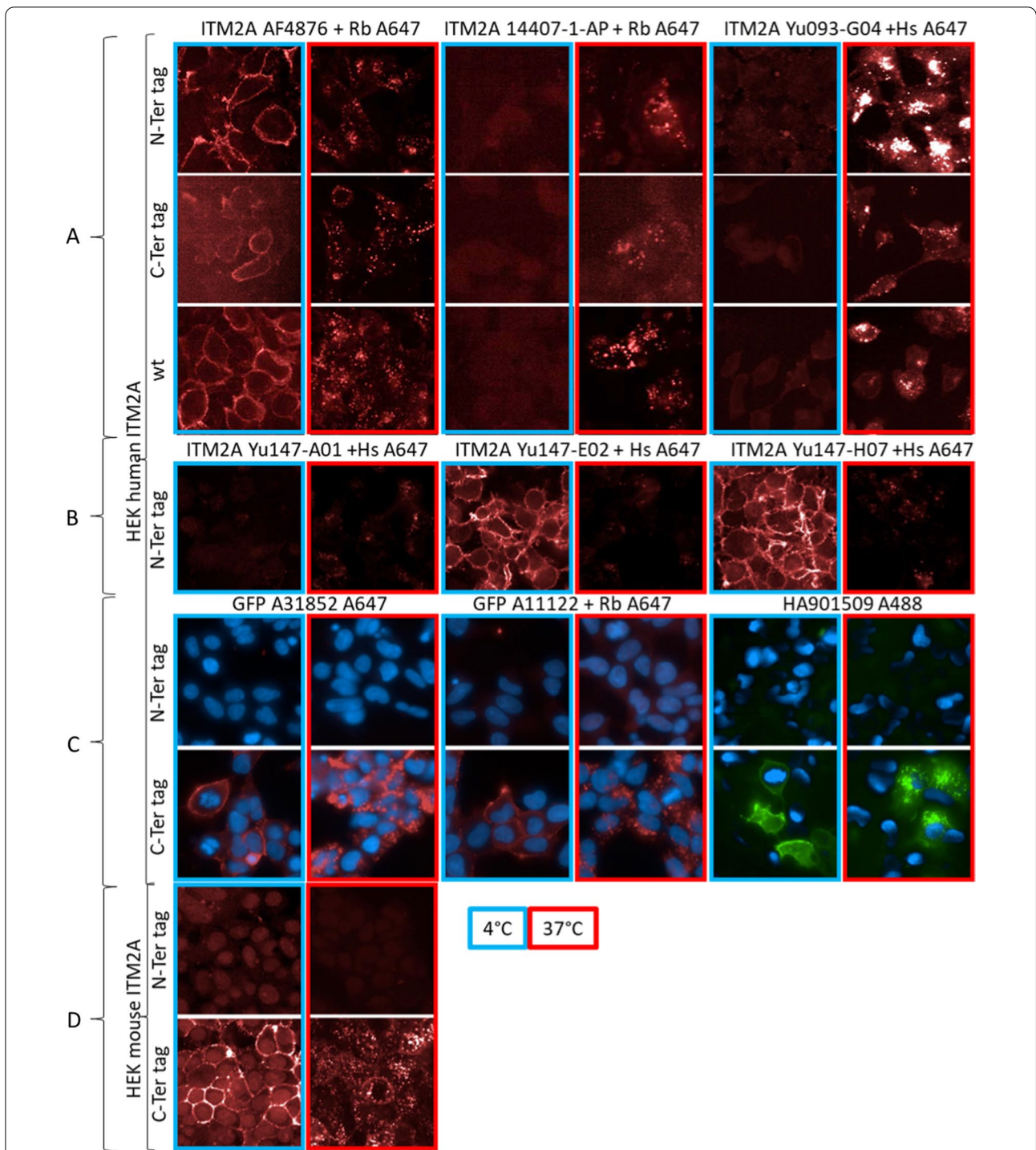


Fig. 2 ITM2A uptake and internalization of several antibodies (anti-ITM2A, anti-GFP or anti-HA) on HEK293 human and mouse. **A, B** internalization of anti ITM2A revealed with anti-species Alexa 647 in red on HEK293 hITM2A wt, hITM2A GFP N-Ter and hITM2A GFP C-Ter. **C** internalization of anti-tag antibodies: anti-GFP A31852 Alexa 647 in red, anti-GFP A11122 revealed with anti-Rabbit Alexa 647 in red and anti-HA 901509 Alexa 488 in green on HEK293 hITM2A wt, hITM2A tag N-Ter and hITM2A tag C-Ter. **D** internalization of anti GFP A31852 revealed with anti-Rabbit Alexa 647 in red on HEK293 mouse ITM2A

GFP demonstrating functional internalization of mouse ITM2A (Fig. 2D).

Production of monoclonal ITM2A antibodies

A campaign was launched in collaboration with Yumab and the COMPACT IMI consortium to generate mouse/human cross-reactive monoclonal antibodies. The genes of the murine and human *ITM2A* ECD were synthesized and fused to the human IgG1 Fc part on a mammalian antigen expression vector. After transient transfection of HEK293 cells, the ITM2A-Fc fusion proteins were expressed, secreted by the cells into the culture medium and purified. A total of four different antibody selections were performed using two antibody libraries consisting of human kappa or lambda antibodies, comprising together a diversity of more than 10^{10} different antibody sequences.

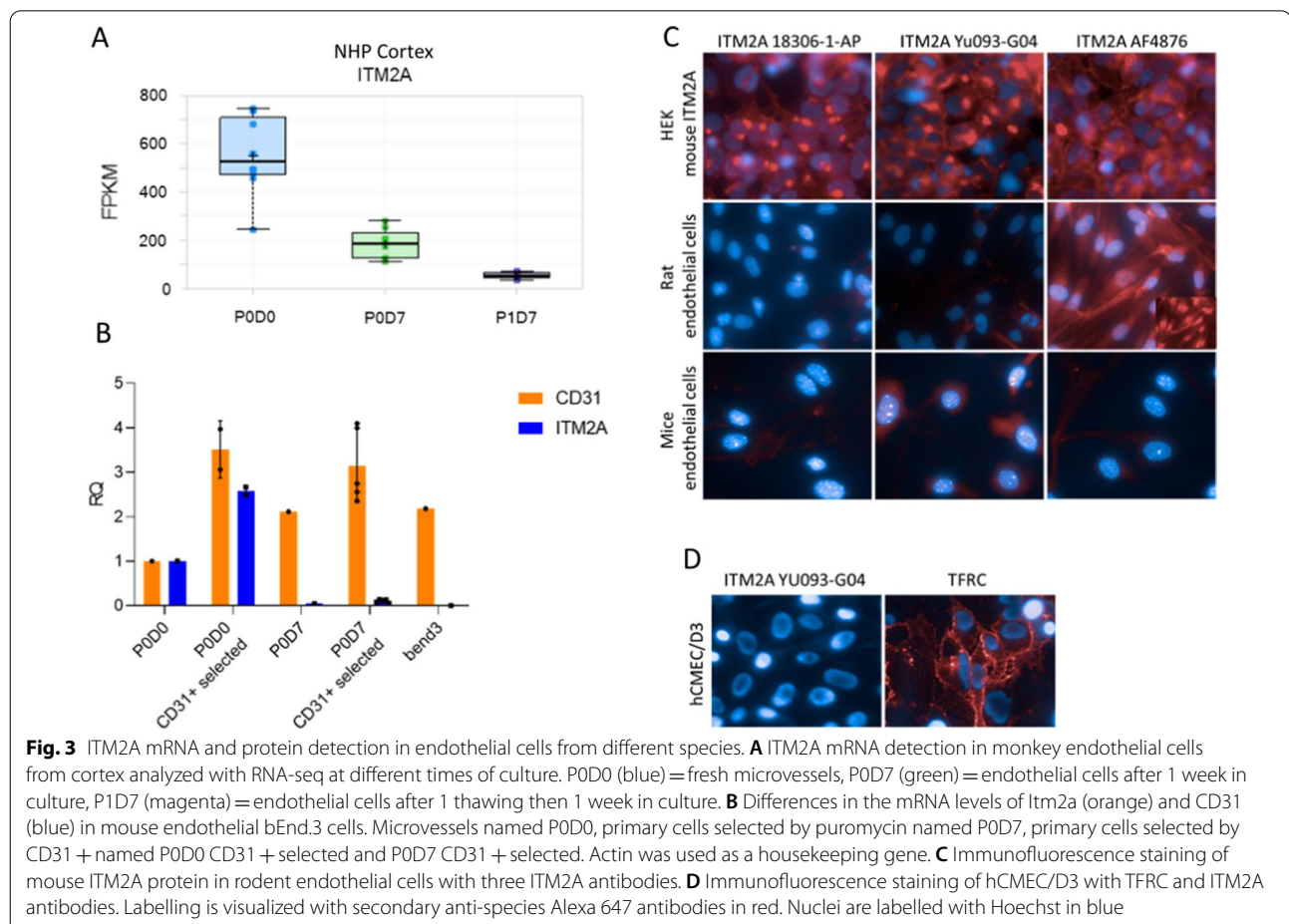
From 2304 clones tested for binding activity on the murine and human ITM2A, 220 cross-reactive and 15 mouse-specific hits were identified. 19 cross-reactive antibodies with unique sequences were selected, produced and purified as fully human IgG in HEK293 cells.

Testing these antibodies on human ITM2A overexpressing HEK293 cells revealed a low correlation between binding to the recombinant protein and cell binding. Four IgG antibodies did exhibit potent cell binding. These antibodies could demonstrate binding and internalization similar to those shown previously. For instance, when HEK293 cells overexpressing wt, C-Ter or N-Ter GFP-ITM2A were exposed to Yu093-G04, internalization occurred readily at 37 °C (Fig. 2A). Similarly Yumab Yu147-A01, Yu147-E02 et Yu147-H07 and the control AF4876 displayed binding at 4 °C to HEK293 cells. Upon washing and warming to 37 °C they were internalized, as evidenced by a punctiform labeling inside cells (Fig. 2B).

ITM2A expression in BECs

With antibodies demonstrating binding and uptake in hand, our next step was to evaluate their capacity to perform transcytosis. Before testing our ITM2A antibodies in models of transcytosis, we checked whether we could find ITM2A expression in our BECs.

First, we assessed *ITM2A* mRNA levels in brain endothelial primary cells and cell lines. mRNA levels were



rapidly lost when non-human primate brain endothelial cells were grown in culture (Fig. 3A, cortex shown). Similar downregulation after culture was also observed in mouse primary BECs (Fig. 3B). In comparison, cluster of differentiation 31 (CD31), a specific marker of endothelial cells, retained high expression throughout the culture. This downregulation most certainly also explains why no expression of mouse *Itm2a* could be found in bEnd.3 cell lines (Fig. 3B).

Likewise, we could not detect endogenous ITM2A protein in primary endothelial cells from brain cortex of mouse or rats by immunolabelling compared to mouse ITM2A overexpressing HEK293 cells which displayed nice immunolabeling with anti-mouse ITM2A antibodies (AF4876, 18306-1-AP and Yumab Yu093-G04). (Fig. 3C). No signal or a non-specific signal was detected in primary cells, in contrast to HEK293 cells overexpressing ITM2A. Similarly, we could not detect endogenous ITM2A protein in hCMEC/D3 by immunolabelling compared to TFRC, probably due to the downregulation of *ITM2A* in culture (Fig. 3D). As immunolabelling showed no signal for ITM2A, we checked the level of ITM2A by WB using commercially available polyclonal antibody AF4876 and as a control we evaluated the mouse ITM2A-GFP fusion in HEK293 cells using an anti GFP antibody. The protein was well detected at the expected molecular weight (MW) (30 kDa for ITM2A + 27 kDa for GFP) in the HEK293 ITM2A-overexpressing cells but could not be detected in mouse, rat or monkey primary endothelial cells or astrocytes, nor could it be detected in other cell lines (bEnd.3, MDCK1, hCMEC/D3) (Fig. 4A).

We checked *itm2a* mRNA expression in mice of different ages but could not see any marked difference. Detectable expression [*itm2a* Cycle Threshold (Ct) = 25 vs *gapdh* Ct = 21] was present throughout post birth (P1) to six weeks of age in the cortex of mice (Fig. 4D). However, when these brain fractions were analyzed by WB, no band at 30 kDa could be identified (Fig. 4C).

Proteomic studies to quantify ITM2A

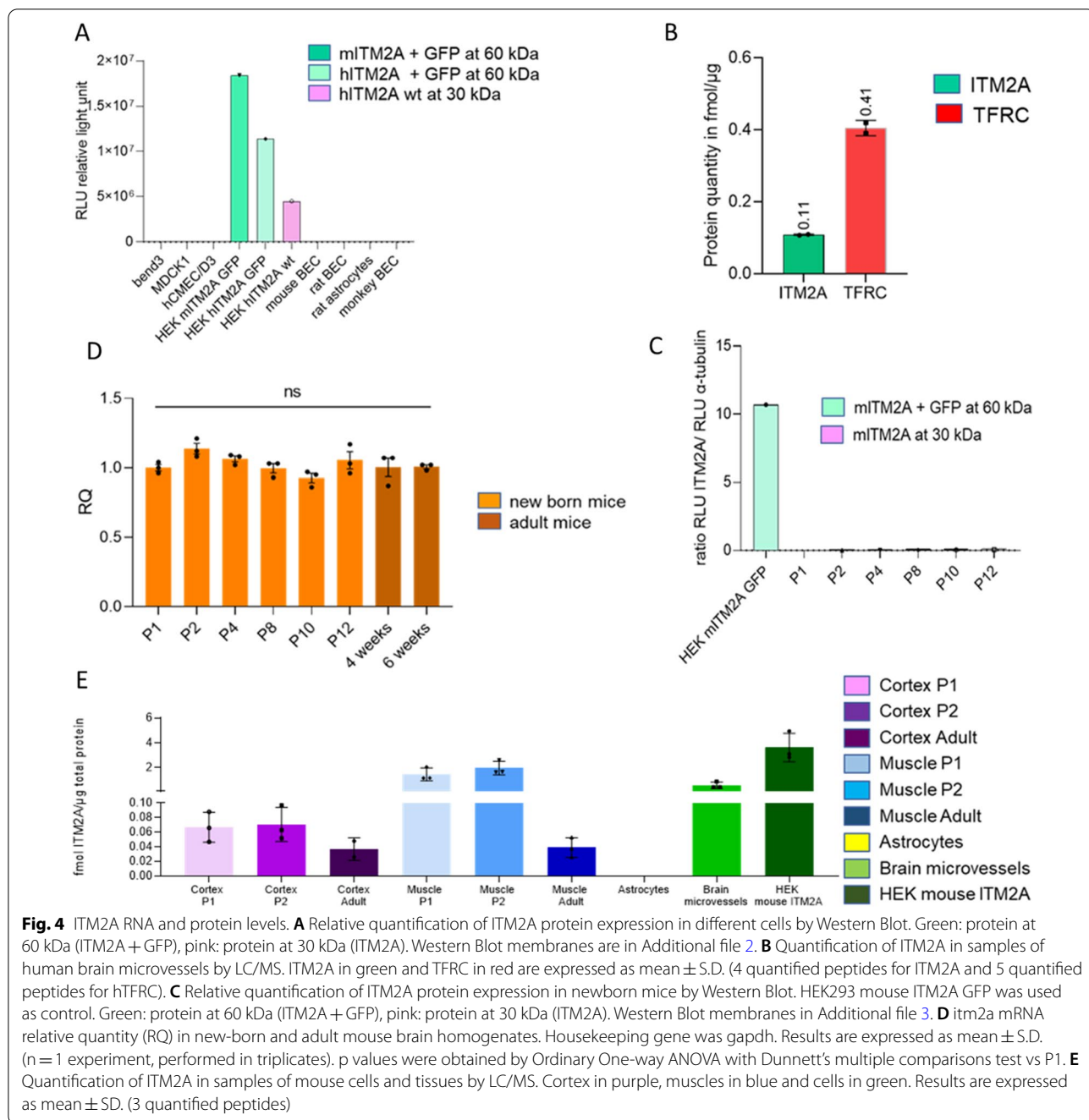
To clarify whether ITM2A protein was or not present in the mouse, proteomic studies were conducted in mouse cortex and muscle of newborn (P1 and P2) and adult mice, along with freshly prepared astrocytes and brain microvessels in comparison with HEK293 cells overexpressing mouse ITM2A. By Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry (LC/MS), six endogenous peptides belonging to C-Ter or N-Ter ITM2A were used for detection and quantification. The results are shown in Fig. 4E. While ITM2A was well detected in newborn muscle samples and in brain microvessels, less ITM2A was detected in both newborn and adult cortex samples and in adult muscle samples and no ITM2A was

detected in astrocytes. After quantification of ITM2A in each sample, protein intensities were calculated by averaging peptide intensity values (Fig. 4E). Newborn cortex and muscle, brain microvessels and HEK293 cells overexpressing mITM2A averaged 0.1; 1.7; 0.6 and 3.6 fmol of ITM2A per μg of total protein content, respectively. From these experiments, it was concluded that ITM2A could be quantified in mouse brain and muscle albeit to a much lower extent in adult muscle and in cortex from newborn and adult. The protein was higher in brain microvessels freshly isolated from adult wild-type mice than in cortex homogenates, pointing to endothelial cell enrichment. Levels of TFRC in mouse brain microvessels were in the same range (0.8 fmol/ μg). These results suggest that WB conditions might not have been sensitive enough to detect such levels of ITM2A. This was verified by diluting lysates of HEK293 cells overexpressing mouse ITM2A. From the above-determined levels of 3.6 fmol ITM2A/ μg of protein we determined that our limit of detection using Western blotting (Additional file 4) was 7.2 fmol of ITM2A, over ten-fold the levels found in brain microvessels. Finally, ITM2A was quantified in human microvessels and found to be four times lower than TFRC (ITM2A 0.11 fmol/ μg of total protein vs TFRC 0.4 fmol/ μg of total protein, which could suggest lower transcytosis efficacy (Fig. 4B).

In vitro transcytosis in human primary BBB model

As the ITM2A protein could be quantified, we decided to study one of our anti-ITM2A antibodies in a transcytosis model. Because of the strong ITM2A downregulation in cultured cells, cell line derived models were excluded. Even primary models which require a minimal culture to access enough endothelial cells were ruled out as we showed that in our NHP primary model ITM2A was already strongly downregulated. Preparation of human primary endothelial cells suitable for transcytosis was difficult owing to the challenge of obtaining very fresh post-mortem human brains. We decided to turn to a human primary BEC model prepared from freshly resected brain tissue from glioblastoma or epilepsy surgeries provided by Brainplotting.

The anti ITM2A Yu093-G04 antibody was evaluated in the model. As illustrated in Fig. 5A, the antibody did not perform better than a control antibody. In this model, an anti-TFRC receptor antibody systematically performed better than the control antibody. As shown in Fig. 5B, controls such as P_{app} control antibody, P_{app} fluoresceine and TEER measurement were not significantly different in Transwell incubated with anti-ITM2A antibody Yu093-G04 or with anti-TFRC antibody.



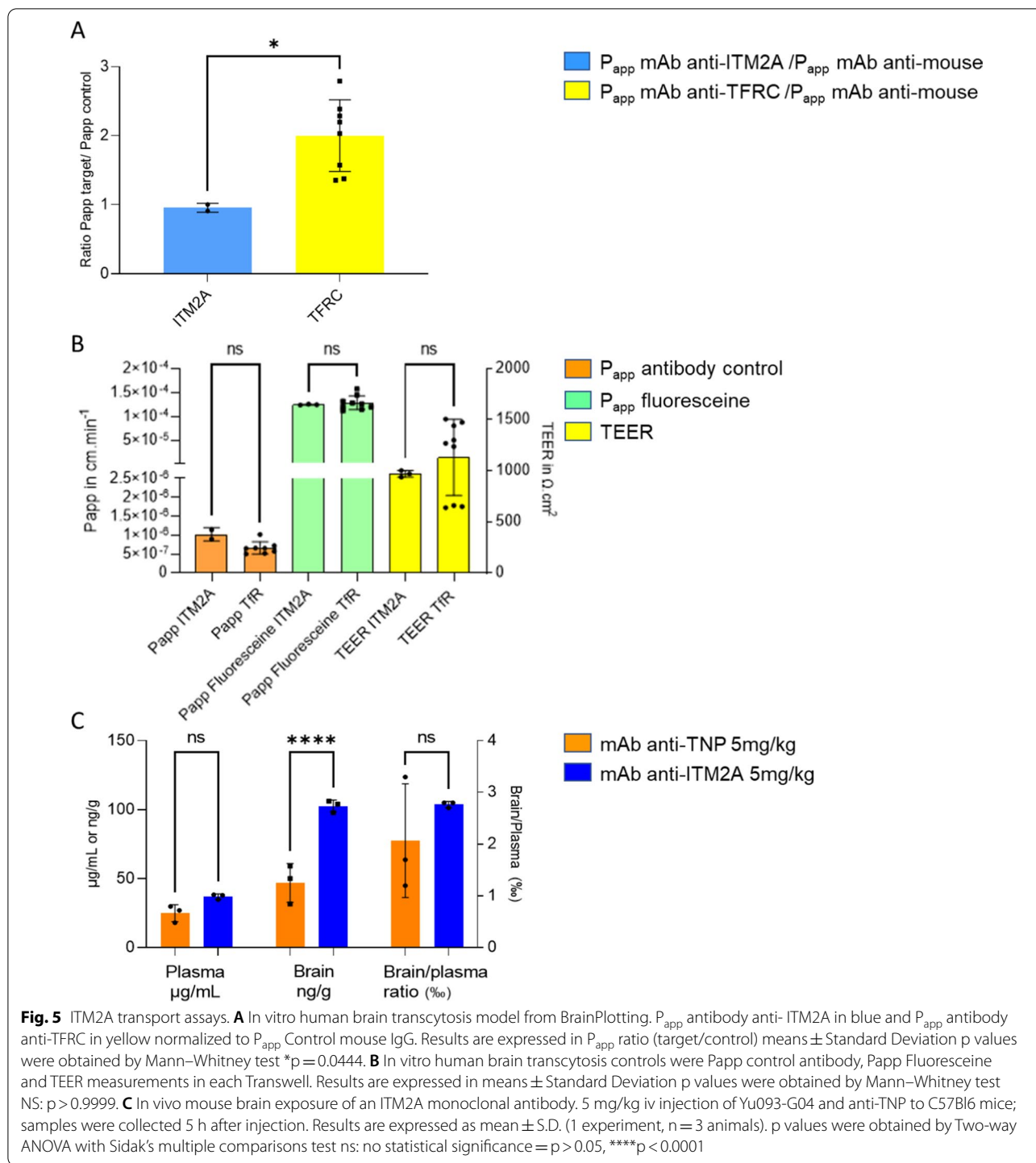
In vivo mouse brain exposure of ITM2A antibodies

To finally conclude on the potential of this protein to enhance brain exposure of antibodies, two in vivo mouse experiments were conducted.

A single administration study in mice of the anti ITM2A monoclonal antibody (mAb) Yu093-G04 versus a control anti-TNP mAb was performed and levels of the mAbs in brain and plasma after 5 h were determined by ELISA. There was a weak (≥ two-fold) increase in brain

exposure of the anti-ITM2A mAb compared to the anti-TNP (control) antibody (Fig. 5C).

In a second experiment, a naive human antibody-phage library was enriched for antigen-specific antibodies against ITM2A. The antibody-phage output was amplified and purified by PEG/N antibody purification. The purified phage display library of more than 6 million phages (panning campaign PC084, Strategy S1-1-10, panning rounds 3, diversity 6.3.10⁶, titer ~ 1.10¹³ cfu/mL) anti



ITM2A ScFv's was used in vivo panning and injected in mice. Brains were isolated after 1 h and 24 h and the brain homogenates were used to perform infection of *E. coli*. Picking of ~800 clones, screening of scFv supernatant in ELISA and on cells did not allow to identify any ITM2A phages in the brain.

Discussion

To investigate a putative transport mechanism for ITM2A along with potential for delivering drugs to the brain, we first developed cells overexpressing the protein with the aim to determine its localization and to assess binding and uptake of anti-ITM2A antibodies. At the

start of this effort, we did not have access to monoclonal anti-ITM2A antibodies. Several anti-ITM2A antibodies were reported [17, 29] or commercially available but most were polyclonal. We reasoned that engineering the protein with GFP and HA tags at the C-Ter (extracellular domain) position of the protein, could serve the double purpose of visualizing its cellular localization using GFP fluorescence and allow the study of binding and uptake with antibodies against these tags. This strategy of tagging a protein to circumvent the absence of monoclonal antibodies has actually been reported for ITM2A and has helped decipher its role in the hedgehog signalling pathway [40]. Tags at the N-Ter were also engineered as controls along with several positions within the extracellular Brichos domain, toward bringing information on the precise site involved in endocytosis. Exposure of the cells to anti-GFP antibodies first allowed to confirm ITM2A's plasma membrane localization. Cellular localization of ITM2A has been looked at in a few cell systems and shown at the plasma membrane, in large cytoplasmic vesicles, possibly endosomes, and in the Golgi system [17]. In particular, cytosolic localization has been reported in HEK293 cells overexpressing ITM2A where the protein could be found colocalized with LAMP1 in lysosomes [29]. We confirmed the presence of ITM2A in the Golgi system but not in lysosomes in our colocalization experiments using GFP tags. In addition to antibody binding, HEK293 cells demonstrated nice uptake of anti GFP or HA antibodies respectively. Both binding and uptake were specific of cells overexpressing ITM2A proteins bearing extracellular tags. The cells overexpressing ITM2A proteins bearing intracellular tags did not lead to binding or uptake with these antibodies, confirming that this uptake was specifically linked to extracellular binding to ITM2A. Internalization of receptors genetically engineered with extracellular tags such as HA, cMyc, EGFP, has been documented in the literature with some G-coupled receptors [41], Transforming Growth Factor β [42] or erythropoietin [43] receptors. However, this uptake is far from systematic, and many antibodies do not internalize upon binding their antigen receptors as shown for instance by Jacobsen et al., with an anti-Myc antibody and myc-engineered GPR6 and β 2-adrenergic receptors [44]. The specific uptake of these antibodies upon binding to the extracellular part of the ITM2A protein was interpreted as a positive signal and gave us the second go for our validation flowchart. Monoclonal anti ITM2A antibodies were later designed and generated using the extracellular domain of ITM2A as antigen and the resulting antibodies confirmed the uptake seen previously.

Our next objective was to demonstrate that this uptake could lead to transcytosis in polarized endothelial cells. For this we needed a human or rodent transcytosis model

overexpressing the protein, since our anti ITM2A antibodies are cross-reactive. From the COMPACT IMI consortium studies, it had been shown that the protein could no longer be found after one cell passage. We show here that *ITM2A* expression is strongly downregulated in cultures of either non-human primate [36] or mouse primary BEC's (Fig. 3A, B) as is the case for several BBB genes after cell line establishment or culture [45, 46] and has already been shown specifically with *ITM2A* [35].

Most expression studies reported in the literature about ITM2A are transcript-based. In humans, a substantial amount of the *ITM2A* transcript can be found in the brain as detailed in databases such as Gtexportal, Stanford, GenCard or the Open Targets Platform. In addition, according to Zhang et al. in humans, the amount of *ITM2A* mRNA in endothelial cells was evaluated at 150 Fragments Per Kilobase Million (FPKM) versus 23 FPKM for *TFRC*, a well-known transcytotic receptor, while in total brain the two proteins accounted for 2 FPKM. In mice, the amount of *ITM2A* mRNA was evaluated at 2000 FPKM in endothelial cells against 800 FPKM for *TFRC* and respectively 80 and 60 FPKM in the total brain for the two proteins [30].

Our own RNA-seq study in non-human primate brain microvessels had shown intermediate expression of *ITM2A* in cortex, hippocampus and septum (FPKM 9–16) and very low expression in liver [36]. By comparison in the same study, *TFRC* had shown a high expression (FPKM 75–125) in brain structures [36]. Mitsui [27] reported that the ITM2A protein was strongly detected in the lysates of mouse cerebral cortex between P0 and P10, and gradually decreased towards adulthood. Our own experiments in mice from P0 to 6 weeks of age showed that their *Itm2a* mRNA content remains constant throughout age. However, the ITM2A protein could not be detected by WB in any of the samples, nor could it be detected in mouse, rat or monkey primary endothelial cells or astrocytes or in other cell lines (bEnd.3, MDCK1, hCMEC/D3) as opposed to the HEK293 cells overexpressing ITM2A where a strong band could be seen (Fig. 4A). The theoretical MW of ITM2A is of ~30 kDa (Gencards or Proteintech) and it was reported that post translational modifications lead to an apparent MW of 43 and 45 kDa, probably resulting from N-glycosylation at amino acid position 166 [17]. However, no protein could be detected around this MW either. Fluorescence gave the same results with a strong signal for the HEK293 cells and no signal for endothelial rat or mouse cells or hCMEC/D3 cells, confirming results from Masuda et al. [47].

Using more sensitive proteomics, we were able to measure the levels of ITM2A in mouse brain microvessels. These levels have been confirmed to be under the

limit of detection of our WB conditions. Nevertheless, as these levels were in the same range as the ones found for TFRC in the same study, we considered that it was worth conducting a transcytosis experiment.

One of our monoclonal anti-ITM2A antibodies was therefore evaluated in a model based on primary cultures of human BMEC from BrainPlotting [37]. These cells are prepared from fresh brains derived from surgical resections and are used after a very short time in culture, which could reduce the changes in phenotype seen when these cells are cultured for longer durations. In this model, a TFRC antibody reproducibly showed enhanced apparent permeability versus a control antibody. However, when the ITM2A antibody was evaluated in the same conditions, no difference in permeability versus the control was observed (Papp ITM2A $0.97 \cdot 10^{-6}$ versus control $1.02 \cdot 10^{-6}$ $\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$). As we had no information regarding the status of ITM2A levels in this model, we could not clearly conclude on this experiment.

The area of predictivity of in vitro blood brain barrier models is still a matter of intense research and debate. Even if brain exposures of some antibodies have been linked to their apparent permeabilities in in vitro transcytosis models [48, 49], this was shown in cases where in vitro and in vivo experiments were performed in the same species as described by Stanimirovic et al. in rat [48]. In vivo brain exposure, distribution and pharmacokinetics are dependent on a series of dynamic processes, linked also to target engagement, localization and cellular trafficking. All these would be difficult to recapitulate in an in vitro model, and even more so for species-to-species predictions where additional parameters such as anatomy, capillary bed density, molecular composition, as well as the density of specific BBB transporters [48] need to be considered.

To conclude about the potential of ITM2A to transport antibodies to the brain, we used one of our specific anti ITM2A antibodies directly in vivo to determine its brain exposure in mice. When injected at 5 mg/Kg Yu093-G04 could be measured in brain parenchyma 5 h after injection with a two-fold higher level than a control antibody. The brain/plasma ratios were not very different between ITM2A and control antibodies (both around 0.3%). This ratio was in the range of what is described in the literature regarding brain/plasma ratio for antibodies with no modification to enhance brain delivery: 0.1% in the rat [50, 51] and 0.01% in primates [50–52]. To further evaluate if this modest brain exposure increase was mechanism-related and to monitor an early time after injection (1 h), we performed in vivo panning of a library of anti ITM2A antibodies. A naive human antibody-phage library was enriched for ITM2A specific antibodies against recombinant protein ITM2A and the antibody-phage output was

amplified and purified by PEG/NaCl purifications before injection to a single mouse. The brain was harvested at 1 and 24 h after injection and the homogenates were used for infection of *E. coli*. From this no hit was identified, suggesting that none of the antibody-phages were able to specifically reach the brain parenchyma. Phages are huge entities, and their barrier crossing might be more difficult than isolated antibodies. In addition, our anti-ITM2A antibody could be trapped in the vessels or recycling [53]. Alternatively, the epitope recognized by the antibody we selected for the in vivo study might not be the one leading to transcytosis. To finally conclude on the fate of anti-ITM2A antibodies after in vivo injection and their potential to enhance brain exposure, several antibodies recognizing distinct epitopes should be compared, and the antibody levels measured in both parenchyma and vessels. Luminal expression is key for a brain delivery mechanism. It would be important to analyze luminal/abluminal localization of ITM2A. This could be performed using in vivo biotinylation [54] or colocalization experiments with PGP on mouse brain sections by immunohistochemistry [55]. At this stage, we considered that the enhancement that could be obtained with ITM2A was not at the level that could be of interest for a potential application to a therapeutic project.

Conclusions

Our work combines transcriptomic profiling leading to selecting ITM2A as a potential brain specific target, with in vivo phage panning of an anti ITM2A phage library. Our approach illustrates the complexity of such an endeavor. Beyond the technical challenge of getting access to pure human primary endothelial cells, highly expressed proteins are often down regulated when endothelial cells are grown in culture, making it difficult to study them in functional cellular models, and human-mouse cross-reactive monoclonal antibodies are necessary for validation in rodent models. In addition, potential targets might have different functions in rodents and humans, although we have no indication that this could be the case for ITM2A. ITM2A might remain a valid target for enhancing the delivery of drugs to the human brain but its validation might prove quite complex.

Abbreviations

ANOVA: Analysis of variance; BBB: Blood brain Barrier; BEC: Brain endothelial cell; BMEC: Brain microvascular endothelial cells; BSA: Bovine serum albumin; CD: Cluster of differentiation; CMV: CytoMegaloVirus; CNS: Central nervous system; COMPACT: Collaboration on the optimization of macromolecular pharmaceutical; Ct: Cycle threshold; C-Ter: C-terminal; EBM: Endothelial basal medium; ECD: Extracellular domain; ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; Em: Emerald; FPKM: Fragments per kilobase million; GAPDH: Glycer- Aldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GFP: Green fluorescent protein; HA: HemAgglutinin; HBSS: Hanks' balanced salt solution; hCMEC/D3: Human

cerebral microvascular endothelial cell; HEK293: Human embryonic kidney; HRP: Horseradish peroxidase; ICD: Intracellular domain; IgG: Immunoglobulin G; IMI: Innovative medicines initiative; ITM2A: Integral membrane protein 2A; LAMP1: Lysosomal-associated membrane protein 1; LC/MS: Liquid chromatography/mass spectrometry; LRP8: Low-density lipoprotein receptor-related Protein 8; mAb: Monoclonal antibody; MDCK: Madin-Darby canine kidney; MW: Molecular weight; NGS: Next generation sequencing; NHP: Non-human primate; N-Ter: N-terminal; PODO: Passage 0 day in vitro 0; P1: Post-birth 1; Papp: Apparent permeability; PBS: Phosphate-buffered saline; PEG: Poly-ethylene glycol; PVDF: Polyvinylidene fluoride; RIPA: Radio-immunoprecipitation assay; RT: Room temperature; RTqPCR: Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction; scFv: Single-chain variable fragment; SDS: Sodium dodecyl sulfate; SIL: Stable isotope labelling; TBST: Tween tris-buffered saline; TfRC: Transferrin receptor C; TLCK: Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride; TM: Transmembrane domain; TNP: Trinitrophenyl; WB: Western blot; Wt: Wild type.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00321-3>.

Additional file 1: Figure S1. Clonal selection of stable HEK293 over-expressing ITM2A. After fluorescence selection, better clones were confirmed by Western Blot. Clones with higher expression and higher luminescent signal were selected. Selected clones are circled in red. **A** HEK293 ITM2A human C-Ter and Nter GFP clone selection. **B** HEK293 ITM2A murin Nter GFP clone selection. **C** HEK293 ITM2A murin C-Ter GFP clone selection. **D** HEK293 ITM2A human C-Ter HA clone selection. **E** HEK293 ITM2A human N-Ter HA and WT clone selection.

Additional file 2: Figure S2. Western Blot membrane of relative quantification of ITM2A protein expression in different cells type. Signal was detected by antibody anti-ITM2A AF4876 followed by HRP coupled anti-sheep antibody. Then, luminescence was quantified.

Additional file 3: Figure S3. Western Blot membranes of ITM2A relative quantification expression in new born mice. Signal was detected by antibody anti-ITM2A AF4876. HEK293 ITM2A mouse GFP is used as control. On the left α -tubulin T9026 detection on the right anti-ITM2A AF4876. Detection with primary antibody was followed by HRP coupled with appropriate antibody. Then, luminescence was quantified.

Additional file 4: Figure S4. Detection limit of mouse ITM2A by western blot in HEK293 overexpressing mITM2A. Signal is quantified with Multi-Gauge v3.0. Housekeeping protein is α -tubulin in orange and protein of interest is ITM2A in blue.

Acknowledgements

We are grateful to Axel Meyer for his strong involvement in the COMPACT IMI consortium data analyses and for critically reviewing the manuscript. We are grateful to Martin Lenter, Klaus Fuchs and Simon Plythe for bringing Yumab to the project and for critically reviewing the manuscript. We are grateful to Pr Mark Gumbleton for providing bend3 and MDCK1 cells along with training on the pulse chase model. We warmly thank Anne-Céline Le-Fevre for colocalization images, Corinne Célinain for mass spectrometry experiments and Patricia Senneville for the copyright requests. We warmly thank Isabel Ann Lefevre for English language editing and proofreading the manuscript.

Authors' contributions

CC, CCH, TMD, VR and DL were involved in the design, analysis, and interpretation of data and manuscript writing. CD and JCG performed the mass spectrometry analysis. BD generated tagged plasmids. AF and PK performed ITM2A monoclonal antibodies production and phage display study. All authors participated in critically reviewing the manuscript draft. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Funding for the present work was supported by Sanofi and COMPACT IMI Consortium.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

Experiments were performed at Sanofi in our Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)-accredited facility in full compliance with standards for the care and use of laboratory animals, according to the French and European Community (Directive 2010/63/EU) legislation. All procedures were approved by the local animal ethics committee [Ethical Committee on Animal Experimentation (CEEA) #24 and #21], of Sanofi, Vitry-Alfortville and Chilly Mazarin Research Centers, France, and the French Ministry for Research.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Rare and Neurologic Diseases Research Therapeutic Area, Sanofi, Chilly Mazarin, France. ²Proteomics, Translational Sciences, Sanofi, Chilly Mazarin, France. ³Sanofi Biological Research, Sanofi, Vitry-Sur-Seine, France. ⁴Yumab GmbH, Braunschweig, Germany.

Received: 29 November 2021 Accepted: 4 March 2022

Published online: 21 March 2022

References

- Banks WA. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(4):275–92.
- Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* 2013;19(12):1584–96.
- Kumar NN, Pizzo ME, Nehra G, Wilken-Resman B, Boroumand S, Thorne RG. Passive immunotherapies for central nervous system disorders: current delivery challenges and new approaches. *Bioconjug Chem.* 2018;29(12):3937–66.
- Lesuisse D. Increasing brain exposure of antibodies. In: de Lange ECM, Hammarlund-Udenaes M, Thorne RG, editors. *Drug delivery to the brain.* 2nd ed. New York: Springer; 2021.
- Boado RJ, Hui EK, Lu JZ, Pardridge WM. Glycemic control and chronic dosing of rhesus monkeys with a fusion protein of iduronidase and a monoclonal antibody against the human insulin receptor. *Drug Metab Dispos.* 2012;40(10):2021–5.
- Johnsen KB, Burkhart A, Thomsen LB, Andresen TL, Moos T. Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery. *Prog Neurobiol.* 2019;181:101665.
- Demeule M, Regina A, Che C, Poirier J, Nguyen T, Gabathuler R, et al. Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;324(3):1064–72.
- Gabathuler R. Development of new peptide vectors for the transport of therapeutic across the blood-brain barrier. *Ther Deliv.* 2010;1(4):571–86.
- Molino Y, David M, Varini K, Jabes F, Gaudin N, Fortoul A, et al. Use of LDL receptor-targeting peptide vectors for in vitro and in vivo cargo transport across the blood-brain barrier. *FASEB J.* 2017;31(5):1807–27.
- Stanimirovic DB, Sandhu JK, Costain WJ. Emerging technologies for delivery of biotherapeutics and gene therapy across the blood-brain barrier. *BioDrugs.* 2018;32(6):547–59.
- Giugliani R, Martins AM, So S, Yamamoto T, Yamaoka M, Ikeda T, et al. Iduronate-2-sulfatase fused with anti-hTfR antibody, pabinafusp alfa, for MPS-II: a phase 2 trial in Brazil. *Mol Ther.* 2021;29(7):2378–86.
- Sonoda H, Morimoto H, Yoden E, Koshimura Y, Kinoshita M, Golovina G, et al. A blood-brain-barrier-penetrating anti-human transferrin receptor antibody fusion protein for neuropathic mucopolysaccharidosis II. *Mol Ther.* 2018;26(5):1366–74.

13. Li J, Meyer A, Mäger I, Johansson HJ, Lenter M, Hildebrandt T, et al. Proteomic and transcriptomic study to identify membrane proteins highly enriched in brain, lung and liver microvascular endothelial cells using human primary cultures.
14. Zuchero YJ, Chen X, Bien-Ly N, Bumbaca D, Tong RK, Gao X, et al. Discovery of novel blood-brain barrier targets to enhance brain uptake of therapeutic antibodies. *Neuron*. 2016;89(1):70–82.
15. Watts RYJ, Dennis M, Freskgard P-O. *WO2011/091304A1*. 2011.
16. Deleersnijder W, Hong G, Cortvrindt R, Poirier C, Tylzanowski P, Pittois K, et al. Isolation of markers for chondro-osteogenic differentiation using cDNA library subtraction. Molecular cloning and characterization of a gene belonging to a novel multigene family of integral membrane proteins. *J Biol Chem*. 1996;271(32):19475–82.
17. Kirchner J, Bevan MJ. ITM2A is induced during thymocyte selection and T cell activation and causes downregulation of CD8 when overexpressed in CD4(+)CD8(+) double positive thymocytes. *J Exp Med*. 1999;190(2):217–28.
18. Lagha M, Mayeuf-Louchart A, Chang T, Montarras D, Rocancourt D, Zalc A, et al. Itm2a is a Pax3 target gene, expressed at sites of skeletal muscle formation in vivo. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e63143.
19. Van den Plas D, Merregaert J. Constitutive overexpression of the integral membrane protein Itm2A enhances myogenic differentiation of C2C12 cells. *Cell Biol Int*. 2004;28(3):199–207.
20. Boeuf S, Borger M, Hennig T, Winter A, Kasten P, Richter W. Enhanced ITM2A expression inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2009;78(2–3):108–15.
21. Pittois K, Wauters J, Bossuyt P, Deleersnijder W, Merregaert J. Genomic organization and chromosomal localization of the Itm2a gene. *Mamm Genome*. 1999;10(1):54–6.
22. Richter GH, Fasan A, Hauer K, Grunewald TG, Berns C, Rossler S, et al. G-Protein coupled receptor 64 promotes invasiveness and metastasis in Ewing sarcomas through PGF and MMP1. *J Pathol*. 2013;230(1):70–81.
23. Tuckermann JP, Pittois K, Partridge NC, Merregaert J, Angel P. Collagenase-3 (MMP-13) and integral membrane protein 2a (Itm2a) are marker genes of chondrogenic/osteoblastic cells in bone formation: sequential temporal, and spatial expression of Itm2a, alkaline phosphatase, MMP-13, and osteocalcin in the mouse. *J Bone Miner Res*. 2000;15(7):1257–65.
24. Van den Plas D, Merregaert J. In vitro studies on Itm2a reveal its involvement in early stages of the chondrogenic differentiation pathway. *Biol Cell*. 2004;96(6):463–70.
25. Kihara M, Kiyoshima T, Nagata K, Wada H, Fujiwara H, Hasegawa K, et al. Itm2a expression in the developing mouse first lower molar, and the subcellular localization of Itm2a in mouse dental epithelial cells. *PLoS ONE*. 2014;9(7):e103928.
26. Liu GY, Ge CR, Zhang X, Gao SZ. Isolation, sequence identification and tissue expression distribution of three novel porcine genes—RAB14, S35A3 and ITM2A. *Mol Biol Rep*. 2008;35(2):201–6.
27. Mitsui S, Osako Y, Yuri K. Mental retardation-related protease, motopsin (prss12), binds to the BRICHOS domain of the integral membrane protein 2a. *Cell Biol Int*. 2014;38(1):117–23.
28. Biverstal H, Kumar R, Schellhaus AK, Sarr M, Dantuma NP, Abelein A, et al. Functionalization of amyloid fibrils via the Bri2 BRICHOS domain. *Sci Rep*. 2020;10(1):21765.
29. Namkoong S, Lee KI, Lee JI, Park R, Lee EJ, Jang IS, et al. The integral membrane protein ITM2A, a transcriptional target of PKA-CREB, regulates autophagic flux via interaction with the vacuolar ATPase. *Autophagy*. 2015;11(5):756–68.
30. Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, et al. Purification and characterization of progenitor and mature human astrocytes reveals transcriptional and functional differences with mouse. *Neuron*. 2016;89(1):37–53.
31. McKenzie AT, Wang M, Hauberg ME, Fullard JF, Kozlenkov A, Keenan A, et al. Brain cell type specific gene expression and co-expression network architectures. *Sci Rep*. 2018;8(1):8868.
32. Feng W, Chen L, Nguyen PK, Wu SM, Li G. Single cell analysis of endothelial cells identified organ-specific molecular signatures and heart-specific cell populations and molecular features. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:165.
33. Li JY, Boado RJ, Pardridge WM. Rat blood-brain barrier genomics. II. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22(11):1319–26.
34. Pardridge WM. Blood-brain barrier genomics. *Stroke*. 2007;38(2 Suppl):686–90.
35. Bangsow T, Baumann E, Bangsow C, Jaeger MH, Pelzer B, Gruhn P, et al. The epithelial membrane protein 1 is a novel tight junction protein of the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2008;28(6):1249–60.
36. Chaves C, Do TM, Cegarra C, Roudières V, Tolou S, Thill G, et al. Non-human primate blood-brain barrier and in vitro brain endothelium: from transcriptome to the establishment of a new model. *Pharmaceutics*. 2020.
37. Chaves C, Campanelli F, Chapy H, Gomez-Zepeda D, Glacial F, Smirnova M, et al. An interspecies molecular and functional study of organic cation transporters at the blood-brain barrier: from rodents to humans. *Pharmaceutics*. 2020.
38. Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem*. 2005;93(2):279–89.
39. Perrière N, Yousif S, Cazaubon S, Chaverot N, Bourasset F, Cisternino S, et al. A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res*. 2007;1150:1–13.
40. Morales-Alcala CC, Georgiou IC, Timmis AJ, Riobo-Del Galdo NA. Integral membrane protein 2A is a negative regulator of canonical and non-canonical hedgehog signalling. *Cells*. 2021;10(8):2003.
41. McKeown L, Robinson P, Greenwood SM, Hu W, Jones OT. PIN-G—a novel reporter for imaging and defining the effects of trafficking signals in membrane proteins. *BMC Biotechnol*. 2006;6:15.
42. Ehrlich M, Shmueli A, Henis YI. A single internalization signal from the di-leucine family is critical for constitutive endocytosis of the type II TGF-beta receptor. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 9):1777–86.
43. Bulut GB, Sulahian R, Ma Y, Chi NW, Huang LJ. Ubiquitination regulates the internalization, endolysosomal sorting, and signaling of the erythropoietin receptor. *J Biol Chem*. 2011;286(8):6449–57.
44. Jacobsen SE, Ammendrup-Johnsen I, Jansen AM, Gether U, Madsen KL, Bräuner-Osborne H. The GPRC6A receptor displays constitutive internalization and sorting to the slow recycling pathway. *J Biol Chem*. 2017;292(17):6910–26.
45. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, 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*. 2016;36(5):862–90.
46. Urich E, Lasic SE, Molnos J, Wells I, Freskgard PO. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS ONE*. 2012;7(5):e38149.
47. Masuda T, Hoshiyama T, Uemura T, Hirayama-Kurogi M, Ogata S, Furukawa A, et al. Large-scale quantitative comparison of plasma transmembrane proteins between two human blood-brain barrier model cell lines, hCMEC/D3 and HBMEC/ciβ. *Mol Pharm*. 2019;16(5):2162–71.
48. Stanimirovic DB, Bani-Yaghoob M, Perkins M, Haqqani AS. Blood-brain barrier models: in vitro to in vivo translation in preclinical development of CNS-targeting biotherapeutics. *Expert Opin Drug Discov*. 2015;10(2):141–55.
49. Haqqani AS, Delaney CE, Brunette E, Baumann E, Farrington GK, Sisk W, et al. Endosomal trafficking regulates receptor-mediated transcytosis of antibodies across the blood brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018;38(4):727–40.
50. Chang HY, Morrow K, Bonacquisti E, Zhang W, Shah DK. Antibody pharmacokinetics in rat brain determined using microdialysis. *MAbs*. 2018;10(6):843–53.
51. Pepinsky RB, Shao Z, Ji B, Wang Q, Meng G, Walus L, et al. Exposure levels of anti-LINGO-1 Li81 antibody in the central nervous system and dose-efficacy relationships in rat spinal cord remyelination models after systemic administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;339(2):519–29.
52. Pardridge WM. Blood-brain barrier and delivery of protein and gene therapeutics to brain. *Front Aging Neurosci*. 2019;11:373.
53. Goldenring JR. Recycling endosomes. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;35:117–22.

54. Roberts LM, Black DS, Raman C, Woodford K, Zhou M, Haggerty JE, et al. Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience*. 2008;155(2):423–38.
55. Saubaméa B, Cochois-Guégan V, Cisternino S, Scherrmann JM. Heterogeneity in the rat brain vasculature revealed by quantitative confocal analysis of endothelial barrier antigen and P-glycoprotein expression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(1):81–92.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



3.3 Approche par immunisation : Découverte d'une nouvelle famille de récepteurs médiant la transcytose : les intégrines

Nous avons utilisé une deuxième stratégie pour trouver de nouveaux récepteurs capables de faire de la transcytose. Nous avons immunisé des souris avec des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales afin d'obtenir une banque immune d'anticorps dirigés contre ces cellules. Nous avons ensuite sélectionné les anticorps capables de faire de la transcytose dans nos modèles de BHE décrits dans la partie 3.1 Cellules endothéliales et modèles de BHE *in vitro*. Puis nous avons identifié les cibles de ces anticorps. La majorité des anticorps générés reconnaît la famille des intégrines. Nous avons essayé de comprendre quel mécanisme permettait la transcytose de ces anticorps. Ces travaux expérimentaux font l'objet d'un article de recherche qui est actuellement soumis au journal « Plos one » et en cours d'évaluation.

An innovative strategy to identify new targets for delivering antibodies to the brain has led to the exploration of the integrin family

Integrins and brain delivery of antibodies

Céline Cegarra^{1*#b}, Béatrice Cameron^{2&}, Catarina Chaves^{1#a}, Tarik Dabdoubi^{2&#b}, Tuan-Minh Do^{1#a}, Bruno Genêt^{3&#b}, Valérie Roudières^{1#b}, Yi Shi^{4&}, Patricia Tchepikoff^{4&#b}, Dominique Lesuisse^{1#a}

¹Rare and Neurologic Diseases Research Therapeutic Area, Sanofi, Chilly Mazarin, France

²Biological Research, Sanofi, Vitry-Sur-Seine, France

³Integrated Drug Discovery, Sanofi, Vitry-Sur-Seine, France

⁴Histology, Translational Sciences, Sanofi, Vitry-Sur-Seine, France

#a : Sanofi, Chilly Mazarin, France

#b : Sanofi, Vitry-Sur-Seine, France

***Corresponding authors**

Email: celine.cegarra@sanofi.com (CC)

Authors' Contributions

¶: These authors contributed equally to this work. They were involved in the conceptualization, design, analysis, interpretation of data and manuscript writing.

&: These authors also contributed equally to this work. TD and BC performed immunization, screening, selection, cloning and production of antibodies. BG identified antibody targets. YS supervised and PT performed IHC studies. All authors participated in critically reviewing the manuscript draft. All authors read and approved the final manuscript.

Abstract

Background: Increasing brain exposure of biotherapeutics is key to success in central nervous system disease drug discovery. Accessing the brain parenchyma is especially difficult for large polar molecules such as biotherapeutics and antibodies because of the blood-brain barrier. We investigated a new immunization strategy to identify novel receptors mediating transcytosis across the blood-brain barrier.

Method: We immunized mice with primary non-human primate brain microvascular endothelial cells to obtain antibodies. These antibodies were screened for their capacity to bind and to be internalized by primary non-human primate brain microvascular endothelial cells and Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell clone D3. They were further evaluated for their transcytosis capabilities in three *in vitro* blood-brain barrier models. In parallel, their targets were identified by two different methods and their pattern of binding to human tissue was investigated using immunohistochemistry.

Results: 12 antibodies with unique sequence and internalization capacities were selected amongst more than six hundred. Aside from one antibody targeting Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule and one targeting Striatin3, most of the other antibodies recognized $\beta 1$ integrin and its heterodimers. The antibody with the best transcytosis capabilities in all blood-brain barrier *in vitro* models and with the best binding capacity was an anti- $\alpha\beta 1$ integrin. In comparison, commercial anti-integrin antibodies performed poorly in transcytosis assays, emphasizing the originality of the antibodies derived here. Immunohistochemistry studies showed specific vascular staining on human and non-human primate tissues.

Conclusions: This transcytotic behavior has not previously been reported for anti-integrin antibodies. Further studies should be undertaken to validate this new mechanism *in vivo* and to evaluate its potential in brain delivery.

Keywords: Blood Brain Barrier, integrin, antibodies, transcytosis

Introduction

The barrier between brain tissues and circulating blood represents a major obstacle in the treatment of central nervous system diseases such as neurodegenerative diseases or brain cancers (1). The blood-brain barrier (BBB) is only permeable to very small lipophilic compounds (3) and the challenge of crossing it to access the brain parenchyma is especially acute for large polar molecules such as biotherapeutics and antibodies (2, 3). Following systemic administration, the tissue to blood ratio of antibodies is generally in the range of 10 to 50% (4), whereas for the highly protected brain tissue this ratio is reported in the average

of 0.1% (5). Therefore, increasing brain exposure of biotherapeutics will be key to their success in this field.

So far, the most successful strategy to carry biotherapeutics to the brain has been to use antibodies against receptors such as transferrin (6) and insulin (7) (sometimes referred to as the 'Trojan horse' approach). However, several challenges remain in the field. Specific toxicities can be linked to the modulation of these receptors, as has been shown in the case of Transferrin Receptor C (TFRC) (8-10) and Insulin Receptor (INSR) (7, 11). These receptors are ubiquitously expressed and therefore effects and liabilities can be spread to several organs and tissues. So far, no brain-specific receptor capable of mediating brain transcytosis has been discovered.

Two main strategies have been used to identify novel mechanisms of brain receptor mediated transcytosis (RMT) applicable to antibodies. The first one has often started with membrane proteins known to be highly enriched in brain microvascular endothelial cells (BMECs). Lipoprotein-related protein (LRP) (12, 13) and Low-Density Lipoprotein (LDL) (14) receptors are respectively able to transport lactoferrin, melanotransferrin, tissue plasminogen activator, β -amyloid precursor protein and LDL, ApoE proteins across the BBB. However, antibodies against lipoprotein-related protein receptor LRP1R did not demonstrate brain exposure enhancement (15), showing that this specific property is not shared by all transmembrane proteins and, to our knowledge, no anti-LDLR antibody has demonstrated enhanced brain exposure. In contrast, Insulin Growth Factor 1 Receptor (IGF1R) (16) has demonstrated this ability to ferry antibodies to the brain. More recently, transcriptomic or proteomic differential analyses have been carried out to identify new brain specific RMT mechanisms. This has

yielded proteins such as basigin, glucose transporter 1 (GLUT1) or cluster differentiation (CD)98 (15, 17, 18); the latter demonstrated efficient delivery of an antibody to the brain.

A second strategy, to identify new brain specific RMT mechanisms, is to screen phage libraries of peptides or antibodies or fragments on a functional assay, either binding to BMECs or transcytosis. The most prominent example of this strategy is the identification of the FC5 and FC44 single domain antibodies from screening a phage display naïve library, where two distinct sequences named FC5 and FC44 were identified (19-23). FC5 was deorphaned and the target shown to be an α (2,3) sialoglycoprotein (21, 24-27).

Using immune libraries should increase the probability of finding a brain specific target. Even though some precedents can be found in the field of oncology, based on immunization with tumoral cells (28), human epithelial carcinoma cells (29) or glioma cells (30, 31), no application to brain delivery had been reported. At the time we submitted our article, a lamprey immunization with murine brain microvessels plasma membranes with the aim of discovering new brain targeting receptors was published by J.M. Lajoie et al (32). The first goal of the present report is to describe such an approach of generating an immune library from immunized mice and screening the resulting antibodies based on binding, internalization and finally transcytosis.

Aiming to generate human antibodies against specific brain microvascular membrane proteins, we therefore immunized Trianni Mouse® with fresh primary non-human primate (NHP) BMECs. The resulting antibodies were successively selected for their binding and uptake on BMECs and Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell clone D3 (hCMEC/D3), leading to candidates that were further analyzed in three *in vitro* models of

transcytosis. Among the handful of antibodies that underwent transcytosis, nine were identified as anti-integrin β 1 antibodies. Although peptidic ligands of integrins have been occasionally associated with brain exposure enhancement in the context of nanoparticles, this family of proteins has not been shown to enhance brain exposure of antibodies. Thus, a second objective of the present work has been to investigate the link between the various parameters such as affinity, α and β subunit specificity, functional activity of the monoclonal antibodies and transcytosis in order to select the best candidate for *in vivo* validation.

Materials and Methods

Proteins, reagents, cell lines

Recombinant integrin proteins were purchased from OriGene for human monomer α 3, α 5 and β 1 (tp320975, tp301151 and tp303818), from GeneTex for human monomer α 4 (GTX48181), from R&D Systems for human and mouse dimer α 3 β 1, α 4 β 1 and α 5 β 1 (2840-a3, 3230-a5, 5668-a4, 7728-a5, 9374-a3) for human ALCAM 656-AL, from Sino Biological for human α 5 β 1 (CT-014-H2508H), from Abcam for Striatin3 (ab162295)

Antibodies were purchased from antibodies-online (natalizumab ABIN5668196), from Abcam (Anti-VE Cadherin ab33168), from BD Biosciences (553715), from BioLegend (343802 and MFR5 103801), from Interchim (DCABH-8217), from Invitrogen (14-0299-82, MA5-17103, MA1-25298), from Millipore (MABT409, MABT199, MAB2079Z) from Novus Biological (NBP2-52708), from Proteintech (66070-1-Ig), from R&DSYSTEMS (MAB1345), from Sigma-Aldrich

(MAB1965), from ThermoFisher Scientific (Anti-ZO-1 #61-7300; Anti-Occludin #33-1500; all other antibodies were produced in-house by Sanofi Biological Research.

hCMEC/D3 cells were obtained from Cedarlane. Cells were cultured in the “Cell biologics” medium supplemented with H1168. PC3 were obtained from DSMZ (ACC465). Cells were cultured in 45% Ham's F12 + 45% RPMI 1640 + 10% FBS. These human cells are growing adherently in monolayers.

Animals

Experiments were performed at Sanofi in our Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)-accredited facilities in full compliance with standards for the care and use of laboratory animals, according to the French and European Community (Directive 2010/63/EU) legislation. All procedures were approved by the local animal ethics committees (Ethical Committee on Animal Experimentation [CEEA] #24 and #21), of Sanofi, Vitry-Alfortville and Chilly Mazarin Research Centers, France, and the French Ministry for Research.

Male and female *Macaca fascicularis* non-human primates (NHPs) were purchased from Le Tamarinier and Noveprim Ltd. (Mahebourg, Mauritius). They were aged from 4.8 to 5.9 years. Animals were group-housed in aviaries or interconnected mobile cages. They were housed under controlled conditions (20–24 °C, 40–70% humidity, 10–15 renewals per hour of filtered, non-recycled air, 12-h light cycle) with free access to filtered tap water and daily distribution of expanded diet and fruits or vegetables. Animals from which brain microvessels were harvested had previously been used in pre-clinical studies; they were submitted to a drug washout period of at least 1 month before euthanasia and brain collection. Animals were

deeply anesthetized with Zoletil 50 (0.2 ml/kg IM) followed by administration of pentobarbital (0.15 ml/kg IV). Animals were sacrificed by exsanguination then brain was collected.

Pregnant Sprague-Dawley rats were purchased from Janvier Labs (France) between E10 and E12. Upon arrival, rats were housed individually in an enriched environment in a pathogen-free facility at a constant temperature of 22 ± 2 °C and humidity ($50 \pm 10\%$) on a 12-h light/dark cycle with ad libitum access to food and water. Animals were anesthetized with isoflurane and sacrificed by guillotine then brain was collected.

Immunizations of TRIANNI Mouse® (San Francisco, CA, USA) were performed at Sanofi (Vitry-sur-Seine, France) and overseen by a licensed veterinarian. Institutional Animal Care and Use approval was obtained by the CEPAL committee (procedure #PEA 2012-0077). TRIANNI Mouse® were housed in an enriched environment in a pathogen-free facility at a constant temperature of 22 ± 2 °C and humidity ($50 \pm 10\%$) on a 12-h light/dark cycle with ad libitum access to food and water.

Primary cell production

Isolation of Brain Microvessels from NHP Cortex

Brains from NHPs were collected shortly after euthanasia in ice-cold Hibernate A medium (Thermo Fisher Scientific). All subsequent steps were performed at 4°C and under a biological safety cabinet. Brain cortex was isolated and placed in petri dishes containing ice-cold Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS). The meninges and the cortical white matter were removed. The collected tissues were transferred into a new sterile container with HBSS, finely minced with a scalpel, and then pelleted by centrifugation (5 min at 600 g, 4°C). The pellet was resuspended in a collagenase/dispase® solution (Roche, Meylan, France, Collagenase 0.1

U/mL; Dispase 0.8 U/mL prepared in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free HBSS) containing type I DNase at 20 U/mL and TLCK at 0.147 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and incubated at 37°C for 60 min, under vigorous agitation. The digested tissue was carefully homogenized, and centrifuged for 5 min at 600 g, 4°C. The resultant pellet was resuspended in HBSS containing 20% Bovine Serum Albumin (BSA) and centrifuged for 30 min at 2000 g, 4°C. The myelin ring-containing supernatants were discarded, and the vessel-containing pellet was resuspended and re-incubated in the collagenase/dispase® solution in presence of DNase and TLCK for 30 min at 37°C. This suspension was re-pelleted by centrifugation (5 min at 600 g, 4°C), and the final pellet (named P0D0 fraction from this point onwards) was resuspended in endothelial basal medium (EBM)-2 supplemented with Kit EGM-2 MV SingleQuots (Lonza, Basel, Switzerland) containing 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin, seeded in pre-coated (collagen IV 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, fibronectin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) cell culture flasks, and incubated at 37°C under 5% CO_2 for 7 days. Every two days the cell medium was changed and the supplemented puromycin concentration lowered to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and subsequently removed. Following seven days of expansion, at P0D7, BMECs from cortex were further singularized and re-plated de novo for an additional seven-day cell expansion (P1D7).

Isolation of brain microvessels from human brain

All human brain samples were obtained from The Netherlands Brain Bank (NBB), Netherlands Institute for Neuroscience, Amsterdam (open access: www.brainbank.nl). All Material has been collected from donors from whom a written informed consent for brain autopsy and the use of the material and clinical information for research purposes had been obtained by the NBB. Human brain samples were preserved in Hibernate A (Gibco™ A1247501) medium during transport à 4°C and microvessels were isolated as described above for NHP brain

samples. All experiments were conducted in a biosafety level 2 laboratory by trained personnel.

Cell preparation for Brainplotting™ models

Human tissue was provided by Brainplotting™ (iPEPS, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière, Hôpital Universitaire de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France) in partnership with Sainte-Anne Hospital, Paris (neurosurgeon Dr. Johan Pallud) and harvested during scheduled tumor resection surgeries with written informed consent from the patients (authorization number CODECOH DC-2014-2229). Human brain microvessels were obtained from surgical resections of several patients with diffuse oligoastrocytic glioma. Microvessels were isolated from healthy peritumoral brain tissue using an enzymatic procedure (33) adapting methods previously published for rats (34, 35). Briefly, tissue samples were carefully cleaned from meninges and excess of blood; then, an enzymatic mix was used to dissociate the tissues and microvessels were isolated by retention on a 10 µm mesh. Cells were cultured in EBM-2 medium (Lonza, Basel, Switzerland) supplemented with 20% serum and growth factors (Sigma) (34, 35). After seeding brain capillaries in petri dishes, primary BMECs were amplified and seeded (P1) on Transwell® (Corning) with microporous membranes (pore size: 0.4 µm) in monoculture. After transcytosis assays, cells could be fixed with ethanol for immunostaining.

Cell preparation for PharmaCo-Cell® BBB model

Cells were prepared following the instructions of the ready-to-use MBT24h NHP BBB kit (PharmaCo-Cell®). Briefly, the triculture BBB model with NHP BMECs, pericytes and astrocytes was thawed in warmed medium provided in the kit. After 1h and then 24h the

medium was changed. Trans-endothelial electrical resistance (TEER) was measured 4 days after thawing and transcytosis assays performed 1 day later.

Co-Culture Experiments

NHP BMECs were seeded onto 12-well plate Transwell® (Corning Transwell® 3401 polycarbonate filters, 0.4 µm pore diameter; 1.12 cm², Corning, Sigma), previously coated with collagen IV/fibronectin (Sigma) at a density of 60,000 cells/well in supplemented EBM-2 medium. Immediately following plating, BMEC-coated Transwell® were then placed into plates with either no other cell type (monoculture), or with rat primary astrocytes (80,000 cells/well) plated onto the bottom of the plate 4 days before, in MEMα/F12 cell medium (1:1), 10% FBS, 1% PSN and 5 ng/mL βFGF. Astrocytes were isolated from brains of E18 rat embryos then frozen after one week in culture. All transcytosis experiments were conducted following 4 days or 7 days and in monoculture or co-culture with astrocytes.

Resistance Measurements

TEER was measured following the culture of BMECs onto Transwell® filters. Resistance was recorded using an EVOM2 epithelial voltohmmeter coupled to a cell culture cup chamber (ENDOHM-12G) (World Precision Instruments, Hitchin, Hertfordshire, United Kingdom). TEER values are presented as Ω. cm² following subtraction of an un-seeded Transwell® and multiplication by 1.12 cm² to account for the surface area (33). TEER measurements were taken three independent times on each sample and at least on triplicate filters for each experimental condition.

Immunofluorescence

Cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, at RT, and subsequently permeabilized and blocked in Odyssey LiCor Blocking Buffer containing 0.2% Triton X-100. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C and appropriate secondary antibodies conjugated with Alexa fluorophores (Invitrogen) and Hoechst 33432 (Invitrogen) for nuclei staining were subsequently used for 2h at RT. Images were acquired on a Perkin Elmer Operetta CLS system.

RNA Sequencing

As described in Chaves et al (33), the RNAseq libraries were prepared with 30 ng of input total RNA using the NEB Next Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, #E-7765S) with the NEB Next rRNA Depletion Kit (New England Biolabs, #E6310L) and following the manufacturer's instructions. The libraries were then paired end sequenced (75 cyclesx2) on the NovaSeq 6000 instrument (Illumina) using the NovaSeq 6000 SP Reagent Kit (300 cycles; #20027465, Illumina). RNA-seq data analysis was performed using ArrayStudio (Qiagen). Briefly, raw data QC is performed then a filtering step is applied to remove reads corresponding to rRNAs as well as reads having low quality score or shorter than 25 nt. Reads were further mapped to the Cyno Washington University 2013 genome, based on the contigs assembled from a WGS project submitted by Washington University in 2013, using OSA4 (Omicsoft Sequence Aligner, version 4, Qiagen) and quantified using Ensembl. R94 model of transcriptome, paired reads were counted at gene level. Differential analysis of gene expression was performed at gene level using DESeq2. The variable multiplicity was taken into account and false discovery rate adjusted p-values calculated with the Benjamini-Hochberg correction. Functional analysis of differentially expressed genes was

performed using IPA (Qiagen). Gene Set Enrichment analysis was performed using Ingenuity and GSEA software. High-throughput sequence data are available on the Gene Expression Omnibus under the GSE154901 accession number. Read depth from RNAseq was counted as fragments per kilobase per million mapped fragments (FPKM). FPKM read counts were obtained for each BEC fraction (P0D0, P0D7). A minimum of 1 FPKM in at least half of the observations per group, and in at least one of the groups, was required for a gene to be considered as expressed and included in the analysis.

Antibody generation

Mouse immunization and hybridoma selection

The Trianni Mouse® is a C57BL/6 strain that transgenically expresses a complete repertoire of fully human immunoglobulin G (IgG) and immunoglobulin kappa (IgK) V(D)J genes, but retains mouse regulatory genomic sequences (36). The Repetitive Immunization at Multiple Sites (RIMMS) method was used as described by Kilpatrick et al. (37). In this approach, 6-8-week-old female mice each received four rounds of subcutaneous injections of 10^6 NHP primary BMECs per animal over a course of 14 days at intervals of 3-4 days. Cells emulsified in Titermax's adjuvant (TiterMax® Gold Adjuvant; Sigma #T2684) were administered subcutaneously to six sites proximal to draining lymph nodes, along the back of the mice and to six juxtaposed sites along the abdomen. Four days after the last injection, mice were sacrificed. Bilateral popliteal, superficial inguinal, axillary, and branchial lymph nodes were isolated for antibody generation. B cells were isolated from the lymph.

Single-cell suspension was fused with P3X63-AG8.653 myeloma cells using the polyethylene glycol fusion method (38). After incubation at 37°C for 16-24 hours, the resulting cell

preparation was transferred into selective semi-solid medium, plated out into Petri plates and incubated at 37°C. Ten days after initiation of selection, isolated hybridoma colonies were picked and amplified using ClonePix™ 2 Mammalian Colony Picker.

VH/VL sequence retrieval and monoclonal antibody production

Paired VH/VL genes were retrieved from 100 clonal cells by RT-PCR and sequenced using a protocol similar to the one described in Tiller et al. (39).

Nucleic acid sequences coding for the antibody heavy or light chains were cloned into mammalian expression plasmids under the CMV enhancer/promoter and the SV40 polyA signal. Resulting plasmids were transfected into Human Embryonic Kidney (HEK) 293 cells (Thermo Fisher Scientific; K9000-10) using FreeStyle™ MAX 293 Expression System according to the manufacturer's instructions. Monoclonal antibodies were produced at 30 mL scale, purified by protein A affinity chromatography and stored in Phosphate-Buffered Saline (PBS) after desalting on mini trap Sephadex G-25 column.

Antibody characterization by flow cytometry and internalization

Flow cytometry

The apparent affinity EC_{50} of the antibodies to NHP BMEC primary cells and hCMEC/D3 cell line was measured by flow cytometry. Cells were plated at 100 000 cells/well on 96-well plates (Falcon; 353910) and 100 μ L/well of antibody was added in 2-fold serial dilutions starting at 300 μ g/mL up to 12 dilutions in assay diluent for 20 min at 4°C and washed twice in PBS with 1% BSA. Binding of the antibodies was detected by 100 μ L/well of Alexa Fluor® 488 conjugated goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch; #109-545-098) for 15 min at 4°C and then washed twice in PBS with 1% BSA. The antibody apparent affinity EC_{50} , is the half

maximal effective concentration representing the apparent affinity of the antibody to its target. EC₅₀ was evaluated after centrifugation and resuspension of cells by adding 150 µL/well of PBS with 1% BSA and read using Guava® easyCyte 8HT Flow Cytometry 5 System. EC₅₀ values were estimated using the 4-parameter logistic model according to Ratkowsky and Reedy (40). The adjustment was obtained by nonlinear regression using the Levenberg-Marquardt algorithm in SAS© software.

Antibody binding capacity (ABC)

Levels of receptor density were determined by flow cytometry using Biocytex Human IgG Calibrator kit (# CP010) in hCMEC/D3. Briefly, a primary antibody was used at 10 µg/ml for detecting surface receptors on each cell line using the manufacturer's protocol. Surface densities were calculated using Biocytex kit calibration standards and formulation provided by the kit.

Internalization

An ImageStreamX Mark II multispectral imaging flow cytometer (Luminex Corp.) was used to monitor the internalization of the antibodies following binding to hCMEC/D3 cell line and NHP BMECs. Viable cells (4×10^4 cells) were seeded into wells of 6-well plates and incubated with 5 µg/mL of monoclonal antibodies for 18 hours at 37°C under 5% CO₂ or 1 hour at 4°C in parallel. Cells were washed by centrifugation in PBS with 1% BSA at 400 g for 3 minutes. Cells were fixed and permeabilized using 500 µL of BD Cytotfix/Cytoperm buffer (BD Biosciences; 554722) on ice for 20 minutes. Cells were washed by centrifugation in 4 mL of Perm/Wash Cell buffer (BD Biosciences; 554723) at 400 g for 3 minutes. To test whether antibodies could be internalized, 1 mL of a 1:400 dilution of AlexaFluor488 conjugated goat

anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch; 115-545-164, West Grove, Pa.) was incubated on ice for 20 minutes. After incubation, 4 mL of PBS with 1% BSA buffer was added to wash, before centrifuging (400 g, 3 min). The supernatant was flicked from the plate before the cells were fixed with 150 μ L 1% formaldehyde on ice for 20 minutes. The fluorescence of cells was analyzed with the ImageStream multispectral imaging flow cytometer using the Internalization feature. Five thousand events were acquired for each experimental condition and the corresponding images were analyzed using the IDEAS 5 image-analysis software. The internalization score (IS) was then computed as previously described (41) by using the equation below:

$$IS = \log\left(\frac{a}{1-a}\right) \text{ where } a = \left(\frac{mI}{mI+mB}\right) * \left(\frac{pI}{pB}\right)$$

B = External and I = Internal part of the cells, mI = Mean intensity of upper quartile pixels in I, mB = Mean intensity of upper quartile pixels in B, pI = Peak intensity of upper quartile pixels in I, pB = Peak intensity of upper quartile pixels in B.

During the early screening, the normalized IS was plotted. It was the calculated ratio of the IS measured at 37°C divided by the IS at 4°C.

Transport assays

Pulse-chase assays

Pulse-chase transport assays were performed with non-contiguous cells like hCMEC/D3 or NHP BMECS with TEER measurement below 150 Ω .cm².

The first step was a pulse where test target antibodies (1 μ g/mL, anti-integrin or reference anti-human/NHP TFRC) were added to the upper chamber on day 4. Fresh EBM medium

without antibodies was added to the bottom chamber. After 2h at 37°C, 3 washes with PBS were performed. The second step was a chase at 37°C with fresh EBM medium added to the top and bottom chambers. Final aliquots from both chambers were taken 4h following incubation at 37°C under 5% CO₂. Transwell® membranes were washed 3 times with PBS, removed with a scalpel and frozen with 200µL of water to lyse cells after 3 freeze/thaw cycles. Antibody levels in cells, luminal and abluminal compartments were determined by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (MESOQuickPlex SQ120, MesoScale Discovery, Rockville, MD, USA). Relative transport classification was done by calculating the pulse /chase ratio PCR:

$$PCR = \frac{Q_{\text{basolateral}}}{Q_{\text{total}}}$$

Where $Q_{\text{basolateral}}$ = antibody quantity in ng measured in the bottom chamber, Q_{total} = antibody quantity in ng measured in cells and top and bottom chamber.

Outliers were defined by $Q_{\text{total}} < 10\%$ median of Q_{total} samples and were removed from analysis

For each parameter, only antibodies with at least 3 measurements were included in statistical analysis. For pulse chase ratio analysis, as no negative control was available, a superiority analysis was conducted for each antibody using a one sample one-sided t-test analysis versus constant. The superiority margin was defined as 0.1 for pulse chase ratios. In order to control multiplicity at 2.5% level, the p-values were adjusted using the Bonferroni-Holm correction. The analysis was performed using SAS 9.4 for Windows 10.

Transcytosis assays

Test antibodies (1 µg/mL, anti-integrin or reference anti-human/NHP TFRC) or human holo-transferrin (2 µg/mL) and control antibodies without target on cells (1µg/mL, mouse IgG, clone MG1-45, BioLegend or human IgG anti-TNP) or FITC-coupled 70 KDa Dextran (10 µg/mL) were added to the upper chamber on cultures with TEER values from 150 Ω.cm². Fresh EBM medium without antibodies was added to the bottom chamber. Final aliquots from both chambers were taken 240 min following incubation at 37°C under 5% CO₂. Compound levels in stock solutions (t=0min), upper and lower compartments (t=240min) were determined by ELISA (MESOQuickPlex SQ120, MesoScale Discovery). Apparent permeability coefficients (P_{app}) in cm.min⁻¹ were calculated using the following formula:

$$P_{app} = \frac{V \times C_{abluminal}}{A \times C_{luminal} \times t}$$

where V = volume of cell medium in the bottom chamber (mL), A = surface area of the insert (cm²), $C_{luminal}$ = compound concentration loaded in the upper chamber (µM), $C_{abluminal}$ = compound concentration measured in the bottom chamber (µM); t = time of the assay (min).

Outliers were defined by P_{app} IgG control > 50% median of P_{app} of all IgG control and were removed from analysis.

For each parameter, only antibodies with at least 3 measurements were included in statistical analysis. For P_{app} ratio, a superiority analysis was conducted using an analysis of variance (ANOVA) to compare each antibody versus negative control followed by one-sided Dunnett's test to control multiplicity at 2.5% level. Prior to statistical analysis, data were subjected to

inverse transformation to ensure normality of residuals. The analysis was performed using SAS 9.4 for Windows 10.

ELISA Method

Standard 96-well SECTOR plates (Meso Scale Discovery) were coated with 0.5 µg/mL of human Fab'2 or mouse IgG or with 0,75 µg/mL of recombinant integrin protein in PBS and then incubated for 1 h under agitation at room temperature. After incubation, plates were washed three times with PBS-Tween 0.05% (Calbiochem, 524653) and blocked for 1 h at room temperature with 0.1% BSA solution (A7030, Sigma). After blocking the plates, antibody serial dilutions (from 10 to 10⁻⁶ µg/mL) or samples collected in transport assays and standards were incubated on plates for 2 h at room temperature. After incubation, plates were washed three times with PBS-Tween 0.05%, and bound antibody was detected with SULFO-TAG conjugated goat anti-mouse antibody (R32AC-1, Meso Scale Discovery) using TPA containing read buffer (R92TC-2, Meso Scale Discovery). Concentrations were determined from the standard curve using a four-parameter non-linear regression program (Discovery Workbench version 4.0 software). EC₅₀ values were estimated using the 4-parameter logistic model according to Ratkowsky and Reedy (40). The adjustment was obtained by nonlinear regression using the Levenberg-Marquardt algorithm in SAS© software.

Antibody target identification

Target identification by immunoprecipitation and LC-MS/MS peptide mapping

Each monoclonal antibody target was purified from a hCMEC/D3 membrane fraction under mild denaturing conditions using Pierce Classic immunoprecipitation Kit (#26146) according to the manufacturer's instructions. Pulled-down proteins were separated on SDS-PAGE stained with Coomassie blue. Stained protein bands were submitted to an in-gel tryptic digestion by Digestpro MS (Intavis) after reduction in 10 mM DTT and alkylation with 55 mM iodoacetamide. Eluted peptides were analyzed by tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) on a Q-Exactive Plus benchtop mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Peptides were searched in database with MaxQuant/Perseus® against UniProt Human. The following filters were carefully applied to obtain the list of best target candidates: at least two unique peptides, filter on known or observed contaminants with a negative control. Identified soluble proteins were purchased from vendors and used by ELISA to confirm binding to the monoclonal antibody. Human recombinant proteins used were: Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM)/ CD166: R&D System 656-AL; $\alpha 5\beta 1$: Sino Biological CT-014-H2508H, $\alpha 3\beta 1$: R&D Systems 2840-A3, Striatin3: Abcam ab162295.

Target identification by Retrogenix™/Charles River cell microarray technology

Each monoclonal antibody was provided to [Retrogenix™/Charles River](#) for assessment using their human cell microarray technology. Expression vectors encoding over 5,205 full-length human plasma membrane proteins were spotted onto microarray slides. Human cells grown over the top become reverse-transfected resulting in cell surface expression of each respective protein at distinct slide locations. The antibody was applied, and specific binding analyzed and confirmed using an appropriate detection system.

In addition, identified anti-integrin and control antibodies were added to slides of fixed HEK293 cells overexpressing a series of 22 naturally occurring integrin heterodimers and slides of fixed untransfected HEK293 cells as controls. Specific binding was then analyzed as previously.

Immunohistochemistry (IHC)

Chromogenic IHC

Post-mortem human brain samples for IHC were obtained from external biological resource centers in full accordance with legislation and ethical standards. TFRC antibody was evaluated on PC3 and hCMEC/D3 cells to evaluate formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and frozen sample conditions. The result was confirmed on FFPE and frozen hCMEC/D3 cells to determine study feasibility for the test antibodies. The frozen samples were chosen. Four human frozen cortex sections and five NHP frozen (2 cortex and 3 hippocampal) sections were from an internal collection. Samples were assessed with a reference TFRC antibody. Internal integrin antibodies were firstly evaluated on PC3 cells, secondly on NHP brains then on other NHP tissues (brain, pancreas, kidney, lung, liver, heart, arterial and cardiac muscles,

meninges, basement membrane). The IHC pattern in NHP was compared to human (brain, heart, kidney, pancreas and liver, artery confirmed by anti-SMA, vein and capillaries). IHC staining was performed using the Ventana Discovery XT automated System (Ventana Medical Systems, Inc., USA) with a standard streptavidin-biotin-labeling technique. All detection systems were manufactured by Ventana Medical System Inc. IHC optimal concentrations for each antibody were determined by individual pilot studies under the standard condition. Sections derived from FFPE samples were pretreated with antigen retrieval procedure (Heat Induced Epitope Retrieval) and tris borate EDTA buffer (pH8-8.5). After endogenous biotin blocking for 4 minutes for avidin/biotin steps, the primary antibody was incubated for 60 minutes at 24°C, with a concentration of 0.5 µg/mL of TFRC antibody or 1 µg/ml of 4F2. As a negative control, a mouse IgG1 isotype was used instead of the primary antibody. The secondary antibody, a goat anti-mouse biotin-conjugated IgG1 antibody (1070-08, Southern Biotech, USA), was incubated at 24°C for 32 minutes at a final dilution of 1/200.

Immunostaining was done with DABMap™ chromogenic detection kit according to the manufacturer's recommendations (760-124, Ventana). A counterstaining step was done with hematoxylin (760-2021, Ventana) and bluing reagent was applied (760-2037, Ventana). Stained slides were dehydrated, and cover slipped with cyto seal XYL (8312-4, Richard-Allan Scientific, USA).

Immunostaining sections were observed with a Nikon Eclipse E400 bright-light microscope and slides were scanned and digitized using the ScanScope XT system (Aperio Technologies, Vista, CA). Digitized images were then captured using the ImageScope software (version 9.1, Aperio Technologies) at x20 magnification.

Fluorescent IHC

Five frozen NHP cortices were from an internal collection. IHC was performed using the Ventana Discovery Ultra from ROCHE with a standard protocol. All detection systems were manufactured by Ventana Medical Systems Inc. IHC optimal concentrations for each antibody were determined by individual pilot studies under the standard condition. Primary antibodies (1 µg/mL anti-CD31 antibody or 0.2 µg/ml 4F2) were incubated on tissue sections for 1 h. The secondary antibody anti-mouse conjugated with Cy5 for TFRC and with FITC for 4F2 incubated for 8 min and then 8 min with Dapi (D1306, ThermoFisher Scientific). Sections were imaged with an Olympus VS120 scanner at 100X.

Results

Preparation of human primary BMECs

We needed to have a significant amount (around 200 million for complete immunization or 20 million using the RIMMS method) of primary human BMECs for our immunization experiments. Primary BMECs can be isolated from fresh brain tissue, either from deceased patients (42-44) or from patients having undergone surgical resections of epileptic areas or glioblastomas (17, 45-51). Because the latter option can present a risk of accessing tissue potentially contaminated with damaged or too permeable tissue, we focused on obtaining post-mortem brains. Through a collaboration with the Netherlands Brain Biobank, in which we established a series of exclusion criteria based on age and pathological conditions, we were able to obtain three samples (approximately 100g each) of fresh human brains within a post-mortem interval of less than 24 hours. Human BMECs from NBB tissues were isolated, cultured and amplified. To obtain the purest possible endothelial cell cultures, we cultured the

cells for 7 days in the presence of puromycin to eliminate all cells that did not express P-gp efflux pump. A sample was taken and then characterized during the first passage (P1D0), 3 days after the first passage (P1D3) then 4 days after the second passage (P2D4). S1 Fig A shows these cultures which appeared to exhibit the expected phenotype.

We characterized the primary BMECs using qPCR by quantifying specific genes for different cell types likely to be present in the cultures (S1 Fig B). We amplified CD31, Claudin5 (CLDN5) (tight junctions) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) (efflux pump) as endothelial cell markers, GFAP, IBA1 and PDGFR β as markers of astrocytes, microglia and pericytes, respectively. The results in S1 Fig B show that even if the cells exhibit a brain endothelial gene profile upon first isolation (P1D0) with high expression of CD31, CLDN 5 and BCRP and no expression of genes from astrocytes, microglia or pericytes, further culture slowly enriches the cells in pericytes at the expense of endothelial cells as shown by the growing amount of PDGFR β and the lower amounts of CD31 over time. Thus, this paradigm could not yield the quantities of primary BMECs needed to conduct an immunization campaign.

We therefore turned to NHP BMECs since we could obtain fresh brains with very short post-mortem intervals from animals that were to be euthanized in our in-house *Macaca Fascicularis* animal facilities.

Preparation and validation of primary NHP BMECs for immunization

A pool of 20 million NHP BMECs were produced as described in Chaves et al (33) characterized and stored frozen at -150°C until use. We constituted a cell pool from several

NHPs to increase genetic diversity in NHP BMECs. NHP BMECs characterization is shown in Fig 1.

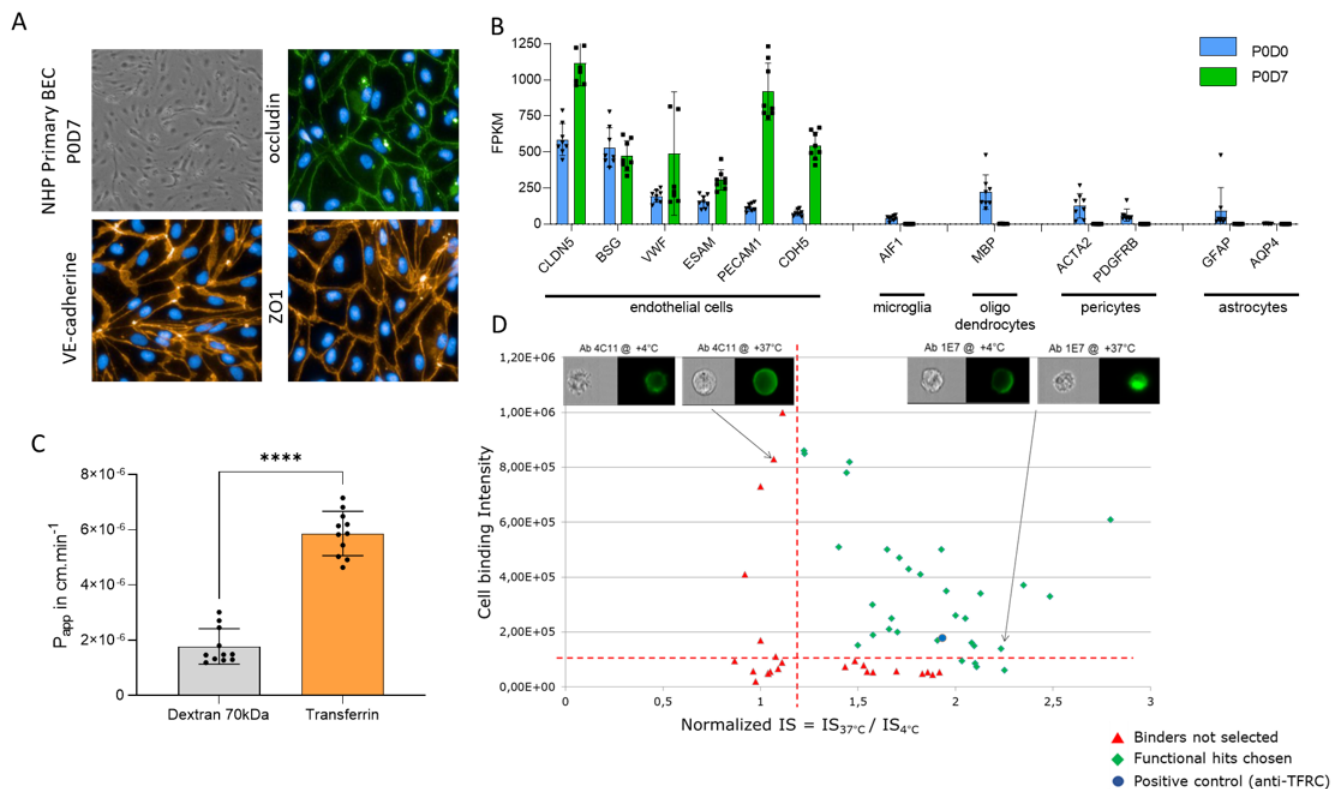


Fig 1 : Cell production and antibody screening. (A) NHP primary brain cells isolated at passage 0 after 7 days in culture. Cells were observed 100X magnification with inverted microscope and 200X magnification with fluorescent microscope. Immunofluorescence staining: ZO1 and VE-cadherin labelling in orange, occluding in green and nuclei with Hoechst in blue (B) NHP primary BMECs characterized by RNA Seq. Endothelial, microglial, oligodendrocytes, pericytes and astrocytes markers are represented. Blue bars represent analysis from microvessels P0D0 and green bars represent analysis from P0D7 cultured cells (C) Transferrin and Dextran 70kDa transcytosis in NHP BMECs. Results are given as the P_{app} in $cm \cdot min^{-1}$ The statistical significance of differences between groups was analyzed using GraphPad Prism v9.0.0 software (GraphPad Software) and Mann–Whitney test p -value <

0.0001. (D) Monoclonal antibody selection into NHP BMECs. The two selection criteria were cell binding and normalized IS. Green diamonds were selected, red triangles were rejected. The blue point was the anti-TFRC antibody added as a control. Pictures show 4C11 as not internalized antibody and 1E7 as internalized antibody.

Endothelial phenotype is observed by immunofluorescence in Fig 1 A. The endothelial phenotype was confirmed with RNA-Seq analysis during the cell culture in Fig 1 B. The BBB in vitro transcytosis model functionality is verified in Fig 1 C. P_{app} transferrin was compared to P_{app} dextran 70kDa. Transferrin transport was significantly higher than dextran 70 kDa which was not transported through endothelial cells. This transcytosis model is functional, so produced NHP BMECs are functional.

Generation and selection of antibodies binding to NHP BMECs

TRIANNI Mouse® were immunized with the previously validated primary NHP BMECs as immunogen using the Repetitive Immunization at Multiple Sites (RIMMS) approach. Monoclonal antibodies were isolated from the hybridoma technology, and 636 IgGs were established. Screening results are presented in Fig 1D.

Upon screening by flow cytometry, 62 monoclonal antibodies were selected for binding on NHP primary BMECs with or without binding to hCMEC/D3 cells and 31 were found to internalize into NHP primary BMECs or hCMEC/D3 cells at 37°C compared to 4°C.

Normalized IS should be interpreted as follows: IS at 37°C / IS at 4°C.

IS ≤ 0.2 no internalization

$0.2 \leq IS \leq 0.5$ low internalization

$0.5 \leq IS \leq 1$ moderate internalization

$1 \leq IS \leq 2$ high internalization

Variable heavy and light chain sequences of these 31 antibodies were retrieved, 22 antibodies had unique sequences and were further produced and analyzed. From these 22 antibodies, 12 were cross-reactive with hCMEC/D3 cells. EC_{50} values on hCMEC/D3 cells were determined (Table 1). The normalized IS determined showed that all 12 antibodies were able to be internalized (Table 1). ABC is the number of monoclonal antibodies a sample will bind, and correlates to the number of antigens expressed on the cell surface. It was determined by measuring the binding by flow cytometry. The value was correlated to the receptor binding density using the calibration curve as described in Materials and Methods. ABC showed values ranging from 3 800 to more than 173000, suggesting that different epitopes or targets could be recognized at the cell surface of hCMEC/D3 cells (Table 1).

Table 1 : hCMEC/D3 binding of 12 purified monoclonal antibodies, IS and ABC

clone	EC ₅₀ nM	Normalized IS	10 ³ ABC
1E7	1.0	2.3	72
3B8	>540	1.7	7.8
3C5	1.6	1.5	24.5
3E8	>540	2	7.8
4D2	5.2	1.2	61
4F2	1.9	1.4	>173
6A10	>540	2	3,8
6C7	22.5	1.2	164
6D6	>540	1.7	14.5
6F5	0.6	1.8	41.5
8C10	0.6	2	35
9F4	0.8	2.1	22.3
anti-TFRC	Not determined	1.9	Not determined

4F2 antibody had the highest antibody binding capacity. These 12 antibodies were further evaluated for their ability to perform transcytosis in three different models.

Evaluation in three transcytosis models

From Table 1, the 12 monoclonal antibodies displaying binding to both hCMEC/D3 and NHP BMECs were selected, along with a negative control that did not bind to human hCMEC/D3 cells (8C12) to engage in “*pulse-chase*” assays on human hCMEC/D3 and primary NHP BMECs, and in a NHP transcytosis model. We also included an anti-hTFRC antibody for which transcytosis had already been demonstrated (33). All following data for evaluation in the three transcytosis models were reported in S2 Table and S3 Table.

hCMEC/D3 *pulse-chase* experiments

“*Pulse-chase*” experiments were conducted as described by Sade et al. (52) to evaluate transcytosis capabilities in cells without strong tight junctions (Fig 2A). We used the same protocol for hCMEC/D3 cells and for NHP BMECs for which we had determined a TEER value below 150 Ω .cm².

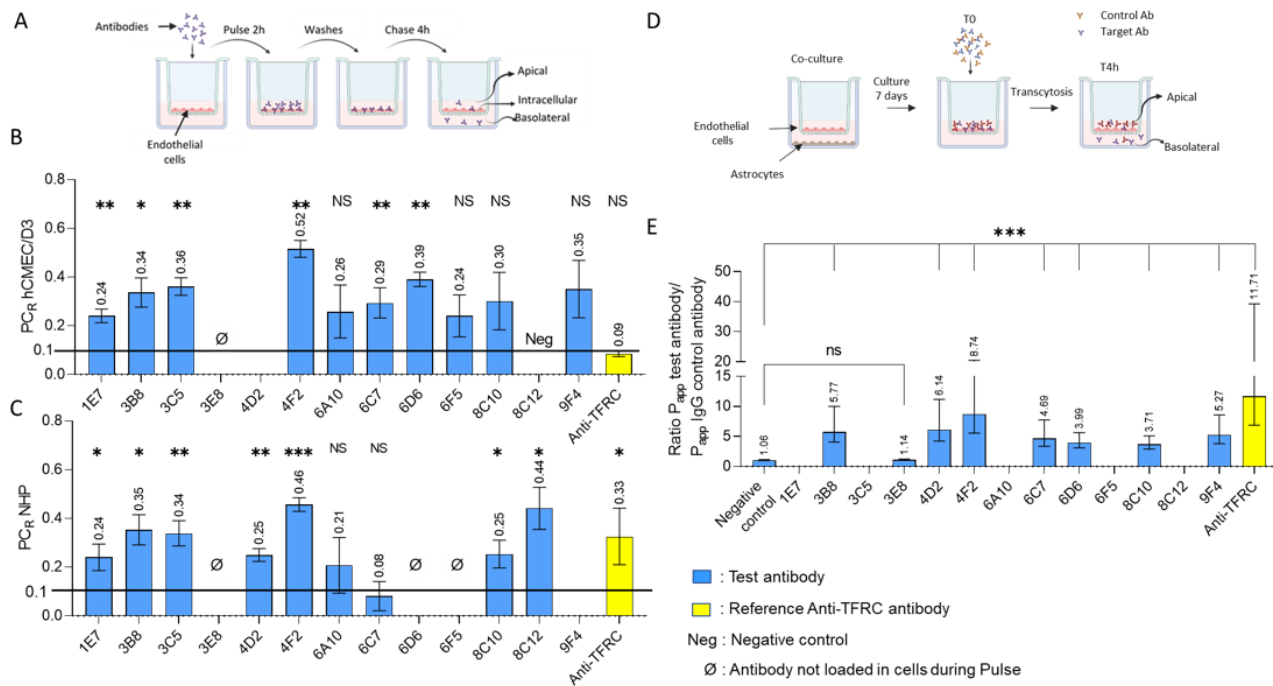


Fig 2 : Antibody transport in three *in vitro* BBB models. (A) Diagram of a *Pulse-chase* experiment. (B and C) “*Pulse-chase*” ratios (PCR) determined in hCMEC/D3 cells and in NHP BMECs, respectively. Results are given as PCR: quantity T4h basolateral / quantity T4h total (apical + basolateral + intracellular). For pulse chase ratio analysis, a superiority analysis was conducted for each antibody using a one sample one-sided t-test analysis versus constant. The superiority margin was defined as 0.1 for pulse chase ratios. To control multiplicity at 2.5% level, the p-values were adjusted using the Bonferroni-Holm correction. (D) Diagram of a transcytosis experiment. (E) Transcytosis in NHP BMECs. Results are given as the ratio P_{app} test antibody/ P_{app} control antibody. For Papp ratio, a superiority analysis was conducted using an analysis of variance (ANOVA) to compare each antibody versus negative control

followed by one-sided Dunnett's test to control multiplicity at 2.5% level. Prior to statistical analysis, data were subjected to inverse transformation to ensure normality of residuals. (B, C, E) Blue bars represent test antibodies, yellow bar represents the reference anti-TFRC antibody. For each parameter, only antibodies with at least 3 measurements were included in statistical analysis. NS: $p\text{-value} > 0,025$, * : $0,01 < p\text{-value} < 0,025$, ** : $0,001 < p\text{-value} < 0,01$, *** : $p\text{-value} < 0,001$ (A and D) images created by Biorender.

After 4 hours of chase the amount of antibody was measured in each compartment and the “*pulse-chase*” ratio (PC_R) was calculated and used to rank the antibodies. The results are presented in Fig 2B. Most of the monoclonal antibodies demonstrated higher transcytosis capacity in the “*pulse-chase*” assay with hCMEC/D3 cells than the reference anti hTFRC antibody, with the best ones being 4F2 and 6D6 Fig 2B). Two antibodies turned out to be negative (4D2 and 3E8). As expected, 8C12 did not undergo transcytosis since it did not bind to hCMEC/D3 cells.

Primary NHP BMECs *pulse-chase* experiments

The same set of monoclonal antibodies was evaluated in a “*pulse-chase*” assay in NHP BMECs, using the same protocol as in hCMEC/D3 cells. The results are outlined in Fig 2C.

4F2 came out again as the best candidate. In this assay 8C12 was found to undergo transcytosis in NHP cells while it did not in hCMEC/D3 cells, confirming the lack of human/NHP cross-reactivity for this antibody. 3E8 did not undergo transcytosis in NHP BMECs or in hCMEC/D3 cells. 6F5, 6D6 and 4D2 behaved differently in the two models despite binding to both NHP and human cell lines.

Transcytosis experiments with primary NHP BMECs

Finally, the antibodies were evaluated in a model of transcytosis in primary NHP BMECs. The model reported by Chaves et al. (33) (Fig 2D) is well characterized, with high TEER values and tight junctions; it is conducted in Transwell® inserts and the bottom well is cultured with astrocytes. An anti-hTFRC antibody showed high P_{app} compared to a control antibody in this model (53).

A mixture of the monoclonal antibodies and a mouse IgG, used as a control to evaluate permeability of the cell layer, was introduced into each well in the apical compartment and quantified in the basolateral compartment using ELISA. In this model the monoclonal antibodies were ranked based on the ratio of their apparent permeabilities *versus* the permeability of the mouse control antibody P_{app} ratio = (P_{app} test antibody / P_{app} control antibody). The results are shown in Fig 2E.

Once again 4F2 came out as the best candidate, although in this assay all the antibodies appeared to undergo less transcytosis than the anti-TFRC antibody. 3B8, 3C5 and 9F4 performed as in the two previous models, showing good to moderate levels of transcytosis, while 3E8 confirmed poor transcytosis. All Transwell® inserts in which the P_{app} value of the control mouse IgG was over 150% of the median control P_{app} were eliminated. This was the case for 8C12 for which we were not able to conclude on its transcytosis capacity in this NHP model.

Target identification

Two complementary methods were used to identify the targets of the antibodies: either deconvolution by immunoprecipitation with a lysate of hCMEC/D3 cells (IP)/LC-MS and

confirmation by ELISA with recombinant protein, or cell microarray technology at Retrogenix™/Charles River. The results are reported in Table 2. Full Retrogenix™/Charles River cell microarray results are shown in S4 Fig.

Table 2: Antibody target identification

clone	Target Identification with IP/LC-MS	Human soluble protein confirmed by ELISA following IP/MS	Target Identification and confirmation of human membrane protein with Retrogenix™ cell microarray
1E7	ALCAM	ALCAM	
3B8	No protein found		ITGA5 + ITGB1
3C5	ITGAV, ARPC5, ITGB3, ITGB5, SRSF1		ITGAV + ITGB1, 3, 5, 6, 8
3E8	LAMP1, SP16H, RCN-1		
4D2	ENPL		ITGA5 + ITGB1
4F2	ITGA5, IGTA3, ITGB1	ITGA5 + ITGB1 ITGA3 + ITGB1	ITGA _n + ITGB1
6A10	No protein found		
6C7	Striatin3	Striatin3	no target identified, Striatin3 not found
6D6	RSSA		ITGA5 + ITGB1
6F5	ITGA5, ITGB1	ITGA5 + ITGB1	No integrin heterodimer confirmed
8C10	ITGA5, ITGB1	ITGA5 + ITGB1	ITGA5 + ITGB1
8C12	ITGA5, ITGB1	ITGA3 + ITGB1 weak binding	No integrin heterodimer confirmed*
9F4	No protein found	ITGA5 + ITGB1	ITGA5 + ITGB1

*8C12 did not show binding to human hCMEC/D3 cells

Aside from 1E7 clone binding to ALCAM, 6C7 clone binding to Striatin3, 6A10 and 3E8 for which no antigen was found, all the other antibodies recognized integrins in at least one deconvolution method. The best candidate 4F2 recognized the integrin β 1 subunit combined with any α subunit, while several other hits bound to α 5 β 1 heterodimers.

To elucidate the potential of these receptors in mediating transcytosis we then explored which subunit of the integrin was involved, the level of affinity needed for optimal transcytosis and the function of the antibody in the integrin signaling cascade.

Binding of identified monoclonal antibodies to several mouse and human integrin subunits

The ability of the antibodies to bind human α 3, α 4, α 5 and β 1 monomer subunit, human α 4 β 1 dimer and mouse and human α 3 β 1 and α 5 β 1 dimers was assessed using ELISA, with commercially available recombinant integrin subunits. All the above monoclonal antibodies were assessed, as well as several commercially available anti- α 5, α 3 or β 1 integrin antibodies, along with natalizumab (54) a therapeutic anti- α 4 β 1 antibody marketed in multiple sclerosis and OS2966, an integrin β 1 blocking antibody (55, 56)

Table 3 :Anti-integrin antibodies apparent affinities to different integrin subunits investigated by ELISA

Entry	Reference	Commercial target	Function ^a	Cross-reactivity ^b	EC ₅₀ in nM								
					human α3	human α4	human α5	human β1	human α3β1	human α4β1	human α5β1	mouse α3β1	mouse α5β1
1	MAB1965	β1	Inhibitory	human	Nb	Nb	Nb	0.04	0.02	0.03	0.02	Nb	Nb
2	NBP2-52708	β1	Non-functional	human	Nb	Nb	Nb	0.16	0.19	0.25	0.13	Nb	Nb
3	MABT409	β1		Human, Bovine, Pig, Sheep, Horse, Canine, Rhesus Macaque	0.60	Nb	Nb	0.73	0.65	0.59	0.38	Nb	Nb
4	OS2966	β1	Inhibitory	human	3.30	Nb	Nb	0.60	0.40	0.70	0.80	Nb	Nb
5	14-0299-82	β1	Stimulatory	human mouse	0.38	Nb	Nb	1.30	0.50	0.68	0.80	Nb	Nb
6	MAB2079Z	β1	Stimulatory	rat human	Nb	Nb	Nb	3.55	3.00	1.06	0.88	Nb	Nb
7	MABT199	β1	Stimulatory	human	4.18	Nb	Nb	2.24	1.32	0.75	0.97	Nb	Nb
8	MA5-17103	β1		human, mouse, NHP	10.88	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb
9	553715	β1	Stimulatory	mouse	Nb	Nb	Nb	0.10	0.30	0.20	0.30	0.20	0.70
10	MA1-25298	α3	Non-functional	human	15.90	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb
11	343802	α3		human	0.70	Nb	Nb	Nb	0.17	Nb	Nb	Nb	Nb
12	66070-1-Ig	α3		human, pig, mouse	28.10	8.94	6.40	Nb	0.48	14.00	5.30	0.26	5.30
13	MAB1346	α3	Inhibitory	human					0.06			Nb	
14	DCABH-8217	α3β1		human					0.29				
15	MFR5	α5		mouse	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	0.10	Nb	Nb
16	Natalizumab	α4 α4β1 α4β7	Inhibitory	human	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	0.17	Nb	Nb	Nb

17	4F2	NA		human, NHP	3.00	Nb	Nb	0.60	0.20	0.40	0.20	Nb	Nb
18	6F5	NA		human, NHP	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	1.00	Nb	Nb
19	8C10	NA		human, NHP	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	1.50	Nb	Nb
20	3B8	NA		human, NHP	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb
21	3C5	NA		human, NHP	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb
22	4D2	NA		human, NHP	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb
23	6D6	NA		human, NHP	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb
24	8C12	NA		NHP	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb
25	9F4	NA		human, NHP	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb	Nb

a: As reported in Byron et al (57) ; b: As reported by commercial provider; NA: not applicable; Nb: non binder

All commercially available anti β 1-integrin antibodies tested (entries 1-9), except MA517103, entry 8, displayed binding to the β 1-integrin subunit as expected and to all its heterodimers α 3 β 1, α 4 β 1 and α 5 β 1. MA517103, which is described as an anti β 1-integrin only reacted with α 3-integrin, albeit with modest affinity. The anti-human α 3-integrin antibodies (entries 10-14) bound to either the α 3 monomer and/or α 3 β 1 heterodimers with 343802 (entry 11) showing no selectivity over other subunits while the anti α 3 β 1 antibody MAB1346 (entry 13) confirmed binding to this heterodimer. Finally, anti α 5-integrin MFR5 and anti α 4-integrin natalizumab antibodies (entries 15 and 16, respectively) confirmed binding to the α 5 β 1 and α 4 β 1 heterodimers respectively with no binding to the α monomers (Table 3).

Of our internally produced antibodies, only three displayed binding, 4F2 (entry 17) to α 3 and β 1 monomers and α 3 β 1, α 4 β 1 and α 5 β 1 dimers confirming the character of pan α β 1 targeting (α β 1) as found during the target identification experiments, while 6F5 and 8C10 (entries 18,19) only bound to α 5 β 1. The remaining internally generated antibodies did not display binding to any monomers or heterodimers in these conditions. This could be linked to lower affinity or recognition of a cell-exposed conformational epitope that does not exist in the recombinant soluble proteins

Altogether, the profile of our best candidate 4F2 (entry 17) was very similar to the one of OS2966 (entry 4) and others like MABT409, MABT199 and 14-0299-82 (entries 3-5,7) described as β 1 subunit binders while 6F5 and 8C10 (entries 18-19) displayed specific binding to the α 5 β 1 heterodimer, like MFR5 (entry 15).

In order to validate the mechanism *in vivo*, we would need to identify a mouse anti-integrin antibody performing transcytosis. None of our internally generated antibodies displayed

affinity for any of the murine subunits. Interestingly, 553715 (entry 9), which was generated from a mouse endothelial cell line and not reported to be cross-reactive, also showed binding to the human subunits. 66070 (entry 12) confirmed its mouse-human cross-reactivity. These were selected for evaluation in a transcytosis model.

Anti-integrin antibodies have been reported to bind to integrin in different conformations corresponding to several functions (57): stimulatory or activation-specific, inhibitory, or non-functional. To assess the potential impact of this functionality conformation on transcytosis, we tested a few commercially available anti-integrins with such described functions in our transcytosis models.

Aiming to clarify which subunit could be at stake, whether the function of the antibody was important and whether the mouse-human cross-reactive commercially available antibodies were able to perform transcytosis, we performed a new set of transcytosis experiments in a NHP *in vitro* model.

Transcytosis assessment in the PharmaCo-Cell® NHP primary model

This commercially available model uses three cell types. Transwell® inserts are coated with primary cultures of NHP (*Macaca irus*) BMECs, brain pericytes and astrocytes. This BBB Kit™, reconstituted by triple co-culture, shows BBB features such as TEER values around 180 Ω .cm². This model is comparable to the one used above (33) and has the advantage of being commercially available and therefore available upon need. Several of the above monoclonal antibodies were assessed in this model (Fig 3A).

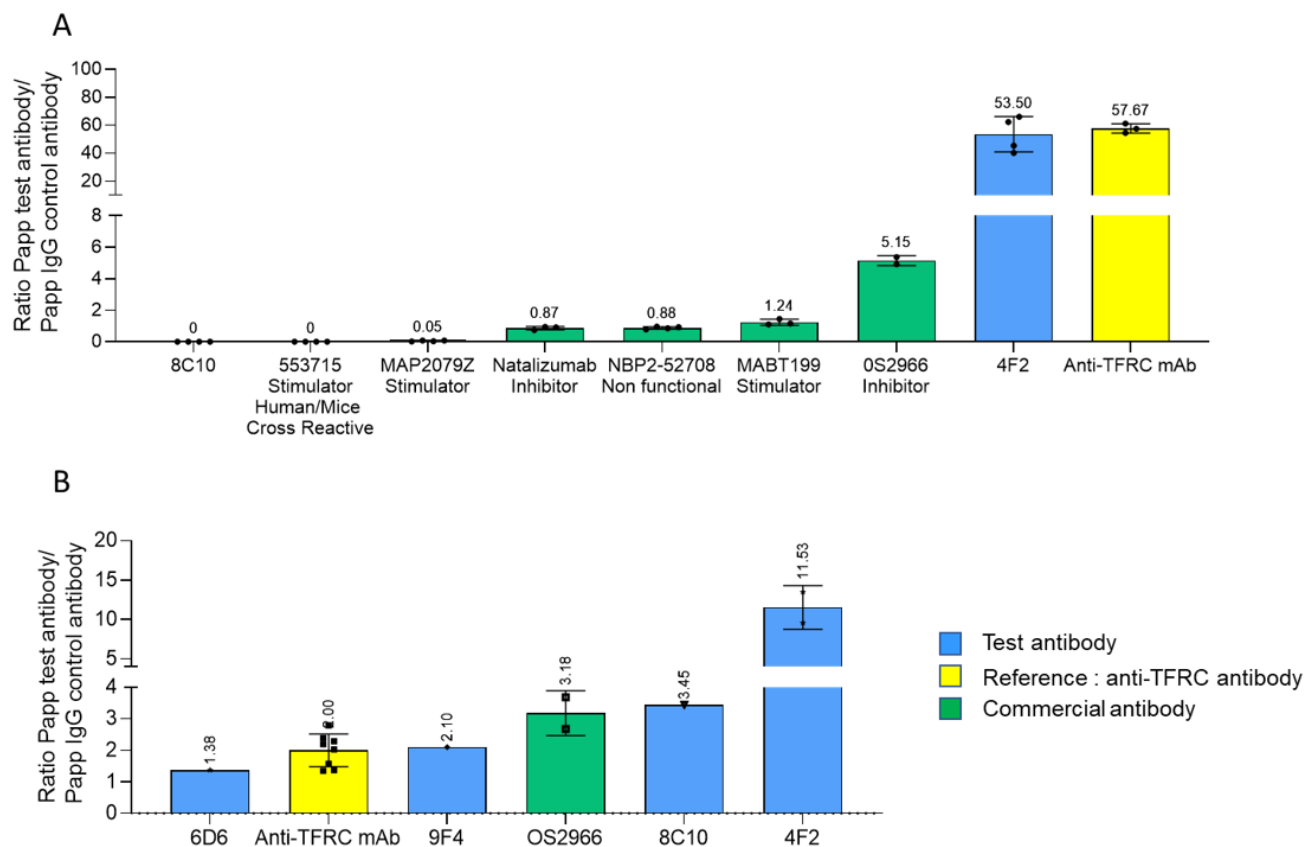


Fig 3: Antibody transport in two commercial *in vitro* BBB models (A) Transcytosis in the PharmaCo-Cell® Transwell® model. (B) Transcytosis in the Brainplotting™ Transwell® model. Results are given as P_{app} test antibody/ P_{app} control antibody. Blue bars represent test antibodies, the green bar represents a commercial antibody, and the yellow bar represents the reference anti-TFRC antibody. Each point represents one Transwell®

The two commercially available anti- $\beta 1$ integrin antibodies 66070-1-Ig and 553715 which displayed binding to both human and mouse integrin subunits were evaluated in the PharmaCo-Cell® model with hCMEC/D3 cells to validate transcytosis in a human model. The results are shown in S5 Fig. As the antibody 553715 displayed a much higher PC_R in the

hCMEC/D3 *pulse-chase* assay than antibody 66070-1-Ig, it was selected for further evaluation in the PharmaCo-Cell® NHP transcytosis model. However, it did not cross the Transwell®, eliminating our hope to use it for *in vivo* validation. There was no difference between anti β 1 antibodies with inhibitor, activator or no function and most of them displayed no or very little transcytosis. The only antibody that underwent transcytosis to some extent was OS2966. In this assay 4F2 behaved like the anti-TFRC monoclonal antibody, leading to the highest transcytosis. In comparison, commercial integrin antibodies were poorly active in transcytosis, an observation that highlights the originality of the novel antibodies discovered here.

Evaluation of the best candidates in a human primary model of transcytosis

We evaluated several of our antibodies with different binding profiles in a primary human BMEC Transwell® model from Brainplotting™ (35). This model is derived from primary human BMECs prepared from brain samples obtained after surgical resection. The results are shown in Fig 3B.

In this model, OS2966, 4F2 and 8C10 underwent transcytosis more efficiently than the anti TFRC monoclonal antibody. Antibody 9F4 was comparable to anti TFRC, while 6D6 was less efficient. These results confirm the superiority of 4F2 to undergo transcytosis.

We verified that the results of our transcytosis assays were not linked to increasing the permeability of our models. If this were the case, the controls should also appear with higher apparent permeability. We compared P_{app} of all the control antibodies incubated in each Transwell® insert with those of Transwell® inserts incubated with the anti-TFRC antibody (Fig 4 A, B, C). We also checked the integrity of the tight junctions with fluorescein transport

evaluation (Fig 4D) , TEER measurements (Fig 4E) and zona occludens (ZO)-1 immunofluorescent labeling at the end of the transcytosis experiment with human BMECs from Brainplotting™ (Fig 4F).

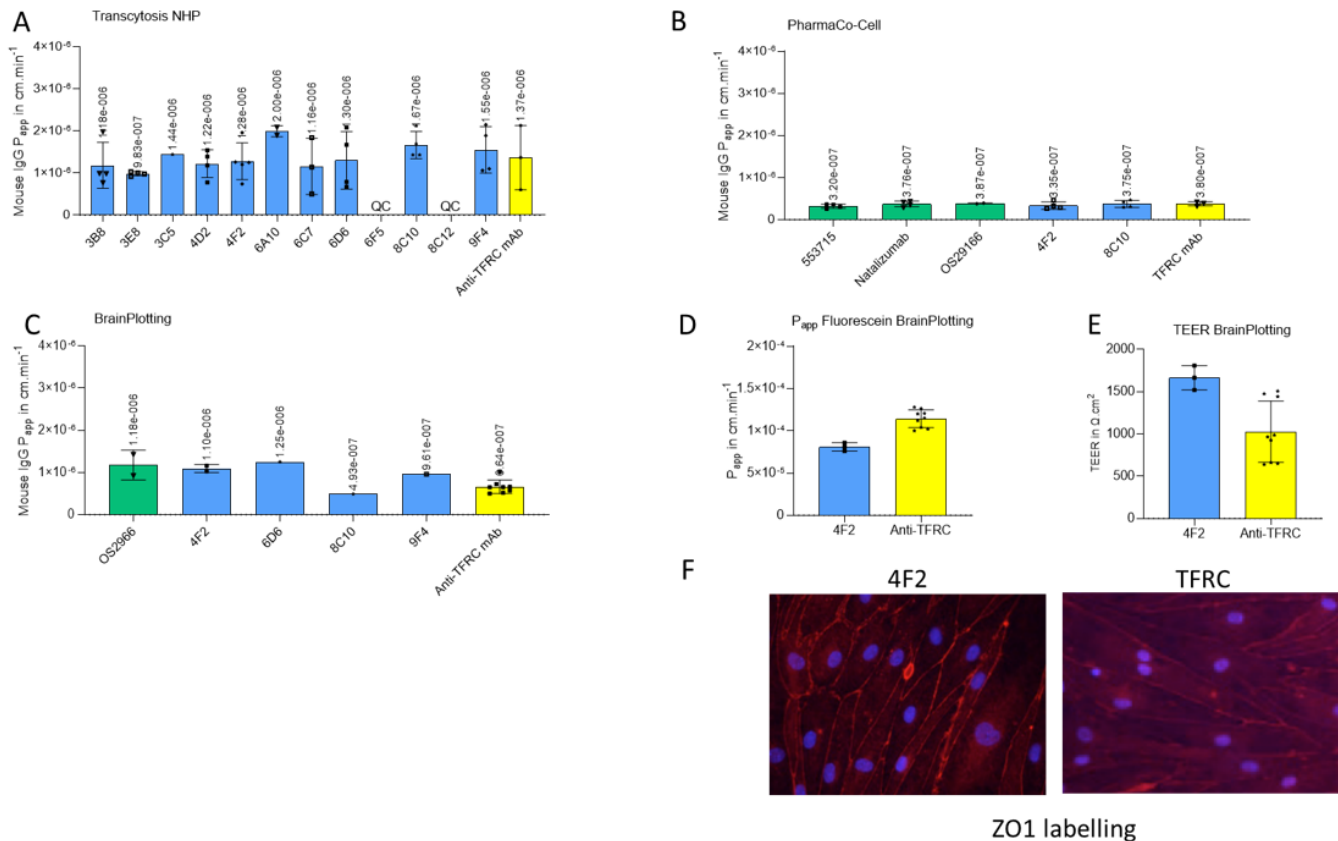


Fig 4 : All mouse IgG control P_{app} in different transcytosis models (A) NHP internal model, (B) Human Brainplotting™ model, (C) NHP PharmaCo-Cell® model, (D) Fluorescein P_{app} in 4F2 and anti-TFRC Transwell® (E) TEER measurements with Evohm instrument. (F) Human BMEC immunofluorescence ZO1 labelling in red and nuclei with Hoechst in blue after incubation with antibodies in Brainplotting™ model. Each point represents one Transwell®.

All control antibodies display similar P_{app} to P_{app} of control antibody and fluorescein in cells incubated with anti-integrin and anti-TFRC antibodies, suggesting no effect on cell

permeability (Fig 4A-D). In Brainplotting™ model, TEER measurement in Transwell® treated with 4F2 or anti-TFRC were similar (Fig 4E) and ZO-1 labelling suggests that tight junctions were not disrupted by incubation with antibodies (Fig 4F). We have also stained hCMEC/D3 with 4F2 antibody. The S8 Fig shows 4F2 target is present on the cell membrane.

Immunohistochemistry on human and non-primate tissues

In parallel to these efforts, we undertook immunohistochemical evaluation of the monoclonal antibodies on human and non-human primate tissues to further prioritize them. The objectives were to determine binding on these tissues and cellular localization in brain and periphery. A comparison with human TFRC was also made in these experiments. A first screening was performed on PC3 cells to assess if the monoclonal antibodies could be used on paraffin-embedded or on frozen material, then in hCMEC/D3 cells (Fig 5A).

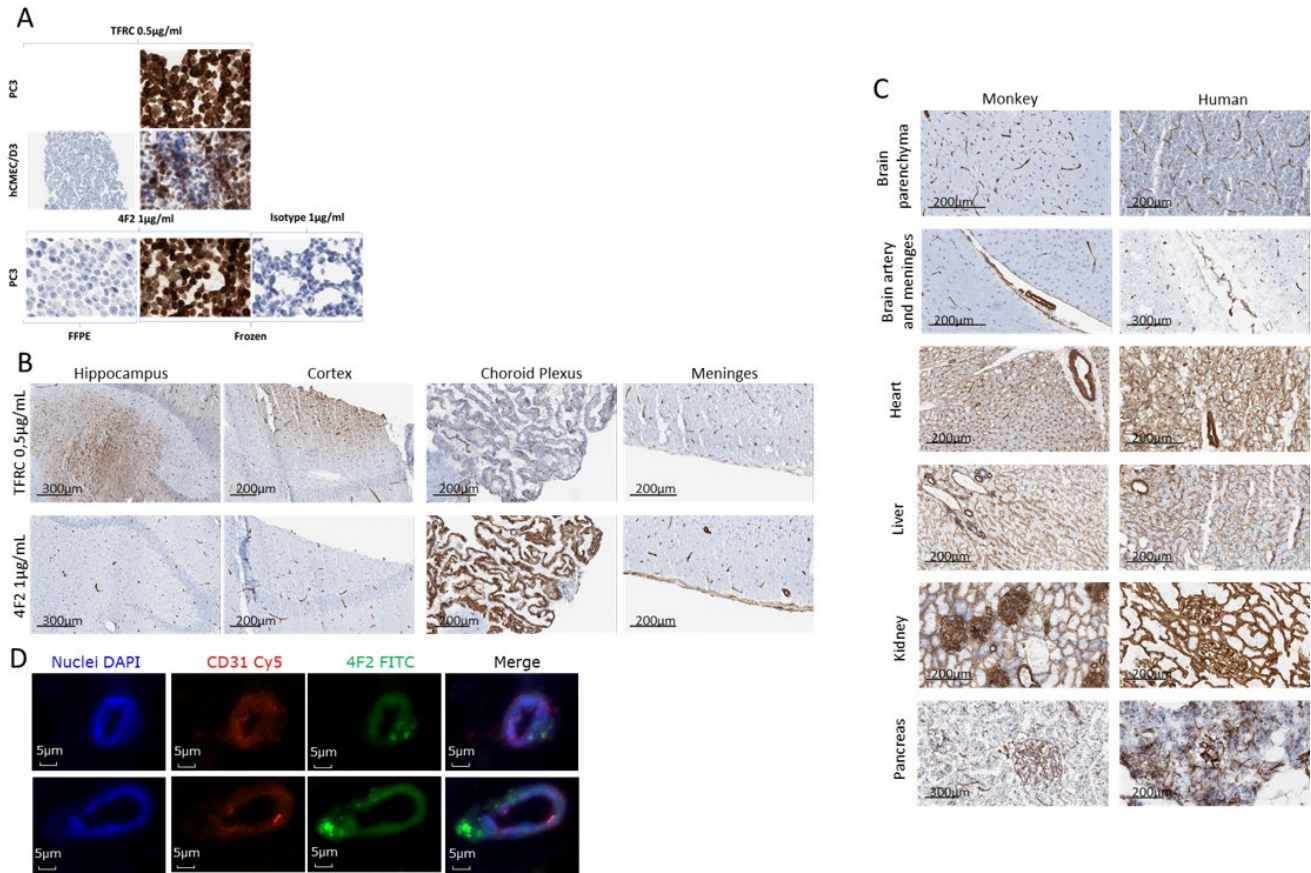


Fig 5 :IHC with anti-TFRC and anti-4F2 antibodies The blue staining corresponds to the hematoxylin counterstaining to visualize cells and nuclei. Positive staining are in brown (DAB 3,3'-Diaminobenzidine) (A) IHC in FFPE or frozen cells to select samples. Cells were visualized with a microscope at 200x (B) 4F2 antibody IHC for brain parenchyma specificity staining on NHP brain slices compared to anti-TFRC antibody (C) 4F2 antibody human-NHP cross-reactivity in human and NHP slices of several organs. Isotype controls are in supplementary data (S6 Fig) (D) Fluorescent IHC in NHP brain capillaries from frozen healthy NHP brain slices stained with Dapi (nucleus), Cy5 (anti-CD31 antibody) and FITC (4F2 antibody).

In supplementary data (S6 Fig), only four monoclonal antibodies gave specific binding on frozen human brain tissue: 4F2, 4D2, 3C5 and 3B8. Of these, only 4F2 showed specific vascular staining. 3B8, 4D2 and 3C5 displayed non-vascular staining in human brain tissue while the 3C5 stained the basal membrane of capsule glomeruli, 50% tubules, nerve and other tissues. As for the anti TFRC monoclonal antibodies, 4F2 displayed binding to BMECs. While TFRC was widely expressed on neurons and glia, 4F2 was clearly restricted to parenchyma, choroidal and meninges capillaries, along with arterial smooth muscle, and basement membrane (Fig 5B).

The same pattern of expression could be seen in human and non-human primate tissue (Fig 5C) along with peripheral tissues such as heart, pancreas, kidney, liver.

To assess the 4F2 antibody target localization in microvessels, we performed immunohistofluorescence in frozen healthy NHP brain slices (Fig 5D). Images confirmed vascular staining with our 4F2 antibody but did not permit to conclude on a precise localization of 4F2 at the endothelial cell membrane.

Discussion

Our initial goal was to generate antibodies that would recognize human receptors, by immunizing mice with primary human BMECs. Due to the very high number of cells required for immunization campaigns, this would have required generating primary cells that could be further multiplied. We show that even when using fresh brain tissue after short post-mortem intervals, the endothelial cell phenotype was largely lost upon culture. In contrast, we were able to develop a robust procedure to prepare primary NHP BMECs of good quality (33). Given

the homology of many proteins between human and NHP, we decided to start from these cells and to include binding to both human and NHP BMECs in the flowchart to select only cross-reactive antibodies. From immunization of Trianni mice with primary healthy NHP BMECs we collected 634 antibodies of which 62 bound to human hCMEC/D3 cells or NHP BMECs. Among the 22 antibodies with unique sequences, 12 clones internalized in NHP BMEC and hCMEC/D3 were further evaluated in three transcytosis models. The most relevant model to evaluate the antibodies from the campaign would be with the same cells as the ones used for immunization, namely the NHP BMECs. This model described by Chaves et al. (33) has been validated with transferrin along with an anti-human/NHP TFRC antibody. The hCMEC/D3 immortalized human brain endothelial cell line (58, 59) has been well characterized in terms of brain-specific and tight junction proteins (60). Given the TEER values indicative of high paracellular permeability, we used this cell line in a *pulse-chase* mode which allows to avoid the effect linked to non-specific paracellular passage (52). This procedure was also applied for primary NHP BMECs with TEER < 150 Ω .cm². The best antibody detected in the three models was 4F2.

In parallel, uncovering the targets of the antibodies validated in these three models of transcytosis was performed using two different methods. The first was by immunoprecipitation/ mass spectrometry followed by confirmation by ELISA and the second by Retrogenix™/Charles River reverse transfection microarray technology. Of the twenty-two antibodies, one displayed ALCAM as its target, one interacted with Striatin3 and nine bound to β 1 integrin subunit or heterodimers.

ALCAM (also known as CD166-antigen) has been reported to play a major role in infiltration of brain tumors by T-cells (61) and is very relevant to the BBB field. We identified one antibody

against ALCAM (1E7) in this campaign, but it did not perform well in the transcytosis assay. In addition, antibodies against ALCAM have been reported to inhibit diapedesis of monocytes across the BBB (62). We decided not to pursue this protein as a target for enhanced brain delivery.

Striatin3 (also known as SG2NA) is a 780 amino-acid protein with four protein-protein interaction domains including a caveolin-binding domain, a coiled-coil domain, a Ca²⁺-calmodulin binding domain and a tryptophan-aspartate (WD)-repeat domain (63-66). Tissue expression is mostly ubiquitous but regulated in specific tissues by differential splicing (67). Even if Striatin3 is localized in multiple cellular compartments, plasma membrane, mitochondria, endoplasmic reticulum, nucleus, and lysosomes (68) this protein is essentially intracellular and has no extracellular domain. In addition, the Retrogenix™/Charles River cell micro-array technology did not validate this target identified by immunoprecipitation and mass spectrometry. Despite encouraging transcytosis results, we decided not to pursue Striatin3 and to focus on the integrin antibodies.

Integrins form a family of 24 heterodimeric transmembrane receptors that play an active role in cell-cell interactions in a multitude of physiological and disease situations (57). They are important players in oncology (69), cancer, melanoma and metastatic progression, but also in tissue fibrosis (70), rheumatoid arthritis (71), wound healing (72) and ischemic stroke (73) to name a few (74). Integrins play an important role in the adhesion of cells to the extracellular matrix (44, 72, 75). They have been shown to mediate the endocytosis of a variety of material such as nanoparticles (44, 76-80), beads (81), phages (82, 83) or cells (84, 85) provided that the material presents integrin ligands on its surface. Most known examples have used RGD peptides, canonical ligands of several integrins (86) or their derivatives, but one example

reports on anti $\alpha 2\beta 1$ integrin antibody-targeted nanoparticles leading to enhanced cell uptake (79). Some pathogenic bacteria such as *Y. pseudotuberculosis* (87-90), *E. coli* (91, 92), *S. aureus* (84, 85), staphylococci and streptococci (93, 94), *Neisseria meningitidis* (95), virus (96) or adeno-associated-viruses (97) have also been shown to be internalized in cells via an integrin-mediated pathway. In most of these studies, integrin $\beta 1$ is the main reported player. Several mechanisms have been documented for this uptake, including macropinocytosis and transcytosis (79, 87, 96), pathways involving clathrin (75) caveolae, dynamin and dynamic unstable microtubules (72, 92). Uptake has been shown to be dependent upon the integrin isoforms (44) and state of activation (75).

Transcytosis of integrin-ligand-exposing-cells (98, 99), -nanoparticles (100-102), or -bacteria (103) and -viruses (104) has also been reported but most of the literature is on epithelial cells. Very few studies describe transcytosis through monolayers of endothelial cells. Two examples related to brain metastasis have shown 1.3-to-1.5-fold enhanced transcytosis of breast cancer cell lines expressing $\beta 1$ integrin ligands through monolayers of human brain microvascular endothelial cells (83) and mouse brain endothelial cells (82) respectively. One article reports that *Streptococcus* group B are using $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ for brain invasion in juvenile meningitis (105). RGD-decorated nanoparticles have shown modest improvement of transcytosis in the mouse bEnd3 cell model (106) while in another report an enhanced transcytosis could only be observed in a blood tumor model while a BBB model with rat primary brain endothelial cells failed to show an enhancement (107). All the examples of uptake and transcytosis discussed above are with particles or cells decorated with many integrin-targeting ligands, and transcytosis was improved with increasing ligand density (100). Although a few of the above examples have shown that uptake or transcytosis can be inhibited in the presence of anti- $\beta 1$

integrin antibody (100) (105), to the best of our knowledge no single ligand and more specifically no anti-integrin antibody has been reported to be internalized or to undergo transcytosis through any cell or model.

A few anti-integrin monoclonal antibodies are on the market as drugs, such as natalizumab , an anti- $\alpha 4\beta 1$ integrin for multiple sclerosis (108), abciximab and efalizumab (109), an anti- $\alpha \text{IIb}\beta 3\text{a}$ integrin for thrombosis and an anti- $\alpha \text{L}\beta 2$ for psoriasis) while others are in clinical development. Relevant to our studies are three anti- $\beta 1$ antibodies OS2966 (anti- $\beta 1$) (55), MINT1526A (anti- $\alpha 5\beta 1$) (110) and M100 (volociximab) (anti- $\alpha 5\beta 1$) (110) currently at various stages of clinical development in oncology. None of them has been reported to display brain exposure.

Integrin $\beta 1$ is described to play a key role in repair and protection of the neurovascular unit during cerebral ischemia (111) and integrin $\alpha 5$ receptor has been linked to barrier tightness (112). A few studies have analyzed the BBB following application of anti-integrin $\beta 1$ antibodies. Osada et al. observed that functional inhibition with an anti-integrin $\beta 1$ antibody resulted in lowered CLDN5 expression and deduced a critical role for $\beta 1$ -integrin-mediated adhesion of brain endothelial cells to the surrounding extracellular matrix for stabilizing CLDN5 in BBB tight junctions and BBB integrity (113, 114). Their results were confirmed in another study in which CLDN5, occludin and ZO1 were decreased by anti-integrin $\beta 1$ antibody treatment (115). In contrast, Li et al didn't observe CLDN5 or ZO-1 reorganization after treatment with anti- $\beta 1$ antibody (111). Furthermore, Edwards and Roberts have shown that mice with endothelial cell-specific knockout of $\alpha 5$ integrin display enhanced barrier tightness after stroke or oxygen-glucose deprivation (116, 117). It was therefore important for us to make sure that the transcytosis we observed for our anti integrin antibodies was not a

consequence of endothelial cell permeabilization. This appeared not to be the case because the control antibodies did not show enhanced permeability in the presence of the anti-integrin antibodies (Fig 4 A, B, C, D, E). Secondly, the tight junctions were still in place at the end of the experiment as shown by ZO-1 immunofluorescence (Fig 4F).

After this validation, we tried to understand which subunit was recognized by our best antibodies and if we could correlate a binding or a specific $\alpha\beta$ heterodimer to a transcytotic capacity. For this, binding was performed by ELISA using recombinant α and β integrin subunits (Table 3). This analysis was performed also for a series of commercially available or reported anti-integrin antibodies. Only three of our antibodies displayed binding to the recombinant proteins, with 4F2 binding to $\alpha3$, $\beta1$ and all $\alpha3,4,5\beta1$ heterodimers, while 6F5 and 8C10 only bound to $\alpha5\beta1$. The others may recognize a specific conformation-dependent epitope of the integrins not present in these recombinant forms. Several commercial antibodies displayed the same profile as 4F2, including OS2966 which is known to bind to $\beta1$ (56) (118). The best antibody for transcytosis, 4F2, bound to more heterodimers but this did not appear to be a sufficient condition, since antibodies with a similar profile such as MABT199 (Table 3, entry 7) did not perform transcytosis (Fig 3A). This did not seem linked to the lower affinity of MABT199 for $\beta1$ and its heterodimers since NBP2-52708, which has a higher affinity (Table 3, entry 2) also showed very low transcytosis (Fig 3A).

We then tried to investigate whether the transcytosis could be linked to functionality of the antibody. It is now understood that anti-integrin antibodies can be classified into three main types: those that inhibit ligand engagement, those that stimulate ligand engagement or induce a high-affinity conformation and those that have no specific effect (and behave as negative controls) (57). These functions are intimately associated with the three potential conformations

of integrins (active, at rest and inactive (119)) bound by the antibody. Blystone et al. established for instance that $\alpha 5\beta 1$ -mediated phagocytosis required activation to a high affinity conformation by an activating monoclonal antibody. The phagocytosis was inhibited by an excess of its ligand fibronectin (81). The cognate ligands of $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 5\beta 1$, the most frequent hits of our antibodies are laminin (120) and fibronectin (121) respectively. Transcytosis was not inhibited by the presence of fibronectin, either by Transwell® coating or when added to the medium (S7 Fig) suggesting that our antibodies might not act by inducing a high affinity conformation. To gain insight into the impact of functionality on transcytosis, we selected commercially available anti-integrin antibodies with defined functions, such as MABT199, 553715 and MAP2079Z, all described as activating antibodies and NBP2-52708 described as a non-functional antibody. In contrast, OS2966, like most of the anti-integrin antibodies currently in development (57) has been reported as an inhibitor of downstream signaling from integrin $\beta 1$ (56). Evaluation of these antibodies in a NHP primary model (Fig 3A) showed that only OS2966 underwent transcytosis to some extent, albeit much less than 4F2, suggesting that inhibition might be necessary. This transcytosis property is not reported for OS2966, which has in fact been administered intra-tumorally in a mouse model of glioblastoma (55).

4F2, with its best transcytosis efficacy was also the only one to demonstrate specific staining of vessels on human and NHP brain and peripheral tissues suggesting high specificity for endothelial cells. Using electronic microscopy and immunogold labeling, Conforti et al. have shown that integrin receptors such as $\alpha v\beta 3$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ and others are not only located to the basal side of endothelial cells, but also on the cell surface in contact with blood (122). Data indicate, that in addition to their role in promoting extracellular attachment to extracellular matrix proteins, integrin receptors can be exposed to the bloodstream and eventually be

available for binding of plasma proteins, circulating cells and antibodies. Our confocal microscope immunofluorescence study (Fig 5D) did not allow to determine whether this labeling with 4F2 was luminal or abluminal. Co-labeling with Permeability-GlycoProtein (P-gp) in the same tissues could have been informative in this respect (123).

The different rank orders obtained for the antibodies in the five BBB models displayed in this paper illustrate the challenges of such models. The hCMEC/D3 model, as some other cell line-based models, has been shown to lose some of its barrier properties upon culture (18). Given their low transendothelial resistance, these cells are probably more suited for mechanistic studies than true permeability assessments (124). For this reason, we have used this model in a “*pulse-chase*” mode (52). The NHP models used differ by the presence of astrocytes and pericytes which can have a major impact on permeability and protein expression. Pericyte coverage is essential to the barrier integrity (125), moreover pericyte signaling to endothelial cells via integrins has recently been reported to impact BBB permeability (112). The PharmaCo-Cell® model is certainly the most relevant to this study, as immunization was performed with NHP cells, and this model incorporates cells from the neurovascular unit. Finally, the human primary model is derived from epilepsy or glioblastoma surgical resections and even though they are taken from the healthy surrounding tissue, some variability could be present. The extent to which *in vitro* BBB models can predict what occurs *in vivo* is still the matter of intense research and debate. Even if the brain exposures of some antibodies have been linked to their apparent permeabilities in *in vitro* transcytosis models (126, 127), *in vivo* brain exposure, distribution and pharmacokinetics are dependent on a series of dynamic processes, also involving target engagement, localization and cellular trafficking. To conclude on the potential of integrin receptors to transport antibodies to the

brain, we tried to identify a mouse/human reactive antibody for which transcytosis *in vitro* could be validated for direct evaluation *in vivo* in mice. None of our internally generated antibodies turned out to cross-react with mouse integrins, but one of the commercially available antibodies, 553715 (128), demonstrated binding to both human and mice subunits and heterodimers (Table 3, entry 9) suggesting cross-reactivity. However, in the non-human primate *in vitro* transcytosis model 5537715 revealed no barrier crossing in comparison with 4F2 and a reference anti-TFRC antibody (Fig 3A).

We tried to understand the reason for the superiority of 4F2 *versus* all other anti-integrin antibodies. The first potential reason is their pan alpha binding profile but several commercial antibodies displaying the same binding profile did not perform transcytosis. Positively charged proteins are known to display higher tissue and brain penetration (129); however predicted pIs (S9 Table) did not point to a higher pI for 4F2 compared to the other antibodies.

This first study validated the flowchart and the models while teaching us several lessons to consider for future campaigns. One limitation of our study is that it did not detect any of the receptors known for mediating transcytosis, such as TFRC, INSR, IGF1R, CD98, LRP1R, LDLR to name a few. We don't know the reason for this but speculate that integrins, which are mediating intercellular interactions and binding to the extracellular matrix (130) might have been shielding these receptors. On the other hand, ITGB1 protein abundance cannot be an explanation for the high hit rate of ITGB1-binding antibodies as it is only 2-fold higher than TFRC but lower than some other receptors such as LRP1 or membrane transport ATPases (131). Integrins are ubiquitously expressed, and so are all the above reported transcytosis-mediating receptors. Integrin $\alpha 7$ antibodies have for instance been reported to increase muscle targeting of lysosomal enzymes (132). Nevertheless, in our next study, we could

include a counter screen of peripheral tissues, to select hits with the highest endothelial brain cell enrichment.

Inherently to the host, it is notoriously difficult to obtain cross-reactive antibodies for highly conserved mouse-human targets during mouse immunization campaigns. Alternative solutions would be to screen naïve antibody libraries against human and mouse brain primary endothelial cells to select cross-reactive clones or to immunize lama and select cross-reactive nanobodies.

This study is the first one reporting on the potential of BBB crossing for very specific anti-integrin antibodies. Regarding the potential of this mechanism for enhancing the brain exposure of biotherapeutics, several important questions remain. siRNA experiments to suppress $\alpha 3$, $\alpha 5$ and $\beta 1$ genes could bring light on which integrin subunit is required for transcytosis. Co-structure of 4F2 Fab with $\beta 1$ integrin could provide clues on the activating or inhibiting conformation for transcytosis (133) and on the specific epitope. From this structure, the potential to perform affinity maturation to get mouse-human cross-reactive antibodies could be assessed. Alternatively, epitope mapping could yield information on the antigen that is recognized and whether it is or not conserved across species. The ultimate goal would be *in vivo* validation of brain enhancement *versus* a control antibody first as such and then as a bispecific antibody or fused to a cargo therapeutic protein. Integrin $\alpha 5\beta 1$ has been reported as a new target for tumor treatment (134). Given the overexpression of integrins in several tumor cell models (56, 135) and their major role in tumor development (136-138) this mechanism could be extremely useful for the treatment of central tumors such as glioblastoma.

List of abbreviations

ABC: Antibody Binding Capacity

ALCAM: Activated leukocyte cell adhesion molecule

ARPC5: Actin-related protein 2/3 complex subunit 2

BBB: Blood Brain Barrier

BCRP: Breast Cancer Resistance Protein

BMEC: Brain Microvascular Endothelial Cells

BSA: Bovine Serum Albumin

CD: Cluster of Differentiation

EBM: Endothelial Basal Medium

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ENPL: Endoplasmin

FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

FPKM: Fragments Per Kilobase per Million mapped fragments

HBSS: Hanks' Balanced Salt Solution

hCMEC/D3: Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell

IgG: Immunoglobulin G

IHC: Immunohistochemistry

INSR: Insulin Receptor

IP: Immunoprecipitation

IS: Internalization Score

LAMP1: Lysosomal-Associated Membrane Protein 1

LDL: Low-Density Lipoprotein

NBB: Netherlands Brain Bank

NHP: Non-Human Primate

P_{app} : Apparent Permeability

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PC_R : *Pulse-chase* Ratio

RCN-1: reticulocalbin

RMT: Receptor-Mediated Transcytosis

RSSA: 40S ribosomal protein SA

SM: small intestine

SRSF1: Serine/arginine-rich splicing factor 1

SP16H: FACT complex subunit SPT16

TEER: Trans-Endothelial Electrical Resistance

TFRC: Transferrin Receptor C

ZO: Zona Occludens

Declarations

Ethics declarations

Experiments were performed at Sanofi in our Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC)-accredited facility in full compliance with standards for the care and use of laboratory animals, according to the French and European Community (Directive 2010/63/EU) legislation. All procedures were approved by the local animal ethics committee (Ethical Committee on Animal Experimentation [CEEA] #24 and #21), of Sanofi, Vitry-Alfortville and Chilly Mazarin Research Centers, France, and the French Ministry for Research.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supporting information files.

Competing interests

All authors are Sanofi employees and may hold shares and/or stock options in the company.

This does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Acknowledgements

We thank Marc Gumbleton and Jack Smith from Cardiff University for their helpful training on the “*pulse-chase*” assay. We are grateful to Adrienne Peretti-Renaud, Nicolas Maestrali, Stéphane Somarriba, Nathalie Couteault, Laurent Maton, Melanie Annat, David Bournizel, Marie Reau and Evelyne Deschamps from Sanofi for the immunization, hybridoma screening and antibodies production. We are grateful to the Ebiology team from Sanofi for sequence annotations, Stephan Mathieu from Sanofi for his expertise and helpful technical assistance in conducting fluorescent IHC studies, Paola Fiorentini from Sanofi for her investigations to find human brain samples and Isabel Ann Lefevre from Sanofi for English language editing and proofreading the manuscript. We thank Matthias Wabl from TRIANNI Inc and Jim Freeth, Diogo Rodrigues and Jo Soden from Retrogenix™/Charles River.

Bibliography

1. Kumar NN, Pizzo ME, Nehra G, Wilken-Resman B, Boroumand S, Thorne RG. Passive Immunotherapies for Central Nervous System Disorders: Current Delivery Challenges and New Approaches. *Bioconjug Chem*. 2018;29(12):3937-66.
2. Banks WA. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(4):275-92.
3. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013;19(12):1584-96.
4. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 2017;6(9):576-88.
5. Pepinsky RB, Shao Z, Ji B, Wang Q, Meng G, Walus L, et al. Exposure levels of anti-LINGO-1 Li81 antibody in the central nervous system and dose-efficacy relationships in rat spinal cord remyelination models after systemic administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;339(2):519-29.

6. Johnsen KB, Burkhart A, Thomsen LB, Andresen TL, Moos T. Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery. *Prog Neurobiol*. 2019;181:101665.
7. Boado RJ, Hui EK, Lu JZ, Pardridge WM. Glycemic control and chronic dosing of rhesus monkeys with a fusion protein of iduronidase and a monoclonal antibody against the human insulin receptor. *Drug Metab Dispos*. 2012;40(10):2021-5.
8. Pardridge WM, Boado RJ, Patrick DJ, Ka-Wai Hui E, Lu JZ. Blood-Brain Barrier Transport, Plasma Pharmacokinetics, and Neuropathology Following Chronic Treatment of the Rhesus Monkey with a Brain Penetrating Humanized Monoclonal Antibody Against the Human Transferrin Receptor. *Mol Pharm*. 2018;15(11):5207-16.
9. Couch JA, Yu YJ, Zhang Y, Tarrant JM, Fuji RN, Meilandt WJ, et al. Addressing safety liabilities of TfR bispecific antibodies that cross the blood-brain barrier. *Sci Transl Med*. 2013;5(183):183ra57, 1-12.
10. Yu YJ, Atwal JK, Zhang Y, Tong RK, Wildsmith KR, Tan C, et al. Therapeutic bispecific antibodies cross the blood-brain barrier in nonhuman primates. *Sci Transl Med*. 2014;6(261):261ra154.
11. Ohshima-Hosoyama S, Simmons HA, Goecks N, Joers V, Swanson CR, Bondarenko V, et al. A monoclonal antibody-GDNF fusion protein is not neuroprotective and is associated with proliferative pancreatic lesions in parkinsonian monkeys. *PLoS One*. 2012;7(6):e39036.
12. Demeule M, Regina A, Che C, Poirier J, Nguyen T, Gabathuler R, et al. Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008;324(3):1064-72.
13. Gabathuler R. Development of new peptide vectors for the transport of therapeutic across the blood-brain barrier. *Ther Deliv*. 2010;1(4):571-86.
14. Molino Y, David M, Varini K, Jabes F, Gaudin N, Fortoul A, et al. Use of LDL receptor-targeting peptide vectors for in vitro and in vivo cargo transport across the blood-brain barrier. *FASEB J*. 2017;31(5):1807-27.
15. Zuchero YJ, Chen X, Bien-Ly N, Bumbaca D, Tong RK, Gao X, et al. Discovery of Novel Blood-Brain Barrier Targets to Enhance Brain Uptake of Therapeutic Antibodies. *Neuron*. 2016;89(1):70-82.
16. Stanimirovic DB, Sandhu JK, Costain WJ. Emerging Technologies for Delivery of Biotherapeutics and Gene Therapy Across the Blood-Brain Barrier. *BioDrugs*. 2018;32(6):547-59.
17. Zhang Y, Sloan SA, Clarke LE, Caneda C, Plaza CA, Blumenthal PD, et al. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. *Neuron*. 2016;89(1):37-53.
18. Urich E, Lazic SE, Molnos J, Wells I, Freskgård PO. Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. *PLoS One*. 2012;7(5):e38149.
19. Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature*. 1996;380(6572):364-6.
20. van Rooy I, Cakir-Tascioglu S, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Storm G, et al. Identification of peptide ligands for targeting to the blood-brain barrier. *Pharm Res*. 2010;27(4):673-82.
21. Cho YK, Shusta EV. Antibody library screens using detergent-solubilized mammalian cell lysates as antigen sources. *Protein Eng Des Sel*. 2010;23(7):567-77.
22. Li J, Feng L, Fan L, Zha Y, Guo L, Zhang Q, et al. Targeting the brain with PEG-PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides. *Biomaterials*. 2011;32(21):4943-50.
23. Smith MW, Al-Jayyousi G, Gumbleton M. Peptide sequences mediating tropism to intact blood-brain barrier: an in vivo biodistribution study using phage display. *Peptides*. 2012;38(1):172-80.
24. Poul MA, Becerril B, Nielsen UB, Morisson P, Marks JD. Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. *J Mol Biol*. 2000;301(5):1149-61.
25. Wang XX, Cho YK, Shusta EV. Mining a yeast library for brain endothelial cell-binding antibodies. *Nat Methods*. 2007;4(2):143-5.

26. Thom G, Hatcher J, Hearn A, Paterson J, Rodrigo N, Beljean A, et al. Isolation of blood-brain barrier-crossing antibodies from a phage display library by competitive elution and their ability to penetrate the central nervous system. *MAbs*. 2018;10(2):304-14.
27. Georgieva JV, Goulatis LI, Stutz CC, Canfield SG, Song HW, Gastfriend BD, et al. Antibody screening using a human iPSC-based blood-brain barrier model identifies antibodies that accumulate in the CNS. *Faseb j*. 2020;34(9):12549-64.
28. Valadon P, Garnett JD, Testa JE, Bauerle M, Oh P, Schnitzer JE. Screening phage display libraries for organ-specific vascular immunotargeting in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(2):407-12.
29. Groot AJ, El Khattabi M, Sachs N, van der Groep P, van der Wall E, van Diest PJ, et al. Reverse proteomic antibody screening identifies anti adhesive VHH targeting VLA-3. *Mol Immunol*. 2009;46(10):2022-8.
30. Roodink I, Franssen M, Zuidschewoude M, Verrijp K, van der Donk T, Raats J, et al. Isolation of targeting nanobodies against co-opted tumor vasculature. *Lab Invest*. 2010;90(1):61-7.
31. van Lith SA, Roodink I, Verhoeff JJ, Mäkinen PI, Lappalainen JP, Ylä-Herttua S, et al. In vivo phage display screening for tumor vascular targets in glioblastoma identifies a llama nanobody against dynactin-1-p150Glued. *Oncotarget*. 2016;7(44):71594-607.
32. Lajoie JM, Katt ME, Waters EA, Herrin BR, Shusta EV. Identification of lamprey variable lymphocyte receptors that target the brain vasculature. *Sci Rep*. 2022;12(1):6044.
33. Chaves C, Do TM, Cegarra C, Roudières V, Tolou S, Thill G, et al. Non-Human Primate Blood-Brain Barrier and In Vitro Brain Endothelium: From Transcriptome to the Establishment of a New Model. *Pharmaceutics*. 2020;12(10).
34. Perrière N, Demeuse P, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood-brain barrier-specific properties. *J Neurochem*. 2005;93(2):279-89.
35. Perrière N, Yousif S, Cazaubon S, Chaverot N, Bourasset F, Cisternino S, et al. A functional in vitro model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res*. 2007;1150:1-13.
36. Inc. T. Transgenic Mice: Transforming Targeted Monoclonal Antibody (mAb) Therapeutics 2016 05/24/2019. Available from: https://trianni.com/wp-content/uploads/2016/09/Trianni-mAb-Whitepaper_e_sept12.pdf.
37. Kilpatrick KE, Wring SA, Walker DH, Macklin MD, Payne JA, Su JL, et al. Rapid development of affinity matured monoclonal antibodies using RIMMS. *Hybridoma*. 1997;16(4):381-9.
38. Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.
39. Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods*. 2008;329(1-2):112-24.
40. Ratkowsky DA, Reedy TJ. Choosing near-linear parameters in the four-parameter logistic model for radioligand and related assays. *Biometrics*. 1986;42(3):575-82.
41. Cameron B, Dabdoubi T, Berthou-Soulié L, Gagnaire M, Arnould I, Severac A, et al. Complementary epitopes and favorable developability of monoclonal anti-LAMP1 antibodies generated using two transgenic animal platforms. *PLoS One*. 2020;15(7):e0235815.
42. Geier EG, Chen EC, Webb A, Papp AC, Yee SW, Sadee W, et al. Profiling solute carrier transporters in the human blood-brain barrier. *Clin Pharmacol Ther*. 2013;94(6):636-9.
43. Suhy AM, Webb A, Papp AC, Geier EG, Sadee W. Expression and splicing of ABC and SLC transporters in the human blood-brain barrier measured with RNAseq. *Eur J Pharm Sci*. 2017;103:47-51.
44. Zhang W, Teske N, Samadi M, Sarem M, Shastri VP. Unraveling the role of β 1 integrin isoforms in cRGD-mediated uptake of nanoparticles bearing hydrophilized alkyne moieties in epithelial and endothelial cells. *Acta Biomater*. 2020;116:344-55.

45. Shusta EV, Boado RJ, Mathern GW, Pardridge WM. Vascular genomics of the human brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(3):245-52.
46. Dauchy S, Dutheil F, Weaver RJ, Chassoux F, Dumas-Duport C, Couraud PO, et al. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood-brain barrier. *J Neurochem.* 2008;107(6):1518-28.
47. Shawahna R, Uchida Y, Declèves X, Ohtsuki S, Yousif S, Dauchy S, et al. Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol Pharm.* 2011;8(4):1332-41.
48. Warren MS, Zerangue N, Woodford K, Roberts LM, Tate EH, Feng B, et al. Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacol Res.* 2009;59(6):404-13.
49. Song HW, Foreman KL, Gastfriend BD, Kuo JS, Palecek SP, Shusta EV. Transcriptomic comparison of human and mouse brain microvessels. *Sci Rep.* 2020;10(1):12358.
50. Darmanis S, Sloan SA, Zhang Y, Enge M, Caneda C, Shuer LM, et al. A survey of human brain transcriptome diversity at the single cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(23):7285-90.
51. Spaethling JM, Na YJ, Lee J, Ulyanova AV, Baltuch GH, Bell TJ, et al. Primary Cell Culture of Live Neurosurgically Resected Aged Adult Human Brain Cells and Single Cell Transcriptomics. *Cell Rep.* 2017;18(3):791-803.
52. Sade H, Baumgartner C, Huguenmatter A, Moessner E, Freskgard PO, Niewoehner J. A human blood-brain barrier transcytosis assay reveals antibody transcytosis influenced by pH-dependent receptor binding. *PLoS One.* 2014;9(4):e96340.
53. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;175(3):880-5.
54. Steinman L. The discovery of natalizumab, a potent therapeutic for multiple sclerosis. *J Cell Biol.* 2012;199(3):413-6.
55. Lee TJ, Nair M, Banasavadi-Siddegowda Y, Liu J, Nallanagulagari T, Jaime-Ramirez AC, et al. Enhancing Therapeutic Efficacy of Oncolytic Herpes Simplex Virus-1 with Integrin beta1 Blocking Antibody OS2966. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(6):1127-36.
56. Carbonell WS, DeLay M, Jahangiri A, Park CC, Aghi MK. β 1 integrin targeting potentiates antiangiogenic therapy and inhibits the growth of bevacizumab-resistant glioblastoma. *Cancer Res.* 2013;73(10):3145-54.
57. Byron A, Humphries JD, Askari JA, Craig SE, Mould AP, Humphries MJ. Anti-integrin monoclonal antibodies. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 22):4009-11.
58. Deli MA, Abraham CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol.* 2005;25(1):59-127.
59. Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *FASEB J.* 2005;19(13):1872-4.
60. Carl SM, Lindley DJ, Das D, Couraud PO, Weksler BB, Romero I, et al. ABC and SLC transporter expression and proton oligopeptide transporter (POT) mediated permeation across the human blood-brain barrier cell line, hCMEC/D3 [corrected]. *Mol Pharm.* 2010;7(4):1057-68.
61. Samaha H, Pignata A, Fousek K, Ren J, Lam FW, Stossi F, et al. A homing system targets therapeutic T cells to brain cancer. *Nature.* 2018;561(7723):331-7.
62. Williams DW, Anastos K, Morgello S, Berman JW. JAM-A and ALCAM are therapeutic targets to inhibit diapedesis across the BBB of CD14+CD16+ monocytes in HIV-infected individuals. *J Leukoc Biol.* 2015;97(2):401-12.
63. Bartoli M, Monneron A, Ladant D. Interaction of calmodulin with striatin, a WD-repeat protein present in neuronal dendritic spines. *J Biol Chem.* 1998;273(35):22248-53.

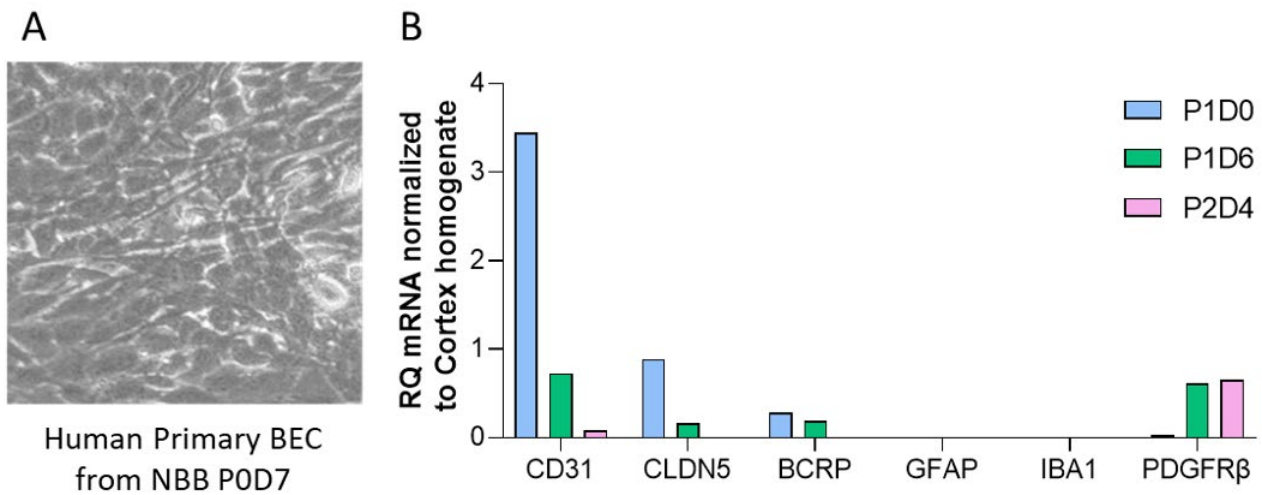
64. Gaillard S, Bartoli M, Castets F, Monneron A. Striatin, a calmodulin-dependent scaffolding protein, directly binds caveolin-1. *FEBS Lett.* 2001;508(1):49-52.
65. Gordon J, Hwang J, Carrier KJ, Jones CA, Kern QL, Moreno CS, et al. Protein phosphatase 2a (PP2A) binds within the oligomerization domain of striatin and regulates the phosphorylation and activation of the mammalian Ste20-Like kinase Mst3. *BMC Biochem.* 2011;12:54.
66. Hwang J, Pallas DC. STRIPAK complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;47:118-48.
67. Jain BP, Chauhan P, Tanti GK, Singarapu N, Ghaskadbi S, Goswami SK. Tissue specific expression of SG2NA is regulated by differential splicing, RNA editing and differential polyadenylation. *Gene.* 2015;556(2):119-26.
68. Tanti GK, Singarapu N, Muthuswami R, Goswami SK. Among the three striatin family members, SG2NA was first to arise during evolution. *Front Biosci (Schol Ed).* 2014;6:1-15.
69. Alday-Parejo B, Stupp R, Rugg C. Are Integrins Still Practicable Targets for Anti-Cancer Therapy? *Cancers (Basel).* 2019;11(7).
70. Conroy KP, Kitto LJ, Henderson NC. α v integrins: key regulators of tissue fibrosis. *Cell Tissue Res.* 2016;365(3):511-9.
71. Morshed A, Abbas AB, Hu J, Xu H. Shedding New Light on The Role of α v β 3 and α 5 β 1 Integrins in Rheumatoid Arthritis. *Molecules.* 2019;24(8).
72. Bass MD, Williamson RC, Nunan RD, Humphries JD, Byron A, Morgan MR, et al. A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through caveolin- and RhoG-regulated integrin endocytosis. *Dev Cell.* 2011;21(4):681-93.
73. Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis.* 2008;32(2):200-19.
74. Schnittert J, Bansal R, Storm G, Prakash J. Integrins in wound healing, fibrosis and tumor stroma: High potential targets for therapeutics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;129:37-53.
75. Moreno-Layseca P, Icha J, Hamidi H, Ivaska J. Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat Cell Biol.* 2019;21(2):122-32.
76. Jiang X, Sha X, Xin H, Xu X, Gu J, Xia W, et al. Integrin-facilitated transcytosis for enhanced penetration of advanced gliomas by poly(trimethylene carbonate)-based nanoparticles encapsulating paclitaxel. *Biomaterials.* 2013;34(12):2969-79.
77. Kang S, Lee S, Park S. iRGD Peptide as a Tumor-Penetrating Enhancer for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Polymers (Basel).* 2020;12(9).
78. Li Z, Huang P, Zhang X, Lin J, Yang S, Liu B, et al. RGD-conjugated dendrimer-modified gold nanorods for in vivo tumor targeting and photothermal therapy. *Mol Pharm.* 2010;7(1):94-104.
79. Kankaanpää P, Tiitta S, Bergman L, Puranen AB, von Haartman E, Lindén M, et al. Cellular recognition and macropinocytosis-like internalization of nanoparticles targeted to integrin α 2 β 1. *Nanoscale.* 2015;7(42):17889-901.
80. Goutayer M, Dufort S, Josserand V, Royère A, Heinrich E, Vinet F, et al. Tumor targeting of functionalized lipid nanoparticles: assessment by in vivo fluorescence imaging. *Eur J Pharm Biopharm.* 2010;75(2):137-47.
81. Blystone SD, Graham IL, Lindberg FP, Brown EJ. Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1. *J Cell Biol.* 1994;127(4):1129-37.
82. Magnussen SN, Toraskar J, Wilhelm I, Hasko J, Figenschau SL, Molnar J, et al. Nephronectin promotes breast cancer brain metastatic colonization via its integrin-binding domains. *Sci Rep.* 2020;10(1):12237.
83. Malin D, Strelakova E, Petrovic V, Deal AM, Al Ahmad A, Adamo B, et al. α B-crystallin: a novel regulator of breast cancer metastasis to the brain. *Clin Cancer Res.* 2014;20(1):56-67.

84. Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cell Microbiol.* 1999;1(2):101-17.
85. Hauck CR, Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(1):5-11.
86. Ley K, Rivera-Nieves J, Sandborn WJ, Shattil S. Integrin-based therapeutics: biological basis, clinical use and new drugs. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(3):173-83.
87. Ragnarsson EG, Schoultz I, Gullberg E, Carlsson AH, Tafazoli F, Lerm M, et al. *Yersinia pseudotuberculosis* induces transcytosis of nanoparticles across human intestinal villus epithelium via invasin-dependent macropinocytosis. *Lab Invest.* 2008;88(11):1215-26.
88. Isberg RR, Barnes P. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J Cell Sci.* 2001;114(Pt 1):21-8.
89. Isberg RR, Hamburger Z, Dersch P. Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect.* 2000;2(7):793-801.
90. Isberg RR, Leong JM. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* 1990;60(5):861-71.
91. Plançon L, Du Merle L, Le Fric S, Gounon P, Jouve M, Guignot J, et al. Recognition of the cellular beta1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of afa-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. *Cell Microbiol.* 2003;5(10):681-93.
92. Guignot J, Bernet-Camard MF, Poüs C, Plançon L, Le Bouguenec C, Servin AL. Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 into human epithelial cells: evidence for $\alpha 5\beta 1$ integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules. *Infect Immun.* 2001;69(3):1856-68.
93. Schwarz-Linek U, Höök M, Potts JR. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol Microbiol.* 2004;52(3):631-41.
94. Banerjee A, Kim BJ, Carmona EM, Cutting AS, Gurney MA, Carlos C, et al. Bacterial Pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration. *Nat Commun.* 2011;2:462.
95. Coureuil M, Lécuyer H, Bourdoulous S, Nassif X. A journey into the brain: insight into how bacterial pathogens cross blood-brain barriers. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15(3):149-59.
96. Chakraborty S, ValiyaVeettil M, Sadagopan S, Paudel N, Chandran B. c-Cbl-mediated selective virus-receptor translocations into lipid rafts regulate productive Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in endothelial cells. *J Virol.* 2011;85(23):12410-30.
97. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. $\alpha V\beta 5$ integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med.* 1999;5(1):78-82.
98. Ivanenkov VV, Menon AG. Peptide-mediated transcytosis of phage display vectors in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(1):251-7.
99. Staquicini DI, Barbu EM, Zemans RL, Dray BK, Staquicini FI, Dogra P, et al. Targeted Phage Display-based Pulmonary Vaccination in Mice and Non-human Primates. *Med (N Y).* 2021;2(3):321-42.
100. Su CW, Yen CS, Chiang CS, Hsu CH, Chen SY. Multistage Continuous Targeting with Quantitatively Controlled Peptides on Chitosan-Lipid Nanoparticles with Multicore-Shell Nanoarchitecture for Enhanced Orally Administrated Anticancer In Vitro and In Vivo. *Macromol Biosci.* 2017;17(2).
101. Liu C, Shan W, Liu M, Zhu X, Xu J, Xu Y, et al. A novel ligand conjugated nanoparticles for oral insulin delivery. *Drug Deliv.* 2016;23(6):2015-25.
102. Xu Y, Xu J, Shan W, Liu M, Cui Y, Li L, et al. The transport mechanism of integrin $\alpha\beta 3$ receptor targeting nanoparticles in Caco-2 cells. *Int J Pharm.* 2016;500(1-2):42-53.

103. Kassa EG, Zlotkin-Rivkin E, Friedman G, Ramachandran RP, Melamed-Book N, Weiss AM, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* remodels host endosomes to promote endocytic turnover and breakdown of surface polarity. *PLoS Pathog.* 2019;15(6):e1007851.
104. Alfsen A, Yu H, Magérus-Chatinet A, Schmitt A, Bomsel M. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol Biol Cell.* 2005;16(9):4267-79.
105. Deshayes de Cambronne R, Fouet A, Picart A, Bourrel AS, Anjou C, Bouvier G, et al. CC17 group B *Streptococcus* exploits integrins for neonatal meningitis development. *J Clin Invest.* 2021;131(5).
106. Ruan S, Xiao W, Hu C, Zhang H, Rao J, Wang S, et al. Ligand-Mediated and Enzyme-Directed Precise Targeting and Retention for the Enhanced Treatment of Glioblastoma. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(24):20348-60.
107. Wei X, Gao J, Zhan C, Xie C, Chai Z, Ran D, et al. Liposome-based glioma targeted drug delivery enabled by stable peptide ligands. *J Control Release.* 2015;218:13-21.
108. Selewski DT, Shah GV, Segal BM, Rajdev PA, Mukherji SK. Natalizumab (Tysabri). *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31(9):1588-90.
109. Nieri P, Donadio E, Rossi S, Adinolfi B, Podesta A. Antibodies for therapeutic uses and the evolution of biotechniques. *Curr Med Chem.* 2009;16(6):753-79.
110. Pantano F, Croset M, Driouch K, Bednarz-Knoll N, Iuliani M, Ribelli G, et al. Integrin alpha5 in human breast cancer is a mediator of bone metastasis and a therapeutic target for the treatment of osteolytic lesions. *Oncogene.* 2021;40(7):1284-99.
111. Li XL, Guo Y, Zhang YS, Zhao Y, Zhang L. Effects of Integrin β 1 on behavior and neurovascular regeneration in rats with cerebral ischemia-reperfusion injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(8):3487-94.
112. Ayloo S, Lazo CG, Sun S, Zhang W, Cui B, Gu C. Pericyte-to-endothelial cell signaling via vitronectin-integrin regulates blood-CNS barrier. *Neuron.* 2022.
113. Engelhardt B. β 1-integrin/matrix interactions support blood-brain barrier integrity. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(10):1969-71.
114. Osada T, Gu YH, Kanazawa M, Tsubota Y, Hawkins BT, Spatz M, et al. Interendothelial claudin-5 expression depends on cerebral endothelial cell-matrix adhesion by β (1)-integrins. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011;31(10):1972-85.
115. Izawa Y, Gu YH, Osada T, Kanazawa M, Hawkins BT, Koziol JA, et al. β 1-integrin-matrix interactions modulate cerebral microvessel endothelial cell tight junction expression and permeability. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2018;38(4):641-58.
116. Roberts J, de Hoog L, Bix GJ. Mice deficient in endothelial α 5 integrin are profoundly resistant to experimental ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(1):85-96.
117. Edwards DN, Bix GJ. Roles of blood-brain barrier integrins and extracellular matrix in stroke. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2019;316(2):C252-c63.
118. Carbonell WS, inventor; Oncosynergy Inc, assignee. Anti-integrin beta-1 antibody compositions and methods of use thereof. United States 2018-11-01 2018-11-01.
119. Cox D, Brennan M, Moran N. Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(10):804-20.
120. Tashiro K, Monji A, Yoshida I, Hayashi Y, Matsuda K, Tashiro N, et al. An IKLLI-containing peptide derived from the laminin alpha1 chain mediating heparin-binding, cell adhesion, neurite outgrowth and proliferation, represents a binding site for integrin alpha3beta1 and heparan sulphate proteoglycan. *Biochem J.* 1999;340 (Pt 1)(Pt 1):119-26.
121. van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001;305(3):285-98.

122. Conforti G, Dominguez-Jimenez C, Zanetti A, Gimbrone MA, Jr., Cremona O, Marchisio PC, et al. Human endothelial cells express integrin receptors on the luminal aspect of their membrane. *Blood*. 1992;80(2):437-46.
123. Saubaméa B, Cochois-Guégan V, Cisternino S, Scherrmann JM. Heterogeneity in the rat brain vasculature revealed by quantitative confocal analysis of endothelial barrier antigen and P-glycoprotein expression. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(1):81-92.
124. Omid Y, Campbell L, Barar J, Connell D, Akhtar S, Gumbleton M. Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res*. 2003;990(1-2):95-112.
125. Menaceur C, Gosselet F, Fenart L, Saint-Pol J. The Blood-Brain Barrier, an Evolving Concept Based on Technological Advances and Cell-Cell Communications. *Cells*. 2021;11(1).
126. Stanimirovic DB, Bani-Yaghoub M, Perkins M, Haqqani AS. Blood-brain barrier models: in vitro to in vivo translation in preclinical development of CNS-targeting biotherapeutics. *Expert Opin Drug Discov*. 2015;10(2):141-55.
127. Haqqani AS, Delaney CE, Brunette E, Baumann E, Farrington GK, Sisk W, et al. Endosomal trafficking regulates receptor-mediated transcytosis of antibodies across the blood brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018;38(4):727-40.
128. Bartik P, Maglott A, Entlicher G, Vestweber D, Takeda K, Martin S, et al. Detection of a hypersialylated beta1 integrin endogenously expressed in the human astrocytoma cell line A172. *Int J Oncol*. 2008;32(5):1021-31.
129. Hervé F, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *Aaps j*. 2008;10(3):455-72.
130. Peterson RJ, Koval M. Above the Matrix: Functional Roles for Apically Localized Integrins. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:699407.
131. Chun HB, Scott M, Niessen S, Hoover H, Baird A, Yates J, 3rd, et al. The proteome of mouse brain microvessel membranes and basal lamina. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(12):2267-81.
132. Baik AD, Calafati PT, Aaron NA, Mehra A, Moller-Tank S, Miloscio L, et al. Targeted delivery of acid alpha-glucosidase corrects skeletal muscle phenotypes in Pompe disease mice. *bioRxiv*. 2020:2020.04.22.051672.
133. Xia W, Springer TA. Metal ion and ligand binding of integrin $\alpha 5\beta 1$. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(50):17863-8.
134. Schaffner F, Ray AM, Dontenwill M. Integrin $\alpha 5\beta 1$, the Fibronectin Receptor, as a Pertinent Therapeutic Target in Solid Tumors. *Cancers (Basel)*. 2013;5(1):27-47.
135. Campbell MR, Zhang H, Ziaee S, Ruiz-Saenz A, Gulizia N, Oeffinger J, et al. Effective treatment of HER2-amplified breast cancer by targeting HER3 and $\beta 1$ integrin. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;155(3):431-40.
136. Milner R, Campbell IL. Developmental regulation of beta1 integrins during angiogenesis in the central nervous system. *Mol Cell Neurosci*. 2002;20(4):616-26.
137. Milner R, Campbell IL. The integrin family of cell adhesion molecules has multiple functions within the CNS. *J Neurosci Res*. 2002;69(3):286-91.
138. Bax DV, Bernard SE, Lomas A, Morgan A, Humphries J, Shuttleworth CA, et al. Cell adhesion to fibrillin-1 molecules and microfibrils is mediated by alpha 5 beta 1 and alpha v beta 3 integrins. *J Biol Chem*. 2003;278(36):34605-16.

Supporting Information



S1 Fig: Human primary BMEC production. (A) Human primary brain cells isolated from NBB autopsy cases at passage 0 after 7 days in culture. Cells were observed 100X magnification with inverted microscope (B) Gene Relative Quantity (RQ) in human primary BMECs characterized by qPCR. Data were normalized to data from cortex homogenate

Parameter	Antibody	N	Mean	95% CI		p-value	Adj. p-value
				Lower	Upper		
PCR in NHP BMECs	Anti-TFRC mAb	3	0.326	0.210	0.442	0.0070	0.0210
	1E7	3	0.241	0.186	0.295	0.0040	0.0183
	3B8	3	0.353	0.292	0.415	0.0016	0.0112
	3C5	3	0.339	0.288	0.390	0.0012	0.0098
	4D2	3	0.250	0.224	0.276	0.0008	0.0073
	4F2	9	0.457	0.429	0.485	<.0001	<.0001
	6A10	3	0.208	0.094	0.322	0.0275	0.0550
	6C7	3	0.081	0.021	0.141	0.8460	0.8460
	8C10	3	0.254	0.197	0.311	0.0037	0.0183
	8C12	3	0.442	0.355	0.528	0.0017	0.0112
PCR in hCMEC/cells	Anti-TFRC mAb	18	0.086	0.074	0.098	0.9896	0.9896
	1E7	3	0.241	0.213	0.269	0.0011	0.0074
	3B8	3	0.337	0.277	0.396	0.0017	0.0103
	3C5	3	0.361	0.326	0.397	0.0005	0.0039
	4F2	3	0.515	0.481	0.550	0.0002	0.0020
	6A10	3	0.258	0.150	0.367	0.0122	0.0357
	6C7	6	0.294	0.232	0.356	0.0002	0.0024
	6D6	3	0.390	0.361	0.420	0.0003	0.0025
	6F5	3	0.241	0.155	0.327	0.0097	0.0357
	8C10	3	0.302	0.184	0.419	0.0089	0.0357
9F4	3	0.351	0.233	0.468	0.0058	0.0291	

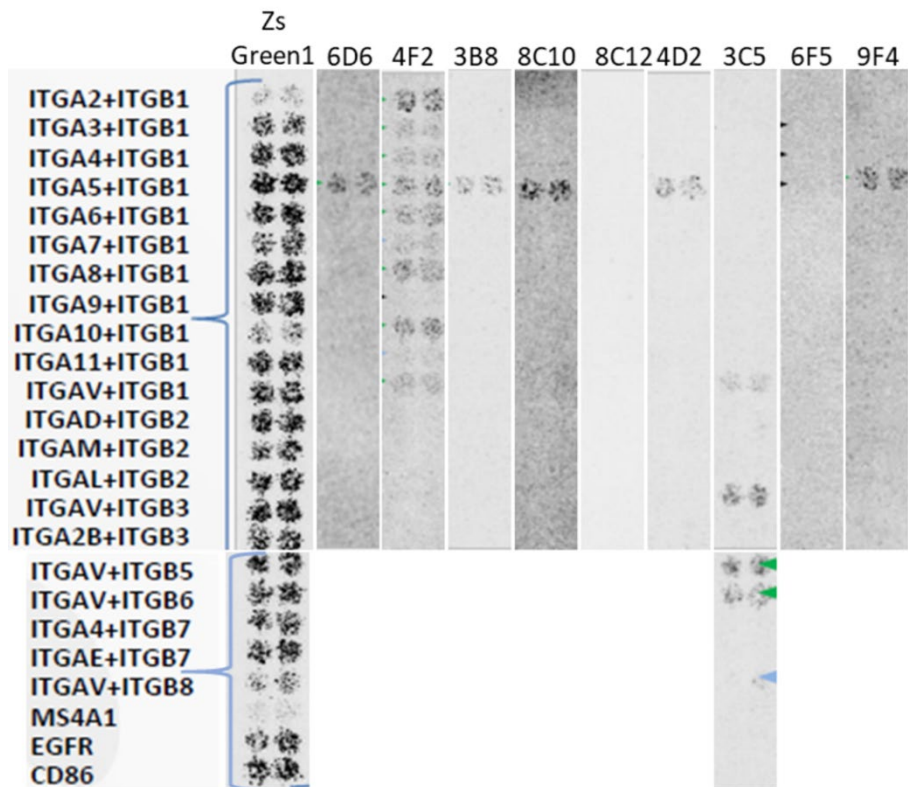
Adjusted P-values using Bonferonni Holm correction
Significant adjusted p-values at 2.5% level are highlighted in bold

S2 Table: Statistical results for pulse chase ratio

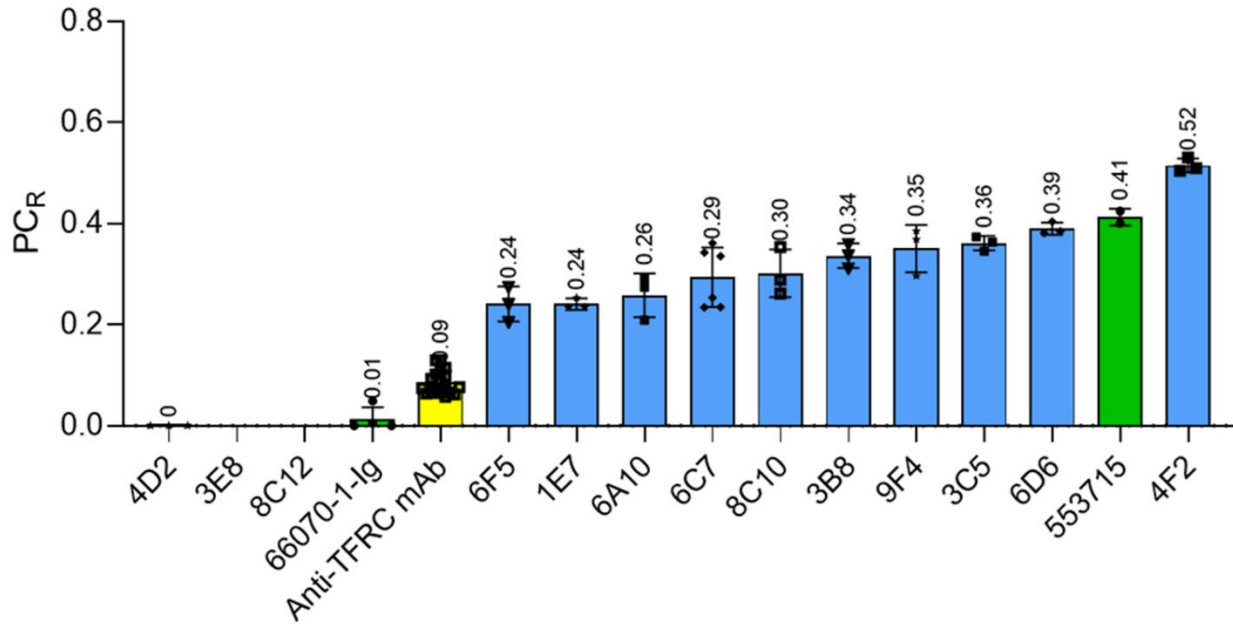
Parameter	Antibody comparison vs NC	N	95% CI		Comparison versus NC		
			Harmonic mean	Lower	Upper	p-value	Dunnett adj. p-value
Papp test antibody/control antibody	NC	3	1.056	0.980	1.145	-	-
	Anti-TFRC mAb	6	11.713	6.883	39.276	<.0001	<.0001
	9F4	4	5.266	3.799	8.584	<.0001	<.0001
	8C10	4	3.707	2.914	5.092	<.0001	<.0001
	6D6	4	3.991	3.087	5.643	<.0001	<.0001
	6C7	3	4.685	3.354	7.769	<.0001	<.0001
	4F2	5	8.735	5.552	20.473	<.0001	<.0001
	4D2	4	6.138	4.232	11.167	<.0001	<.0001
	3E8	4	1.135	1.047	1.238	0.0735	0.3023
	3B8	4	5.773	4.055	10.017	<.0001	<.0001

Inverse transformation was applied to the data before analysis
Significant adjusted p-values at 2.5% level are highlighted in bold

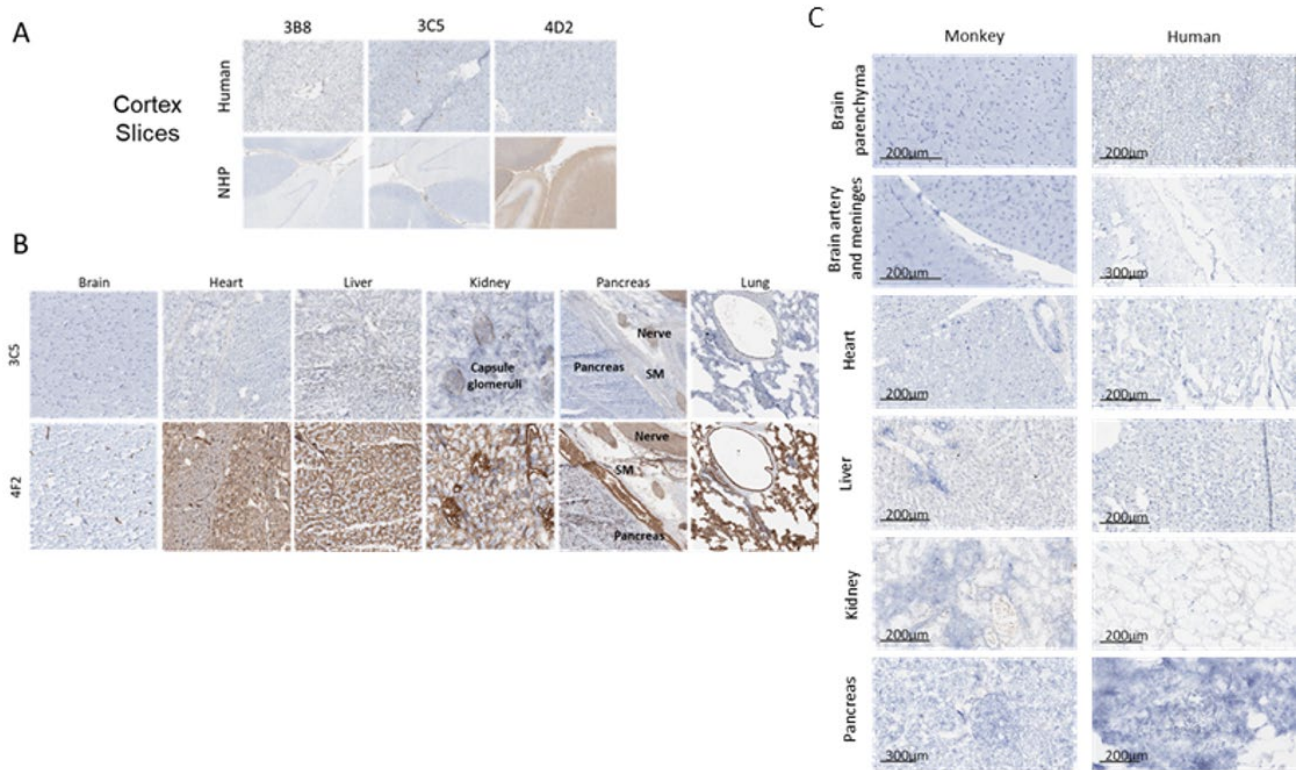
S3 Table: Statistical results for transcytosis ratio



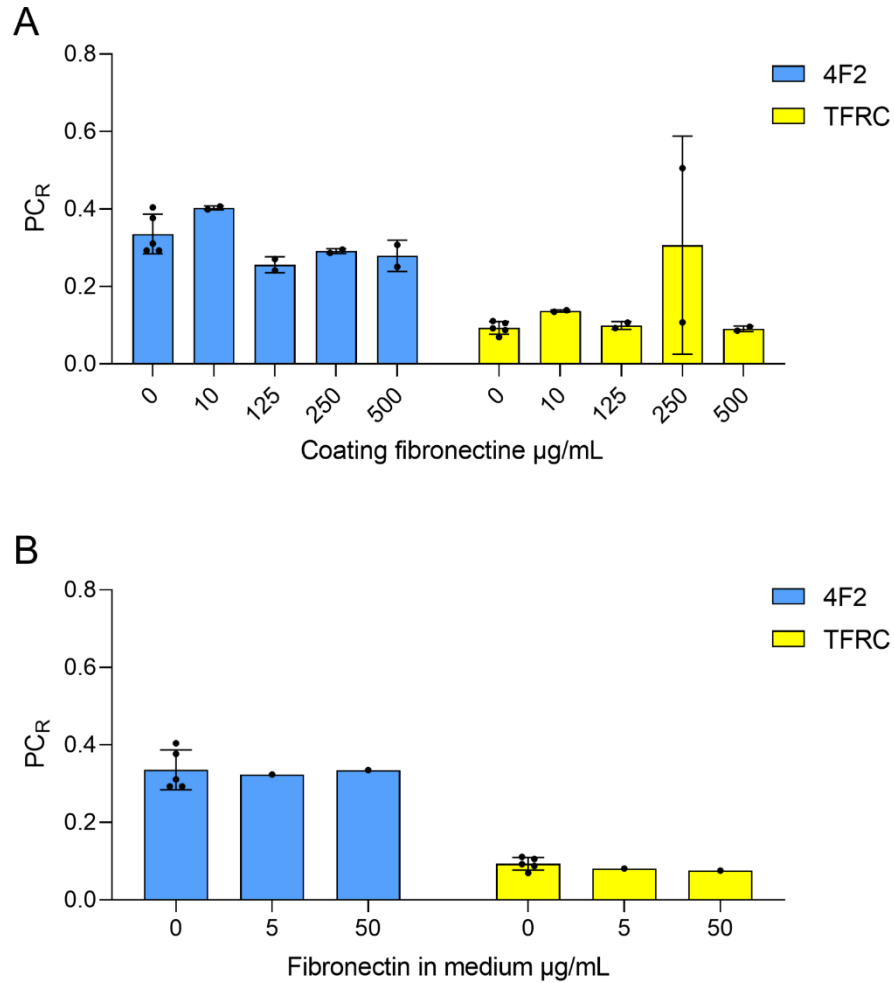
S4 Fig: Screening of Retrogenix™/Charles River integrin heterodimers. Antibodies were loaded at 5µg/mL and bound to different integrin heterodimers spotted on a slide. The signal was detected by HRP coloration.



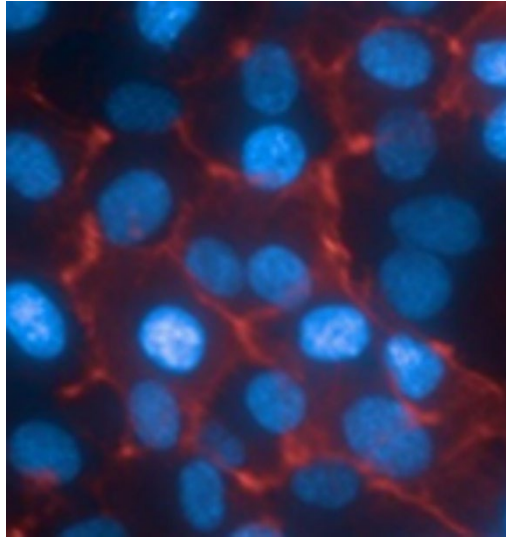
S5 Fig: Result of mouse/human cross-reactive commercial anti- β 1 integrin antibodies 66070-1-Ig and 553715 evaluated in *pulse-chase* assay with hCMEC/D3 cells. Internal anti-integrin antibodies are represented with blue bars, commercial anti-integrin antibodies are represented with green bars, anti-TFRC antibody is represented with yellow bar. Each point represents one Transwell®



S6 Fig: IHC in frozen brain and peripheral tissue slices. Immunostaining was done with DABMap™ chromogenic detection kit where brown color is a binding signal. A: human and NHP frozen cortex slides incubated with three different anti-integrin antibodies B: human frozen brain and peripheral tissue slices incubated with 3C5 or 4F2. C: Isotype control of monkey and human slices from Fig 5. Blue color corresponds to the hematoxylin counterstaining to visualize the cells and their nuclei.



S7 Fig: Fibronectin effect on 4F2 and anti-TFRC PCR in “pulse-chase” assay in hCMEC/D3 cells. 4F2 is represented with blue bars and anti-TFRC is represented with yellow bars. A: different concentrations of fibronectin were coated on the Transwell®. B: different concentrations of fibronectin were added to the culture medium. Each point represents one Transwell®



S8 Fig: 4F2 staining in hCMEC/D3 4F2 target cellular localization was visualized by fluorescence microscopy at 200X in hCMEC/D3. Cultured cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min, at RT, and blocked in Odyssey LiCor Blocking Buffer. 4F2 antibody was incubated overnight at 4°C and anti-human secondary antibody conjugated with Alexa 594 nm and Hoechst 33432 for nuclei staining was subsequently used for 2h at RT . 4F2 target is visualized in red and nuclei in blue.

clone	proteine pl	HC pl	LC pl
4F2	7,1	7,9	5,3
6F5	8,05	8,3	7,1
8C10	7,95	8,2	7,1
3B8	8,15	8,3	7,7
3C5	7,95	8,05	7,7
4D2	7,85	7,9	7,7
6D6	7,85	8,3	5,9
8C12	7,7	8,05	6,5
9F4	7,85	8,2	6,5

S9 Table: Total protein, Heavy chain and Light chain pl calculated for test antibodies

4 Discussion Générale

4.1 Objectifs

Les travaux expérimentaux décrits dans ce manuscrit avaient pour objectif commun de trouver de nouveaux récepteurs capables de faire de la transcytose à travers la BHE afin de pouvoir augmenter l'exposition cérébrale de biothérapeutiques et notamment des anticorps. Nous avons utilisé deux stratégies pour rechercher de nouveaux mécanismes. Une analyse transcriptomique différentielle de cellules endothéliales primaires de cerveau, poumon et foie et une immunisation de souris humanisées avec des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales issues de cerveau de macaques. Pour cela, il nous fallait un accès à une quantité importante de cellules endothéliales primaires de cerveau d'une part pour notre stratégie d'immunisation et d'autre part pour développer des modèles *in vitro* de qualité.

4.2 Cellules endothéliales microvasculaires cérébrales primaires et modèles de BHE *in vitro*

L'isolement de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines est difficile à cause de l'accessibilité aux échantillons cérébraux humains frais. Nous avons obtenu des échantillons de deux sources différentes (NeuroBrainBiobank et Fidelis) provenant de donneurs décédés. Dans les deux cas, les cellules obtenues n'avaient pas le phénotype endothélial attendu mais étaient ou évoluaient vers des péricytes en culture. Le protocole peut être remis en question. Cependant ce protocole a été utilisé et validé pour la production de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de primates (96) et de souris avec le bon phénotype. On peut donc s'interroger sur la provenance de l'échantillon de départ. En effet, les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines utilisées par Brainplotting™, que nous avons caractérisées, ont montré un phénotype endothélial robuste dans le temps. Le protocole d'isolement des cellules est identique au nôtre (91,324). La différence majeure est que les échantillons de cerveaux humains sont prélevés lors de résections de chirurgie donc sur des donneurs vivants.

Nous avons utilisé les cellules hCMEC/D3 (93) qui est une lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines immortalisées. Ces cellules sont faciles à entretenir et sont disponibles en quantité importante. L'inconvénient est le manque de jonctions serrées qui a pour conséquence un fort passage paracellulaire (330).

Nous avons essayé de développer des modèles de BHE *in vitro* souris mais le rendement de production des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de souris est trop faible pour être exploité. Nous n'avons pas poursuivi la mise en place de ces modèles.

Nous avons établi des modèles de BHE *in vitro* à partir de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de primates (96). Les cellules sont isolées à partir de microvaisseaux extraits de cerveaux de singes frais. Les cellules sont cultivées en présence de puromycine pour enrichir la culture en cellules endothéliales (91) en éliminant les cellules astrocytaires et péricytaires. Les cellules ont été caractérisées au cours de la culture. Nous isolons et amplifions les cellules avant de les congeler. Ensuite nous les décongelons au fur et à mesure des besoins. Nous les avons caractérisées à plusieurs étapes de la culture pour s'assurer de leur phénotype au moment de leur utilisation. En effet, il a été démontré dans des modèles de rongeurs, la régulation à la baisse de certains transporteurs ou protéines de jonctions serrées (92,113,225,344). Dans notre modèle, après un passage, les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de primates gardent une bonne expression des protéines de jonctions serrées telles que CLDN5, OCLN, JAM. Nous avons également montré que les mesures de TEER sont améliorées par la présence d'astrocytes dans le fond du dispositif de Transwell®. Nous avons caractérisé les cellules par RNAseq et nous avons trouvé que les transporteurs ABCG2, ABCB1 et ABCC4 sont les plus abondants chez le primate et que cette expression est maintenue en culture. Cela soutient les résultats d'études précédentes (207,248,257). Nous avons également identifié les transporteurs SLC les plus abondants chez le primate : SLC2A1, SLC7A5, SLC7A1, SLC3A2, SLCO2B1 et SLC38A5. Ce qui confirme les études précédentes (207,210,225,296). L'expression de ces transporteurs reste stable *in vitro*, excepté pour SLC7A5 et SLC38A5, ce qui pourrait compromettre des études de LAT1 sur ce modèle. Dans cette étude nous avons comparé le transcriptome des cellules obtenues à partir de différentes régions du cerveau de primate ce qui n'avait jamais été fait auparavant. Nous avons comparé les cellules du cervelet, cortex, hippocampe, striatum et tronc cérébral. Nos résultats montrent une structure plutôt homogène de la BHE quel que soit la région du cerveau d'origine des cellules.

Nous avons utilisé deux types de cellules pour la mise en place de modèles de BHE *in vitro* : les hCMEC/D3 et les cellules endothéliales microvasculaires cérébrales primaires de primates.

Nous avons mis en place le modèle de « *pulse-chase* » (195) qui utilise les hCMEC/D3 en s'affranchissant du passage paracellulaire. Ce modèle sélectionne les anticorps qui se lient aux cellules et qui sont relargués dans le compartiment basolatéral. Nous avons également mis en place le modèle de transcytose classique (96,107,109,112) où la perméabilité apparente d'un anticorps cible est mesurée dans le même Transwell® qu'un anticorps contrôle. Cet anticorps est le garant de l'étanchéité du Transwell®. Cela permet de contrôler qu'il n'y a pas de passage paracellulaire possible lors de l'expérience. Ce passage pourrait être lié à un défaut du tapis cellulaire, à une désorganisation des jonctions serrées ou à une diminution de l'expression des protéines de jonctions serrées liée à la culture ou à l'incubation des cellules avec les anticorps testés. Ces

modèles nous donnent une indication de transport relative et permettent de classer les anticorps les uns par rapport aux autres. Il est difficile de comparer les résultats obtenus d'un même anticorps dans des modèles différents. En effet, la qualité des modèles et leurs caractéristiques intrinsèques sont très dépendantes des cellules utilisées (notamment de leur phénotype et de l'espèce) (121). Il y a des variations d'expressions protéiques entre espèces et certaines seront à privilégier en fonction des cibles étudiées (258).

Les modèles de BHE *in vitro* en Transwell® sont les plus simples et les moins coûteux à développer. Cependant, ces modèles statiques ne prennent pas en compte la contrainte de cisaillement liée au flux sanguin et subie par les cellules dans les microvaisseaux *in vivo* (34,112,135). Nous avons donc commencé à implémenter le modèle dynamique de Mimetas (133,134). Nous l'avons mis en place avec les cellules hCMEC/D3 en espérant améliorer le phénotype endothélial microvasculaire cérébral (130). Ce modèle semble imperméable à un anticorps contrôle qui ne paraît pas transporté à travers les cellules hCMEC/D3 de façon active. Les étapes suivantes vont être une étude de transport avec un anticorps cible et un anticorps contrôle afin de mesurer et comparer les perméabilités apparentes de chacun. Il faudra également évaluer si le modèle peut être mis en place facilement avec des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales primaires de primates et éventuellement en co-culture ou tri-culture (133).

Les modèles de BHE *in vitro* peuvent poser plusieurs problèmes. Premièrement, le but étant de faire traverser des biothérapeutiques pour cibler des pathologies dans le cerveau (197,232), il faudra envisager des modèles *in vitro* de BHE pathologiques. C'est un des objectifs de l'IMI IM2PACT à laquelle nous participons. L'utilisation de modèles animaux de pathologies est souvent difficile, en particulier dans le domaine des neurosciences (345,346). Le niveau de protéine du récepteur qui médie la transcytose et la fonction d'internalisation doivent être préservés dans la maladie ciblée. Un exemple a été vérifié avec TFRC pour les neuropathologies A β en utilisant à la fois des modèles amyloïdes transgéniques de souris et des échantillons post-mortem de cerveau humain (347). Deuxièmement, l'utilité des modèles BHE *in vitro* n'est avérée que s'ils permettent une prédiction des modèles *in vivo*. Or, si la transposition des résultats des modèles de BHE *in vitro* se fait relativement bien avec les petites molécules (339,340), elle est beaucoup plus complexe avec les biothérapeutiques (341).

Quelques récepteurs comme le TFRC ou l'InsR sont utilisés aujourd'hui pour transporter par transcytose des protéines dans le cerveau (348). Ces récepteurs sont capables de faire traverser la BHE à des anticorps qui les reconnaissent. Notre objectif était d'identifier de nouveaux récepteurs capables de faire de la transcytose avec des anticorps. Nous avons utilisé deux stratégies distinctes

afin de trouver un nouveau récepteur spécifique du cerveau qui soit capable de médier la transcytose à travers la BHE.

4.3 Stratégie transcriptomique

La stratégie décrite ici découle de résultats établis par l'IMI COMPACT. Des études transcriptomiques de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines ainsi que des analyses protéomiques ont été réalisées pour sélectionner des transcrits enrichis dans le cerveau comparé à la périphérie (comme le foie, le poumon et le rein). Une analyse des séquences a permis de sélectionner des protéines membranaires avec une forte homologie humain/souris. Cette analyse a abouti à plusieurs cibles dont ITM2A (349). Le COMPACT a développé des anticorps monoclonaux pour l'étude de cette cible. Identifiés par le criblage d'une banque de phage affichant des fragments scFv d'anticorps, les anticorps sont cross-réactifs humain/souris (243). Après des expériences d'internalisation dans des lignées stables, surexprimant ITM2A humain et souris, que nous avons générées, nous avons voulu tester nos anticorps dans des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales. Nous nous sommes appuyés sur une publication qui montre une détection de la protéine ITM2A par Western Blot (349). Nous n'avons pas pu reproduire ces résultats et identifier la protéine ITM2A endogène dans nos échantillons. Malgré une détection de la protéine par spectrométrie de masse, les anticorps anti-ITM2A n'ont pas été transportés dans le modèle de BHE *in vitro* de Brainplotting™. Vu la complexité des phénomènes biologiques et pharmacodynamiques, et la transposition des modèles de BHE *in vitro* au modèles *in vivo* n'étant pas toujours acquise (341), nous avons préféré tester cet anticorps dans un modèle de souris *in vivo*. L'anticorps anti-ITM2A injecté en périphérie n'a pas été retrouvé dans le cerveau de souris, ce qui a finalement confirmé les résultats de transport *in vitro* (350). Pour finaliser les conclusions de notre étude, des expériences d'immunohistochimie permettraient de confirmer la présence d'ITM2A et de vérifier sa localisation sur les microvaisseaux dans des coupes de cerveaux de souris. Il serait intéressant de vérifier si nous observons une colocalisation avec la P-gp. Cela signifierait une expression d'ITM2A luminale et pourrait répondre à ce critère de cible pour le transport vers le cerveau. A ce stade de notre étude, nous ne savons pas si le défaut d'exposition des anticorps anti-ITM2A dans le cerveau est lié au manque d'expression de la protéine cible, à une accumulation dans les cellules endothéliales ou un recyclage dans le plasma lié à une expression d'ITM2A seulement luminale ou enfin aux propriétés intrinsèques des anticorps générés contre ITM2A.

Dans l'étude du COMPACT, ITM2A n'avait pas été retrouvé dans les études de protéomique. Nous avons interprété cela par le fait qu'il avait fallu faire un passage supplémentaire des cellules pour obtenir suffisamment de protéines et que ce passage avait pu diminuer l'expression des protéines importantes pour la barrière comme c'est parfois le cas (96,113,121,225,226,351). Nos résultats

illustrent qu'il n'y a pas toujours de corrélation entre la quantité de transcrite et la quantité de protéines associées (242,352). ITM2A est sorti comme gène enrichi dans le cerveau dans plusieurs études transcriptomiques (18,223,243,351) et dans l'analyse faite par MacKenzie donnant lieu à la base de données BRETIGEA (221). Mais il n'est pour l'instant pas décrit dans une étude protéomique de recherche de cibles enrichies dans le cerveau.

Notre travail a permis de générer et valider des outils pour l'étude d'ITM2A. L'anticorps anti-ITM2A monoclonal, cross-réactif humain/souris pourra être utile afin d'étudier la fonctionnalité de cette cible. Nos résultats permettent d'alerter la communauté scientifique sur la faible abondance de la protéine ITM2A dans le cerveau. C'est une des propriétés nécessaires à la validation d'un récepteur médiant la transcytose (163,201) auquel cette cible ne répond pas. De plus les expériences *in vivo* chez la souris n'ayant pas démontré la capacité de notre anticorps à traverser la BHE, ITM2A n'est probablement pas une bonne cible pour médier la transcytose.

4.4 Stratégie immunisation

Cette stratégie a consisté à immuniser des souris avec des cellules endothéliales microvasculaires cérébrales de primates. Les anticorps obtenus ont été criblés et sélectionnés sur leur capacité à se lier et à s'internaliser dans les cellules de primates et humaines. Les anticorps se liant aux cellules hCMEC/D3 ont ensuite été évalués dans trois modèles de BHE *in vitro*. La déconvolution de ces anticorps a montré qu'ils étaient en majorité dirigés contre des intégrines $\beta 1$ avec deux d'entre eux reconnaissant Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) et la Striatine 3. Ces deux dernières cibles n'ont pas été poursuivies pour les raisons suivantes :

ALCAM ou CD166 joue un rôle majeur dans l'infiltration des tumeurs cérébrales par les lymphocytes T (353). Il a été rapporté que des anticorps anti-ALCAM inhibent la diapédèse des monocytes à travers la BHE (354).

La striatine 3 (SG2NA) est une protéine de 780 acides aminés. Les striatines se localisent dans plusieurs compartiments cellulaires, la membrane plasmique, les mitochondries, le réticulum endoplasmique, le noyau et le lysosome. Cette protéine est essentiellement intracellulaire et n'a pas de domaine extracellulaire (355). Par ailleurs cette cible n'a pas été validée par une technique orthogonale de recherche de cible (Retrogenix).

Les intégrines sont des protéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire (356). Elles sont ubiquitaires. Nous avons analysé la littérature et trouvé plusieurs éléments qui montrent que les intégrines sont impliquées dans des phénomènes d'internalisation de nanoparticules (325,357–360), de billes (361), de phages (362,363) ou de cellules (315,364). Les bactéries (314,315,364–372) et les virus (313,373) peuvent être internalisés

par des mécanismes impliquant les intégrines. La transcytose de cellules (374,375), de nanoparticules (376–378), de bactéries (379) ou de virus (380) est aussi parfois associée dans la littérature avec les intégrines mais il s'agit essentiellement de cellules épithéliales. Seuls cinq articles (318,362,363,381,382) rapportent des phénomènes de transcytose via les intégrines dans les cellules endothéliales. Mais nous n'avons trouvé aucun précédent d'anticorps anti-intégrines faisant de la transcytose à travers les cellules endothéliales. On trouve sur le marché quelques anticorps monoclonaux reconnaissant des intégrines : Natalizumab (383) ($\alpha 4\beta 1$, Sclérose multiple), Abciximab ($\alpha IIb\beta 3a$, Thrombose) et Efalizumab ($\alpha L\beta 2$, Psoriasis) (384). Quelques-uns sont à divers stades de développement clinique. Trois anticorps anti- $\beta 1$ OS296661 (anti- $\beta 1$), MINT1526A62 (anti- $\alpha 5\beta 1$) et M100 (volociximab) (anti- $\alpha 5\beta 1$) actuellement en développement en oncologie sont pertinents pour nos études. Nous avons pu en obtenir OS2966 par production en interne.

Nous avons essayé d'analyser la douzaine d'anticorps anti-intégrines obtenus ainsi qu'une sélection d'anticorps anti-intégrine $\beta 1$ commerciaux ou décrits, pour essayer de comprendre le facteur qui permettait la transcytose : la liaison spécifique à un ou plusieurs monomères ou hétérodimères n'a pas permis de rationaliser les résultats. Nous savons que les intégrines ont des signalisations et des fonctions différentes selon l'état d'activation dans lequel elles se trouvent (385,386). Certains anticorps peuvent reconnaître un état d'une intégrine mais pas obligatoirement un autre état de la même intégrine (387). Nos études n'ont pas permis d'associer la transcytose à un état particulier d'activation de l'intégrine. À ce jour, aucun anticorps anti-intégrine n'a montré une exposition accrue au cerveau ou une capacité de libération cérébrale. Nos travaux mettent en évidence une série d'anticorps qui font de la transcytose *in vitro*. Celui qui a le mieux performé dans les cinq modèles *in vitro* dans lesquels nous les avons évalués, le 4F2, reconnaît les protéines recombinantes $\alpha 3$, $\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$. Cette meilleure performance ne s'explique pas par la reconnaissance de plusieurs sous unités alpha car des anticorps commerciaux ayant les mêmes propriétés n'ont pas montré de transcytose. Pour le confirmer totalement, il faudrait vérifier si les capacités de transcytose de cet anticorps sont préservées dans des cellules transfectées avec des siRNA $\alpha 3$, $\alpha 5$ et/ou $\beta 1$. Une charge positive plus élevée n'est pas non plus à l'origine de la meilleure transcytose du 4F2. En effet, l'analyse du point isoélectrique de ces anticorps anti-intégrines montrent que le 4F2 a le pI le moins basique. Cela ne va pas dans le sens de la facilitation du passage cellulaire car cet anticorps n'est pas chargé positivement au pH cellulaire physiologique (42).

L'analyse de la séquence peptidique linéaire de cet anticorps 4F2 ne met pas en évidence le peptide RGD de reconnaissance aux intégrines qui facilite la transcytose (388–393).

Notre étude illustre une nouvelle stratégie de recherche de nouveaux mécanismes pour traverser la BHE. Elle a permis de trouver des anticorps anti-intégrines originaux qui font de la transcytose *in*

vitro. Cette étude a quand même plusieurs limites. Pour démontrer quel binding à quelle sous unité ou quel état d'activation de l'intégrine est déterminant dans la transcytose, outre les études de siRNA évoquées ci-dessus, on pourrait envisager des expériences de transcytose dans des tampons favorisant certains états d'activation des intégrines pour déterminer si un état est prépondérant pour la liaison de l'anticorps avec l'intégrine (385,394). On pourrait également faire de l'épitope mapping ou utiliser la technologie Cryo-EM pour déterminer quelle est la région de l'intégrine reconnue par l'anticorps et si elle est déterminante pour les capacités de transcytose de l'anticorps (394–396).

L'absence de cross-réactivité aux intégrines de souris n'a pas permis de valider totalement le mécanisme par une étude de PK chez la souris pour montrer des expositions cérébrales. Des ingénieries d'anticorps par phage display sont envisageables pour trouver des anticorps cross-réactifs humain souris reconnaissant la même cible. Par ailleurs, le fait d'avoir obtenu des anticorps anti-intégrines qui font de la transcytose à travers des modèles de BHE *in vitro* ne résout pas la question de l'expression spécifique dans le cerveau. Les intégrines sont des protéines ubiquitaires comme tous les mécanismes connus aujourd'hui pour faire de la transcytose. Pour orienter vers des mécanismes plus spécifiques du cerveau, cette étude pourrait être améliorée avec une étape supplémentaire de sélection vis-à-vis de tissus périphériques comme décrit par Shusta et al (293). Cette étape devrait être insérée avant le criblage d'internalisation.

4.5 Conclusions

Le domaine de la BHE est très étudié mais comprend encore de nombreux défis à relever.

Pour faciliter les études pharmacocinétiques *in vivo*, ou pour pouvoir faire un criblage *in vivo*, il serait intéressant d'améliorer le système de détection du passage *in vivo* de la BHE. Demeule et al en 2014 ont fusionné la neurotensine à l'Angiopep2 qui franchit la BHE par liaison au récepteur médiant la transcytose LRP1 (397). Le franchissement de la BHE par la neurotensine provoque une baisse de la température corporelle des animaux. Cela permet de savoir de façon certaine que le biothérapeutique a atteint le cerveau. Wouters et al ont récemment publié une étude avec des nanobodies ciblant le TFRC et fusionnés à la neurotensine (398).

Après 4 ans de travail, nous avons des pistes à suivre pour découvrir de nouveaux RMT capables de faire de la transcytose à travers la BHE. Jusqu'à présent, les mécanismes identifiés pour améliorer l'exposition des biothérapeutiques dans le cerveau sont exprimés de manière ubiquitaire, entraînant une exposition dans les tissus périphériques. L'identification des mécanismes spécifiques au cerveau reste un objectif non atteint jusqu'à présent. Une fois qu'il sera identifié, il restera encore plusieurs points à étudier. Il faudra vérifier la sécurité liée au récepteur visé pour le

transport et ensuite celle de la cible dans le cerveau et éventuellement en périphérie. On ne sait pas si l'augmentation de l'exposition cérébrale à un biothérapeutique est complètement sûre.

Ce domaine thérapeutique nécessite une grande évolution des traitements car il reste un énorme besoin médical pour des patients sans solutions thérapeutiques : les personnes atteintes de maladies neurodégénératives, de glioblastomes ou de cancer présentant une évolution avec des métastases cérébrales comme les cancers du sein, du poumon et les mélanomes. Les initiatives de partage de projets et de technologies telles que les IMI comme l'IM2PACT permettent des avancées et des mises en commun de connaissances. Il faut avancer dans ce sens pour faire progresser les connaissances de la BHE.

5 Références

1. Pardridge WM. Why is the global CNS pharmaceutical market so under-penetrated? *Drug Discov Today*. 1 janv 2002;7(1):5-7.
2. Bentivoglio M, Kristensson K. Tryps and trips: cell trafficking across the 100-year-old blood-brain barrier. *Trends Neurosci*. juin 2014;37(6):325-33.
3. Reese TS, Karnovsky MJ. FINE STRUCTURAL LOCALIZATION OF A BLOOD-BRAIN BARRIER TO EXOGENOUS PEROXIDASE. *J Cell Biol*. 1 juill 1967;34(1):207-17.
4. Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroengineering*. 30 août 2013;6:7.
5. Hawkins BT, Davis TP. The Blood-Brain Barrier/Neurovascular Unit in Health and Disease. *Pharmacol Rev*. 1 juin 2005;57(2):173-85.
6. brainVesselsCorosionCast.jpg (1034×654) [Internet]. [cité 24 déc 2021]. Disponible sur: <http://911stroke.info/brainVesselsCorosionCast.jpg>
7. Sweeney MD. Blood–brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. 2018;18.
8. Neuwelt EA. Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery*. janv 2004;54(1):131-40; discussion 141-142.
9. Daneman R, Prat A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. janv 2015;7(1):a020412.
10. Vanlandewijck M, He L, Mäe MA, Andrae J, Ando K, Del Gaudio F, et al. A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature*. 22 févr 2018;554(7693):475-80.
11. Betz AL, Firth JA, Goldstein GW. Polarity of the blood-brain barrier: Distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. *Brain Res*. 16 juin 1980;192(1):17-28.
12. Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, Andreone BJ, Mayshar Y, Yan H, et al. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood–brain barrier. *Nature*. mai 2014;509(7501):507-11.
13. Ross JM, Kim C, Allen D, Crouch EE, Narsinh K, Cooke DL, et al. The Expanding Cell Diversity of the Brain Vasculature. *Front Physiol*. 3 déc 2020;11:600767.
14. Thomsen. Synthesis and deposition of basement membrane proteins by primary brain capillary endothelial cells in a murine model of the blood–brain barrier - Thomsen - 2017 - *Journal of Neurochemistry* - Wiley Online Library [Internet]. 2017 [cité 5 avr 2021]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.13747>
15. Castro Dias M, Mapunda JA, Vladymyrov M, Engelhardt B. Structure and Junctional Complexes of Endothelial, Epithelial and Glial Brain Barriers. *Int J Mol Sci* [Internet]. 29 oct 2019 [cité 8 mars 2021];20(21). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6862204/>

16. Tihanyi KK, Vastag M. Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates. Bentham Science Publishers; 2011. 239 p.
17. Jamieson JJ, Searson PC, Gerecht S. Engineering the human blood-brain barrier in vitro. *J Biol Eng.* 4 déc 2017;11(1):37.
18. Daneman R, Zhou L, Agalliu D, Cahoy JD, Kaushal A, Barres BA. The Mouse Blood-Brain Barrier Transcriptome: A New Resource for Understanding the Development and Function of Brain Endothelial Cells. *PLoS ONE.* 2010;5(10):16.
19. Abbott NJ. The role of brain barriers in fluid movement in the CNS: is there a 'glymphatic' system? *Acta Neuropathol (Berl).* 2018;21.
20. Santos GSP, Magno LAV, Romano-Silva MA, Mintz A, Birbrair A. Pericyte Plasticity in the Brain. *Neurosci Bull.* 26 oct 2018;35(3):551-60.
21. Hartmann DA, Underly RG, Grant RI, Watson AN, Lindner V, Shih AY. Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice. *Neurophotonics.* oct 2015;2(4):041402.
22. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* nov 2010;468(7323):562-6.
23. Mihajlica N. Pharmacokinetics of pericyte involvement in small-molecular drug transport across the blood-brain barrier. *Eur J Pharm Sci.* 2018;8.
24. Mäe Maarja A., He Liqun, Nordling Sofia, Vazquez-Liebanas Elisa, Nahar Khayrun, Jung Bongnam, et al. Single-Cell Analysis of Blood-Brain Barrier Response to Pericyte Loss. *Circ Res.* 19 févr 2021;128(4):e46-62.
25. Dorrier CE, Jones HE, Pintarić L, Siegenthaler JA, Daneman R. Emerging roles for CNS fibroblasts in health, injury and disease. *Nat Rev Neurosci.* janv 2022;23(1):23-34.
26. Guérit S, Fidan E, Macas J, Czapalla CJ, Figueiredo R, Vijikumar A, et al. Astrocyte-derived Wnt growth factors are required for endothelial blood-brain barrier maintenance. *Prog Neurobiol.* 1 avr 2021;199:101937.
27. Baeten KM, Akassoglou K. Extracellular Matrix and Matrix Receptors in Blood-Brain Barrier Formation and Stroke. *Dev Neurobiol.* nov 2011;71(11):1018-39.
28. Hill JJ, Haqqani AS, Stanimirovic DB. Proteome of the Luminal Surface of the Blood-Brain Barrier. *Proteomes.* 10 nov 2021;9(4):45.
29. Butt AM, Jones HC, Abbott NJ. Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. *J Physiol.* oct 1990;429:47-62.
30. Hammarlund-Udenaes M, Lange ECM de, Thorne RG, American Association of Pharmaceutical Scientists, éditeurs. Drug delivery to the brain: physiological concepts, methodologies, and approaches. New York: AAPS Press: Springer; 2014. 731 p. (AAPS advances in the pharmaceutical sciences series).
31. Thomsen MS, Humle N, Hede E, Moos T, Burkhart A, Thomsen LB. The blood-brain barrier studied in vitro across species. *PLOS ONE.* 12 mars 2021;16(3):e0236770.

32. Vigh JP, Kincses A, Ozgür B, Walter FR, Santa-Maria AR, Valkai S, et al. Transendothelial Electrical Resistance Measurement across the Blood-Brain Barrier: A Critical Review of Methods. *Micromachines*. 11 juin 2021;12(6):685.
33. Cucullo L, Hossain M, Puvenna V, Marchi N, Janigro D. The role of shear stress in Blood-Brain Barrier endothelial physiology. *BMC Neurosci*. 11 mai 2011;12:40.
34. Wang X, Xu B, Xiang M, Yang X, Liu Y, Liu X, et al. Advances on fluid shear stress regulating blood-brain barrier. *Microvasc Res*. 1 mars 2020;128:103930.
35. Sweeney MD, Zhao Z, Montagne A, Nelson AR, Zlokovic BV. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*. 2019;99:58.
36. Goulatis LI, Shusta EV. Protein engineering approaches for regulating blood–brain barrier transcytosis. *Curr Opin Struct Biol*. 1 août 2017;45:109-15.
37. Lesuisse D. Drug Delivery to the Brain. • Margareta Hammarlund-Udenaes Elizabeth C.M. de Lange Robert G. Thorne. 2022.
38. Di L, Rong H, Feng B. Demystifying Brain Penetration in Central Nervous System Drug Discovery. *J Med Chem*. 10 janv 2013;56(1):2-12.
39. Huttunen J, Peltokangas S, Gynther M, Natunen T, Hiltunen M, Auriola S, et al. I-Type Amino Acid Transporter 1 (LAT1/Lat1)-Utilizing Prodrugs Can Improve the Delivery of Drugs into Neurons, Astrocytes and Microglia. *Sci Rep [Internet]*. 6 sept 2019 [cité 25 avr 2021];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6731241/>
40. Nałęcz KA. Solute Carriers in the Blood–Brain Barrier: Safety in Abundance. *Neurochem Res*. 1 mars 2017;42(3):795-809.
41. Smith MW, Gumbleton M. Endocytosis at the blood–brain barrier: From basic understanding to drug delivery strategies. *J Drug Target*. 1 janv 2006;14(4):191-214.
42. Hervé F, Ghinea N, Scherrmann JM. CNS Delivery Via Adsorptive Transcytosis. *AAPS J*. 26 août 2008;10(3):455-72.
43. Ayloo S, Gu C. Transcytosis at the Blood-Brain Barrier. *Curr Opin Neurobiol*. août 2019;57:32-8.
44. Johannes L, Lamaze C. Clathrin-Dependent or Not: Is It Still the Question? *Traffic*. 2002;3(7):443-51.
45. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. mai 2018;19(5):313-26.
46. Motley A, Bright NA, Seaman MNJ, Robinson MS. Clathrin-mediated endocytosis in AP-2-depleted cells. *J Cell Biol*. 1 sept 2003;162(5):909-18.
47. Sweitzer SM, Hinshaw JE. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell*. 12 juin 1998;93(6):1021-9.
48. Schlossman DM, Schmid SL, Braell WA, Rothman JE. An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol*. août 1984;99(2):723-33.

49. Robinson MS. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* août 1994;6(4):538-44.
50. Roberts RL, Fine RE, Sandra A. Receptor-mediated endocytosis of transferrin at the blood-brain barrier. *J Cell Sci.* févr 1993;104 (Pt 2):521-32.
51. Duffy KR, Pardridge WM. Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits. *Brain Res.* 8 sept 1987;420(1):32-8.
52. Preston JE, Joan Abbott N, Begley DJ. Transcytosis of macromolecules at the blood-brain barrier. *Adv Pharmacol San Diego Calif.* 2014;71:147-63.
53. de Lange ECM, Hammarlund-Udenaes M, Thorne robert. Brain Delivery of Therapeutics via Transcytosis: Types and Mechanisms of Vesicle-Mediated Transport Across the BBB. *AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series 33.*
54. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, et al. Molecular cloning of cavéolin-3, a novel member of the cavéolin gene family expressed predominantly in muscle. *J Biol Chem.* 26 janv 1996;271(4):2255-61.
55. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG. Cavéolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 21 févr 1992;68(4):673-82.
56. Boscher C, Nabi IR. Cavéolin-1: role in cell signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2012;729:29-50.
57. Parton RG, Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2007;8(3):185-94.
58. Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell.* janv 2002;13(1):238-50.
59. Oh P, Schnitzer JE. Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains. G(q) binds cavéolin to concentrate in caveolae, whereas G(i) and G(s) target lipid rafts by default. *Mol Biol Cell.* mars 2001;12(3):685-98.
60. Zlokovic BV. The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders. *Neuron.* 24 janv 2008;57(2):178-201.
61. Méresse S, Delbart C, Fruchart JC, Cecchelli R. Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J Neurochem.* août 1989;53(2):340-5.
62. Balazs Z, Panzenboeck U, Hammer A, Sovic A, Quehenberger O, Malle E, et al. Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood-brain barrier model. *J Neurochem.* mai 2004;89(4):939-50.
63. Zlokovic BV, Jovanovic S, Miao W, Samara S, Verma S, Farrell CL. Differential regulation of leptin transport by the choroid plexus and blood-brain barrier and high affinity transport systems for entry into hypothalamus and across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Endocrinology.* avr 2000;141(4):1434-41.
64. Deane R, Sagare A, Hamm K, Parisi M, LaRue B, Guo H, et al. IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor. *J Neurosci Off J Soc Neurosci.* 14 déc 2005;25(50):11495-503.

65. Song L, Ge S, Pachter JS. Cavéolin-1 regulates expression of junction-associated proteins in brain microvascular endothelial cells. *Blood*. 15 févr 2007;109(4):1515-23.
66. Knowland D, Arac A, Sekiguchi KJ, Hsu M, Lutz SE, Perrino J, et al. Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke. *Neuron*. 7 mai 2014;82(3):603-17.
67. Sadeghian H, Lacoste B, Qin T, Toussay X, Rosa R, Oka F, et al. Spreading depolarizations trigger cavéolin-1-dependent endothelial transcytosis. *Ann Neurol*. sept 2018;84(3):409-23.
68. Reyahi A, Nik AM, Ghiami M, Gritli-Linde A, Pontén F, Johansson BR, et al. Foxf2 Is Required for Brain Pericyte Differentiation and Development and Maintenance of the Blood-Brain Barrier. *Dev Cell*. 6 juill 2015;34(1):19-32.
69. Andreone BJ, Chow BW, Tata A, Lacoste B, Ben-Zvi A, Bullock K, et al. Blood-Brain Barrier Permeability Is Regulated by Lipid Transport-Dependent Suppression of Caveolae-Mediated Transcytosis. *Neuron*. 3 mai 2017;94(3):581-594.e5.
70. Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in cavéolin-1 gene-disrupted mice. *Science*. 28 sept 2001;293(5539):2449-52.
71. Razani B, Engelman JA, Wang XB, Schubert W, Zhang XL, Marks CB, et al. Cavéolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities. *J Biol Chem*. 12 oct 2001;276(41):38121-38.
72. Cao G, Yang G, Timme TL, Saika T, Truong LD, Satoh T, et al. Disruption of the cavéolin-1 gene impairs renal calcium reabsorption and leads to hypercalciuria and urolithiasis. *Am J Pathol*. avr 2003;162(4):1241-8.
73. Vendel E, Rottschäfer V, de Lange ECM. The need for mathematical modelling of spatial drug distribution within the brain. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 16 mai 2019 [cité 23 avr 2021];16. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6521438/>
74. Jones AR, Shusta EV. Blood-Brain Barrier Transport of Therapeutics via Receptor-Mediation. *Pharm Res*. sept 2007;24(9):1759-71.
75. Kushihara H, Sugiyama Y. Efflux transport systems for drugs at the blood–brain barrier and blood–cerebrospinal fluid barrier (Part 1). *Drug Discov Today*. 1 févr 2001;6(3):150-6.
76. Kushihara H, Sugiyama Y. Efflux transport systems for drugs at the blood–brain barrier and blood–cerebrospinal fluid barrier (Part 2). *Drug Discov Today*. 15 févr 2001;6(4):206-12.
77. Zhang Y, Pardridge WM. Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood–brain barrier. *J Neuroimmunol*. 1 mars 2001;114(1):168-72.
78. Garg A, Balthasar JP. Investigation of the Influence of FcRn on the Distribution of IgG to the Brain. *AAPS J*. 28 juill 2009;11(3):553.
79. Zhou L, Sohet F, Daneman R. Purification and Culture of Central Nervous System Endothelial Cells. 2018;4.

80. Vandenhoute E, Drolez A, Sevin E, Gosselet F, Mysiorek C, Dehouck MP. Adapting coculture in vitro models of the blood–brain barrier for use in cancer research: maintaining an appropriate endothelial monolayer for the assessment of transendothelial migration. *Lab Invest.* 2016;00:11.
81. Zhou L, Sohet F, Daneman R. Purification of Endothelial Cells from Rodent Brain by Immunopanning. 2014;14.
82. Bernas MJ, Cardoso FL, Daley SK, Weinand ME, Campos AR, Ferreira AJG, et al. Establishment of primary cultures of human brain microvascular endothelial cells to provide an in vitro cellular model of the blood-brain barrier. *Nat Protoc.* juill 2010;5(7):1265-72.
83. Navone SE, Marfia G, Nava S, Invernici G, Cristini S, Balbi S, et al. Human and mouse brain-derived endothelial cells require high levels of growth factors medium for their isolation, in vitro maintenance and survival. *Vasc Cell.* 14 mai 2013;5:10.
84. Dorovini-Zis K, Prameya R, Huynh H. Isolation and characterization of human brain endothelial cells. *Methods Mol Med.* 2003;89:325-36.
85. Navone SE, Marfia G, Invernici G, Cristini S, Nava S, Balbi S, et al. Isolation and expansion of human and mouse brain microvascular endothelial cells. *Nat Protoc.* sept 2013;8(9):1680-93.
86. Assmann JC, Müller K, Wenzel J, Walther T, Brands J, Thornton P, et al. Isolation and Cultivation of Primary Brain Endothelial Cells from Adult Mice. 2017;16.
87. Crouch EE. FACS isolation of endothelial cells and pericytes from mouse brain microregions. 2018;14.
88. Welser-Alves JV, Boroujerdi A, Milner R. Isolation and Culture of Primary Mouse Brain Endothelial Cells. 2014;12.
89. Ruck T, Bittner S, Epping L, Herrmann AM, Meuth SG. Isolation of Primary Murine Brain Microvascular Endothelial Cells. *J Vis Exp JoVE [Internet].* 14 nov 2014 [cité 5 avr 2021];(93). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4354020/>
90. Wylot B, Konarzewska K, Bugajski L, Piwocka K, Zawadzka M. Isolation of vascular endothelial cells from intact and injured murine brain cortex—technical issues and pitfalls in FACS analysis of the nervous tissue. *Cytometry A.* 2015;13.
91. Perrière N, Demeuse Ph, Garcia E, Regina A, Debray M, Andreux JP, et al. Puromycin-based purification of rat brain capillary endothelial cell cultures. Effect on the expression of blood–brain barrier-specific properties. *J Neurochem.* 2005;93(2):279-89.
92. Calabria AR, Shusta EV. A Genomic Comparison of in vivo and in vitro Brain Microvascular Endothelial Cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1 janv 2008;28(1):135-48.
93. Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. 2005;26.
94. 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. 2013;17.

95. Kaisar MA, Sajja RK, Prasad S, Abhyankar VV, Liles T, Cucullo L. New experimental models of the blood-brain barrier for CNS drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* janv 2017;12(1):89-103.
96. Chaves C, Do TM, Cegarra C, Roudières V, Tolou S, Thill G, et al. Non-Human Primate Blood-Brain Barrier and In Vitro Brain Endothelium: From Transcriptome to the Establishment of a New Model. *Pharmaceutics.* 14 oct 2020;12(10).
97. Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, Nessler RA, Wilson HK, Al-Ahmad A, et al. Human Blood-Brain Barrier Endothelial Cells Derived from Pluripotent Stem Cells. *Nat Biotechnol.* août 2012;30(8):783-91.
98. Qian T, Maguire SE, Canfield SG, Olson WR, Shusta EV, Palecek SP. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to blood-brain barrier endothelial cells. *Sci Adv.* 2017;13.
99. Thoma EC, Heckel T, Keller D, Giroud N, Leonard B, Christensen K, et al. Establishment of a translational endothelial cell model using directed differentiation of induced pluripotent stem cells from *Cynomolgus* monkey. *Sci Rep [Internet].* 25 oct 2016 [cité 5 avr 2021];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5078800/>
100. Lu TM, Houghton S, Magdeldin T, Durán JGB, Minotti AP, Snead A, et al. Pluripotent stem cell-derived epithelium misidentified as brain microvascular endothelium requires ETS factors to acquire vascular fate. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 23 févr 2021 [cité 8 janv 2022];118(8). Disponible sur: <https://www.pnas.org/content/118/8/e2016950118>
101. Bors LA, Erdő F. Overcoming the Blood–Brain Barrier. Challenges and Tricks for CNS Drug Delivery. *Sci Pharm.* 2019;28.
102. Chung HH, Mireles M, Kwartá BJ, Gaborski TR. Use of Porous membranes in tissue barrier and co-culture models. *Lab Chip.* 12 juin 2018;18(12):1671-89.
103. Simões Da Gama C, Morin-Brureau M. Study of BBB Dysregulation in Neuropathogenicity Using Integrative Human Model of Blood–Brain Barrier. *Front Cell Neurosci.* 10 juin 2022;16:863836.
104. Katt ME, Linville RM, Mayo LN, Xu ZS, Searson PC. Functional brain-specific microvessels from iPSC-derived human brain microvascular endothelial cells: the role of matrix composition on monolayer formation. *Fluids Barriers CNS.* 20 févr 2018;15:7.
105. 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(6):11.
106. Shi. Biochemical characteristics of primary and passaged cultures of primate brain microvessel endothelial cells. 1994;7.
107. MacLean AG, Orandle MS, MacKey J, Williams KC, Alvarez X, Lackner AA. Characterization of an in vitro rhesus macaque blood–brain barrier. *J Neuroimmunol.* 2002;6.
108. Wolfe JM. Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents. *Nat Commun.* :14.

109. Nozohouri S, Noorani B, Al-Ahmad A, Abbruscato TJ. Estimating Brain Permeability Using In Vitro Blood-Brain Barrier Models. In New York, NY: Springer US; 2020 [cité 2 mars 2021]. p. 1-26. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/7651_2020_311
110. Campisi M, Lim SH, Chiono V, Kamm RD. 3D Self-Organized Human Blood–Brain Barrier in a Microfluidic Chip. In: Ebrahimkhani MR, Hislop J, éditeurs. Programmed Morphogenesis: Methods and Protocols [Internet]. New York, NY: Springer US; 2021 [cité 1 mars 2021]. p. 205-19. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1174-6_14
111. Middelkamp HHT, Verboven AHA, De Sá Vivas AG, Schoenmaker C, Klein Gunnewiek TM, Passier R, et al. Cell type-specific changes in transcriptomic profiles of endothelial cells, iPSC-derived neurons and astrocytes cultured on microfluidic chips. *Sci Rep*. 26 janv 2021;11(1):2281.
112. Jackson S, Meeks C, Vézina A, Robey RW, Tanner K, Gottesman MM. Model systems for studying the blood-brain barrier: Applications and challenges. *Biomaterials*. 1 sept 2019;214:119217.
113. Fujimoto T, Morofuji Y, Nakagawa S, Kovac A, Horie N, Izumo T, et al. Comparison of the rate of dedifferentiation with increasing passages among cell sources for an in vitro model of the blood–brain barrier. *J Neural Transm*. 1 août 2020;127(8):1117-24.
114. Modarres HP. In vitro models and systems for evaluating the dynamics of drug delivery to the healthy and diseased brain. *J Controlled Release*. 2018;23.
115. Abbott NJ. Dynamics of CNS Barriers: Evolution, Differentiation, and Modulation. *Cell Mol Neurobiol*. 1 févr 2005;25(1):5-23.
116. Shayan G, Choi YS, Shusta EV, Shuler ML, Lee KH. Murine in vitro model of the blood–brain barrier for evaluating drug transport. *Eur J Pharm Sci*. 2011;8.
117. García-Salvador A, Domínguez-Monedero A, Gómez-Fernández P, García-Bilbao A, Carregal-Romero S, Castilla J, et al. Evaluation of the Influence of Astrocytes on In Vitro Blood–Brain Barrier Models. *Altern Lab Anim*. 1 juill 2020;48(4):184-200.
118. Maherally Z, Fillmore HL, Tan SL, Tan SF, Jassam SA, Quack FI, et al. Real-time acquisition of transendothelial electrical resistance in an all-human, in vitro, 3-dimensional, blood–brain barrier model exemplifies tight-junction integrity. 2017;16.
119. Watanabe D, Nakagawa S, Morofuji Y, Tóth AE, Vastag M, Aruga J, et al. Characterization of a Primate Blood-Brain Barrier Co-Culture Model Prepared from Primary Brain Endothelial Cells, Pericytes and Astrocytes. *Pharmaceutics*. 16 sept 2021;13(9):1484.
120. Thanabalasundaram G, Schneidewind J, Pieper C, Galla HJ. The impact of pericytes on the blood–brain barrier integrity depends critically on the pericyte differentiation stage. *Int J Biochem Cell Biol*. 1 sept 2011;43(9):1284-93.
121. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, Cecchelli R, Couraud PO, 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*. 1 mai 2016;36(5):862-90.
122. Fatima N, Gromnicova R, Loughlin J, Sharrack B, Male D. Gold nanocarriers for transport of oligonucleotides across brain endothelial cells. *PLoS ONE*. 17 sept 2020;15(9):e0236611.

123. Simonneau C, Duschmalé M, Gavrilov A, Brandenberg N, Hoehnel S, Ceroni C, et al. Investigating receptor-mediated antibody transcytosis using blood–brain barrier organoid arrays. *Fluids Barriers CNS*. 20 sept 2021;18:43.
124. Urich E, Patsch C, Aigner S, Graf M, Iacone R, Freskgård PO. Multicellular Self-Assembled Spheroidal Model of the Blood Brain Barrier. *Sci Rep*. 20 mars 2013;3(1):1500.
125. Cho H, Seo JH, Wong KHK, Terasaki Y, Park J, Bong K, et al. Three-Dimensional Blood-Brain Barrier Model for in vitro Studies of Neurovascular Pathology. *Sci Rep*. 27 oct 2015;5(1):15222.
126. Nzou G, Wicks RT, Wicks EE, Seale SA, Sane CH, Chen A, et al. Human Cortex Spheroid with a Functional Blood Brain Barrier for High-Throughput Neurotoxicity Screening and Disease Modeling. *Sci Rep*. 9 mai 2018;8:7413.
127. Maoz BM, Herland A, FitzGerald EA, Grevesse T, Vidoudez C, Pacheco AR, et al. A linked organ-on-chip model of the human neurovascular unit reveals the metabolic coupling of endothelial and neuronal cells. *Nat Biotechnol*. oct 2018;36(9):865-74.
128. Adriani G, Ma D, Pavesi A, Kamm RD, Goh ELK. A 3D neurovascular microfluidic model consisting of neurons, astrocytes and cerebral endothelial cells as a blood–brain barrier. *Lab Chip*. 31 janv 2017;17(3):448-59.
129. Wang JD, Khafagy ES, Khanafer K, Takayama S, ElSayed MEH. Organization of Endothelial Cells, Pericytes, and Astrocytes into a 3D Microfluidic in Vitro Model of the Blood–Brain Barrier. *Mol Pharm*. 7 mars 2016;13(3):895-906.
130. Wang YI, Abaci HE, Shuler ML. Microfluidic Blood-Brain Barrier Model Provides In Vivo-Like Barrier Properties for Drug Permeability Screening. *Biotechnol Bioeng*. janv 2017;114(1):184-94.
131. van der Helm MW, van der Meer AD, Eijkel JCT, van den Berg A, Segerink LI. Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research. *Tissue Barriers*. 28 janv 2016;4(1):e1142493.
132. NAIK P, CUCULLO L. In Vitro Blood–Brain Barrier Models: Current and Perspective Technologies. *J Pharm Sci*. avr 2012;101(4):1337-54.
133. Wevers NR, Kasi DG, Gray T, Wilschut KJ, Smith B, van Vught R, et al. A perfused human blood–brain barrier on-a-chip for high-throughput assessment of barrier function and antibody transport. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 31 août 2018 [cité 20 avr 2021];15. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6117964/>
134. Fowke TM, Pontier M, Wevers NR, van Vught R, Lanz H, Joore J, et al. Building on ADAPTED: further development of neurovascular unit on-a-chip models. :1.
135. Chen X, Liu C, Muok L, Zeng C, Li Y. Dynamic 3D On-Chip BBB Model Design, Development, and Applications in Neurological Diseases. *Cells*. nov 2021;10(11):3183.
136. Ling Lee SW, Campisi M, Osaki T, Possenti L, Mattu C, Adriani G, et al. Modeling Nanocarrier Transport Across a 3D In Vitro Human Blood-Brain-Barrier Microvasculature. *Adv Healthc Mater*. avr 2020;9(7):e1901486.

137. Herland A, Meer AD van der, FitzGerald EA, Park TE, Sleeboom JJF, Ingber DE. Distinct Contributions of Astrocytes and Pericytes to Neuroinflammation Identified in a 3D Human Blood-Brain Barrier on a Chip. *PLOS ONE*. 1 mars 2016;11(3):e0150360.
138. Im2pact Consortium - About IM2PACT [Internet]. Im2pact Consortium. [cité 2 janv 2022]. Disponible sur: <http://im2pact.org/about/about-im2pact/>
139. Anticorps. In: Wikipédia [Internet]. 2021 [cité 2 janv 2022]. Disponible sur: <https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Anticorps&oldid=188142433>
140. Brinkmann U, Kontermann RE. The making of bispecific antibodies. *mAbs*. 17 févr 2017;9(2):182-212.
141. Stanimirovic D, Kemmerich K, Haqqani AS, Farrington GK. Chapter Ten - Engineering and Pharmacology of Blood–Brain Barrier-Permeable Bispecific Antibodies. In: Davis TP, éditeur. *Advances in Pharmacology* [Internet]. Academic Press; 2014 [cité 22 avr 2021]. p. 301-35. (Pharmacology of the Blood Brain Barrier: Targeting CNS Disorders; vol. 71). Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1054358914000064>
142. Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol*. déc 1997;34(16-17):1121-31.
143. Vincke C, Muyldermans S. Introduction to Heavy Chain Antibodies and Derived Nanobodies. In: Saerens D, Muyldermans S, éditeurs. *Single Domain Antibodies: Methods and Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2012 [cité 2 janv 2022]. p. 15-26. (Methods in Molecular Biology). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-61779-968-6_2
144. Pothin E, Lesuisse D, Lafaye P. Brain Delivery of Single-Domain Antibodies: A Focus on VHH and VNAR. *Pharmaceutics*. 30 sept 2020;12(10):E937.
145. Ryman JT, Meibohm B. Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies. *CPT Pharmacomet Syst Pharmacol*. sept 2017;6(9):576-88.
146. Pepinsky RB, Shao Z, Ji B, Wang Q, Meng G, Walus L, et al. Exposure levels of anti-LINGO-1 Li81 antibody in the central nervous system and dose-efficacy relationships in rat spinal cord remyelination models after systemic administration. *J Pharmacol Exp Ther*. nov 2011;339(2):519-29.
147. Giugliani R, Martins AM, So S, Yamamoto T, Yamaoka M, Ikeda T, et al. Iduronate-2-sulfatase fused with anti-hTfR antibody, pabinafusp alfa, for MPS-II: A phase 2 trial in Brazil. *Mol Ther* [Internet]. 27 mars 2021 [cité 8 mai 2021]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1525001621001489>
148. Chakroun RW, Zhang P, Lin R, Schiapparelli P, Quinones-Hinojosa A, Cui H. *Nanotherapeutic Systems for Local Treatment of Brain Tumors*: 2018;10:26.
149. Marshall NR, Hassiotis S, King B, Rozaklis T, Trim PJ, Duplock SK, et al. Delivery of therapeutic protein for prevention of neurodegenerative changes: Comparison of different CSF-delivery methods. *Exp Neurol*. 1 janv 2015;263:79-90.
150. Bennewitz MF, Saltzman WM. Nanotechnology for delivery of drugs to the brain for epilepsy. *Neurotherapeutics*. avr 2009;6(2):323-36.

151. Yan Q, Matheson C, Sun J, Radeke MJ, Feinstein SC, Miller JA. Distribution of Intracerebral Ventricularly Administered Neurotrophins in Rat Brain and Its Correlation with Trk Receptor Expression. *Exp Neurol*. 1 mai 1994;127(1):23-36.
152. voies_it.pdf [Internet]. [cité 16 nov 2021]. Disponible sur: https://pharmacie.hug.ch/infomedic/utilismedic/voies_it.pdf
153. Angeli E, Nguyen TT, Janin A, Bousquet G. How to Make Anticancer Drugs Cross the Blood–Brain Barrier to Treat Brain Metastases. *Int J Mol Sci*. 18 déc 2019;21(1):22.
154. Wu H, Hu K, Jiang X. From nose to brain: understanding transport capacity and transport rate of drugs. *Expert Opin Drug Deliv*. 1 oct 2008;5(10):1159-68.
155. Beccaria K, Canney M, Bouchoux G, Puget S, Grill J, Carpentier A. Blood-brain barrier disruption with low-intensity pulsed ultrasound for the treatment of pediatric brain tumors: a review and perspectives. *Neurosurg Focus*. 1 janv 2020;48(1):E10.
156. Curley CT, Sheybani ND, Bullock TN, Price RJ. Focused Ultrasound Immunotherapy for Central Nervous System Pathologies: Challenges and Opportunities. *Theranostics*. 23 août 2017;7(15):3608-23.
157. Triguero D, Buciak J, Pardridge WM. Capillary Depletion Method for Quantification of Blood–Brain Barrier Transport of Circulating Peptides and Plasma Proteins. *J Neurochem*. 1990;54(6):1882-8.
158. Ramakrishnan M, Wengenack TM, Kandimalla KK, Curran GL, Gilles EJ, Ramirez-Alvarado M, et al. Selective Contrast Enhancement of Individual Alzheimer’s Disease Amyloid Plaques Using a Polyamine and Gd-DOTA Conjugated Antibody Fragment Against Fibrillar A β 42 for Magnetic Resonance Molecular Imaging. *Pharm Res*. août 2008;25(8):1861-72.
159. Li T, Vandesquille M, Koukouli F, Duffeffant C, Youssef I, Lenormand P, et al. Camelid single-domain antibodies: A versatile tool for in vivo imaging of extracellular and intracellular brain targets. *J Controlled Release*. 10 déc 2016;243:1-10.
160. Pardridge WM. Drug and Gene Delivery to the Brain: The Vascular Route. *Neuron*. 14 nov 2002;36(4):555-8.
161. Li JY, Boado RJ, Pardridge WM. Blood—Brain Barrier Genomics. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1 janv 2001;21(1):61-8.
162. Enerson BE, Drewes LR. The Rat Blood—Brain Barrier Transcriptome. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1 juill 2006;26(7):959-73.
163. Zuchero YJY. Discovery of Novel Blood-Brain Barrier Targets to Enhance Brain Uptake of Therapeutic Antibodies. 2016;14.
164. Jefferies WA, Brandon MR, Hunt SV, Williams AF, Gatter KC, Mason DY. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature*. nov 1984;312(5990):162-3.
165. Friden PM, Walus LR, Musso GF, Taylor MA, Malfroy B, Starzyk RM. Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci*. 1 juin 1991;88(11):4771-5.

166. Pardridge WM, Buciak JL, Friden PM. Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* oct 1991;259(1):66-70.
167. Pardridge WM. *Brain Drug Targeting: The Future of Brain Drug Development.* Cambridge University Press; 2001. 377 p.
168. Bickel U, Yoshikawa T, Landaw EM, Faull KF, Pardridge WM. Pharmacologic effects in vivo in brain by vector-mediated peptide drug delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 avr 1993;90(7):2618-22.
169. Granholm AC, Bäckman C, Bloom F, Ebendal T, Gerhardt GA, Hoffer B, et al. NGF and anti-transferrin receptor antibody conjugate: short and long-term effects on survival of cholinergic neurons in intraocular septal transplants. *J Pharmacol Exp Ther.* 1 janv 1994;268(1):448-59.
170. Baschieri F, Le Devedec D, Tettarasar S, Elkhatib N, Montagnac G. Frustration of endocytosis potentiates compression-induced receptor signaling. *J Cell Sci [Internet].* 1 sept 2020 [cité 25 avr 2021];133(jcs239681). Disponible sur: <https://doi.org/10.1242/jcs.239681>
171. Blandin AF, Cruz Da Silva E, Mercier MC, Glushonkov O, Didier P, Dedieu S, et al. Gefitinib induces EGFR and $\alpha 5\beta 1$ integrin co-endocytosis in glioblastoma cells. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 5 nov 2020;
172. Sonoda H, Morimoto H, Yoden E, Koshimura Y, Kinoshita M, Golovina G, et al. A Blood-Brain-Barrier-Penetrating Anti-human Transferrin Receptor Antibody Fusion Protein for Neuronopathic Mucopolysaccharidosis II. *Mol Ther.* 2 mai 2018;26(5):1366-74.
173. Friden PM, Walus LR, Watson P, Doctrow SR, Kozarich JW, Bäckman C, et al. Blood-Brain Barrier Penetration and in Vivo Activity of an NGF Conjugate. *Science.* 15 janv 1993;259(5093):373-7.
174. Webster CI, Hatcher J, Burrell M, Thom G, Thornton P, Gurrell I, et al. Enhanced delivery of IL-1 receptor antagonist to the central nervous system as a novel anti-transferrin receptor-IL-1RA fusion reverses neuropathic mechanical hypersensitivity. *PAIN.* avr 2017;158(4):660-8.
175. Atwal JK, Chen Y, Chiu C, Mortensen DL, Meilandt WJ, Liu Y, et al. A therapeutic antibody targeting BACE1 inhibits amyloid- β production in vivo. *Sci Transl Med.* 25 mai 2011;3(84):84ra43.
176. Yu YJ, Zhang Y, Kenrick M, Hoyte K, Luk W, Lu Y, et al. Boosting Brain Uptake of a Therapeutic Antibody by Reducing Its Affinity for a Transcytosis Target. *Sci Transl Med.* 2011;10.
177. Yu YJ, Atwal JK, Zhang Y, Tong RK, Wildsmith KR, Tan C, et al. Therapeutic bispecific antibodies cross the blood-brain barrier in nonhuman primates. *Sci Transl Med.* 5 nov 2014;6(261):261ra154-261ra154.
178. Niewoehner J, Bohrmann B, Collin L, Urich E, Sade H, Maier P, et al. Increased Brain Penetration and Potency of a Therapeutic Antibody Using a Monovalent Molecular Shuttle. *Neuron.* 8 janv 2014;81(1):49-60.
179. Brain Shuttle Could Halve Amount of Gantenerumab Needed | ALZFORUM [Internet]. [cité 19 déc 2021]. Disponible sur: <https://www.alzforum.org/news/conference-coverage/brain-shuttle-could-halve-amount-gantenerumab-needed>

180. Karaoglu Hanzatian D, Schwartz A, Gizatullin F, Erickson J, Deng K, Villanueva R, et al. Brain uptake of multivalent and multi-specific DVD-Ig proteins after systemic administration. *mAbs*. 4 juill 2018;10(5):765-77.
181. Do TM, Capdevila C, Pradier L, Blanchard V, Lopez-Grancha M, Schussler N, et al. Tetravalent Bispecific Tandem Antibodies Improve Brain Exposure and Efficacy in an Amyloid Transgenic Mouse Model. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 21 août 2020;19:58-77.
182. Kariolis MS, Wells RC, Getz JA, Kwan W, Mahon CS, Tong R, et al. Brain delivery of therapeutic proteins using an Fc fragment blood-brain barrier transport vehicle in mice and monkeys. *Sci Transl Med [Internet]*. 27 mai 2020 [cité 23 avr 2021];12(545). Disponible sur: <https://stm.sciencemag.org/content/12/545/eaay1359>
183. Pardridge WM, Eisenberg J, Yang J. Human Blood—Brain Barrier Insulin Receptor. *J Neurochem*. 1985;44(6):1771-8.
184. Fukuta M, Okada H, Iinuma S, Yanai S, Toguchi H. Insulin fragments as a carrier for peptide delivery across the blood-brain barrier. *Pharm Res*. déc 1994;11(12):1681-8.
185. Pardridge WM, Kang YS, Buciak JL, Yang J. Human Insulin Receptor Monoclonal Antibody Undergoes High Affinity Binding to Human Brain Capillaries in Vitro and Rapid Transcytosis Through the Blood–Brain Barrier in Vivo in the Primate. *Pharm Res*. 1 juin 1995;12(6):807-16.
186. Wu D, Yang J, Pardridge WM. Drug targeting of a peptide radiopharmaceutical through the primate blood-brain barrier in vivo with a monoclonal antibody to the human insulin receptor. *J Clin Invest*. 1 oct 1997;100(7):1804-12.
187. Coloma MJ, Lee HJ, Kurihara A, Landaw EM, Boado RJ, Morrison SL, et al. Transport across the primate blood-brain barrier of a genetically engineered chimeric monoclonal antibody to the human insulin receptor. *Pharm Res*. mars 2000;17(3):266-74.
188. Boado RJ, Zhang Y, Zhang Y, Pardridge WM. Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood–brain barrier. *Biotechnol Bioeng*. 2007;96(2):381-91.
189. Boado RJ, Zhang Y, Zhang Y, Xia CF, Pardridge WM. Fusion Antibody for Alzheimer's Disease with Bi-Directional Transport Across the Blood-Brain Barrier and Aβ Fibril Disaggregation. *Bioconjug Chem*. 2007;18(2):447-55.
190. Ohshima-Hosoyama S, Simmons HA, Goecks N, Joers V, Swanson CR, Bondarenko V, et al. A Monoclonal Antibody-GDNF Fusion Protein Is Not Neuroprotective and Is Associated with Proliferative Pancreatic Lesions in Parkinsonian Monkeys. *PLOS ONE*. 20 juin 2012;7(6):e39036.
191. Pardridge WM. Delivery of Biologics Across the Blood–Brain Barrier with Molecular Trojan Horse Technology. 2017;17.
192. Boado RJ, Lu JZ, Hui EKW, Lin H, Pardridge WM. Bi-functional IgG-lysosomal enzyme fusion proteins for brain drug delivery. *Sci Rep*. 9 déc 2019;9:18632.
193. Boado RJ, Hui EKW, Lu JZ, Pardridge WM. Glycemic Control and Chronic Dosing of Rhesus Monkeys with a Fusion Protein of Iduronidase and a Monoclonal Antibody Against the Human Insulin Receptor. *Drug Metab Dispos*. oct 2012;40(10):2021-5.

194. Stanimirovic DB, Sandhu JK, Costain WJ. Emerging Technologies for Delivery of Biotherapeutics and Gene Therapy Across the Blood–Brain Barrier. *Biodrugs*. 2018;32(6):547-59.
195. Sade H, Baumgartner C, Hugenmatter A, Moessner E, Freskgård PO, Niewoehner J. A Human Blood-Brain Barrier Transcytosis Assay Reveals Antibody Transcytosis Influenced by pH-Dependent Receptor Binding. *PLoS ONE* [Internet]. 30 avr 2014 [cité 23 avr 2021];9(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4005765/>
196. Molino Y, David M, Varini K, Jabès F, Gaudin N, Fortoul A, et al. Use of LDL receptor—targeting peptide vectors for in vitro and in vivo cargo transport across the blood-brain barrier. *FASEB J*. 2017;31(5):1807-27.
197. Cai Z, Qiao PF, Wan CQ, Cai M, Zhou NK, Li Q. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. 2018;12.
198. Liu Y, Li J, Shao K, Huang R, Ye L, Lou J, et al. A leptin derived 30-amino-acid peptide modified pegylated poly-l-lysine dendrigraft for brain targeted gene delivery. *Biomaterials*. 1 juill 2010;31(19):5246-57.
199. Neuwelt E, Abbott NJ, Abrey L, Banks WA, Blakley B, Davis T, et al. Strategies to advance translational research into brain barriers. *Lancet Neurol*. 1 janv 2008;7(1):84-96.
200. Banks WA. From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. *Nat Rev Drug Discov*. avr 2016;15(4):275-92.
201. Stutz CC, Zhang X, Shusta EV. Combinatorial Approaches for the Identification of Brain Drug Delivery Targets. *Curr Pharm Des*. 2014;20(10):1564-76.
202. Shusta EV, Boado RJ, Mathern GW, Pardridge WM. Vascular Genomics of the Human Brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1 mars 2002;22(3):245-52.
203. Zeng H, Shen EH, Hohmann JG, Oh SW, Bernard A, Royall JJ, et al. Large-Scale Cellular-Resolution Gene Profiling in Human Neocortex Reveals Species-Specific Molecular Signatures. *Cell*. 13 avr 2012;149(2):483-96.
204. Stoll J, Wadhvani KC, Smith QR. Identification of the Cationic Amino Acid Transporter (System y+) of the Rat Blood-Brain Barrier. *J Neurochem*. 1993;60(5):1956-9.
205. Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood–brain barrier. *Proc Natl Acad Sci*. 12 oct 1999;96(21):12079-84.
206. Dauchy S, Dutheil F, Weaver RJ, Chassoux F, Daumas-Duport C, Couraud PO, et al. ABC transporters, cytochromes P450 and their main transcription factors: expression at the human blood–brain barrier. *J Neurochem*. 2008;107(6):1518-28.
207. Shawahna R, Uchida Y, Declèves X, Ohtsuki S, Yousif S, Dauchy S, et al. Transcriptomic and Quantitative Proteomic Analysis of Transporters and Drug Metabolizing Enzymes in Freshly Isolated Human Brain Microvessels. *Mol Pharm*. 1 août 2011;8(4):1332-41.
208. Warren MS, Zerangue N, Woodford K, Roberts LM, Tate EH, Feng B, et al. Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacol Res*. 1 juin 2009;59(6):404-13.

209. Geier EG, Chen EC, Webb A, Papp AC, Yee SW, Sadee W, et al. Profiling solute carrier transporters in the human blood-brain barrier. *Clin Pharmacol Ther.* déc 2013;94(6):636-9.
210. Peura L, Malmioja K, Huttunen K, Leppänen J, Hämäläinen M, Forsberg MM, et al. Design, Synthesis and Brain Uptake of LAT1-Targeted Amino Acid Prodrugs of Dopamine. *Pharm Res.* 1 oct 2013;30(10):2523-37.
211. Zhou Y, Danbolt N. GABA and Glutamate Transporters in Brain. *Front Endocrinol.* 2013;4:165.
212. Liu X, Cheng R, Verbitsky M, Kisselev S, Browne A, Mejia-Sanatana H, et al. Genome-Wide association study identifies candidate genes for Parkinson's disease in an Ashkenazi Jewish population. *BMC Med Genet.* 3 août 2011;12(1):104.
213. Suhy AM, Webb A, Papp AC, Geier EG, Sadee W. Expression and splicing of ABC and SLC transporters in the human blood-brain barrier measured with RNAseq. *Eur J Pharm Sci.* 30 mai 2017;103:47-51.
214. Song HW, Foreman KL, Gastfriend BD, Kuo JS, Palecek SP, Shusta EV. Transcriptomic comparison of human and mouse brain microvessels. *Sci Rep [Internet].* 23 juill 2020 [cité 2 mai 2021];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7378255/>
215. Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci.* 11 juin 1996;93(12):6025-30.
216. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, et al. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J Neurosci.* 3 sept 2014;34(36):11929-47.
217. Zhang Y. Purification and Characterization of Progenitor and Mature Human Astrocytes Reveals Transcriptional and Functional Differences with Mouse. 2016;18.
218. Tasic B, Menon V, Nguyen TN, Kim TK, Jarsky T, Yao Z, et al. Adult Mouse Cortical Cell Taxonomy by Single Cell Transcriptomics. *Nat Neurosci.* févr 2016;19(2):335-46.
219. Darmanis S, Sloan SA, Zhang Y, Enge M, Caneda C, Shuer LM, et al. A survey of human brain transcriptome diversity at the single cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 juin 2015;112(23):7285-90.
220. Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, Lönnerberg P, La Manno G, Juréus A, et al. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science.* 6 mars 2015;347(6226):1138-42.
221. McKenzie AT, Wang M, Hauberg ME, Fullard JF, Kozlenkov A, Keenan A, et al. Brain Cell Type Specific Gene Expression and Co-expression Network Architectures. *Sci Rep.* 11 juin 2018;8(1):8868.
222. He L, Vanlandewijck M, Mäe MA, Andrae J, Ando K, Del Gaudio F, et al. Single-cell RNA sequencing of mouse brain and lung vascular and vessel-associated cell types. *Sci Data.* 21 août 2018;5(1):180160.
223. Feng W, Chen L, Nguyen PK, Wu SM, Li G. Single Cell Analysis of Endothelial Cells Identified Organ-Specific Molecular Signatures and Heart-Specific Cell Populations and Molecular

- Features. *Front Cardiovasc Med* [Internet]. 26 nov 2019 [cité 2 mai 2021];6. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6901932/>
224. Kalucka J, de Rooij LPMH, Goveia J, Rohlenova K, Dumas SJ, Meta E, et al. Single-Cell Transcriptome Atlas of Murine Endothelial Cells. *Cell*. 20 févr 2020;180(4):764-779.e20.
225. Lyck R, Ruderisch N, Moll AG, Steiner O, Cohen CD, Engelhardt B, et al. Culture-Induced Changes in Blood—Brain Barrier Transcriptome: Implications for Amino-Acid Transporters in vivo. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1 sept 2009;29(9):1491-502.
226. Urich E, Lazic SE, Molnos J, Wells I, Freskga PO. Transcriptional Profiling of Human Brain Endothelial Cells Reveals Key Properties Crucial for Predictive In Vitro Blood-Brain Barrier Models. *PLoS ONE*. 2012;7(5):16.
227. Hupe M, Li MX, Kneitz S, Davydova D, Yokota C, Kele J, et al. Gene expression profiles of brain endothelial cells during embryonic development at bulk and single-cell levels. *Sci Signal* [Internet]. 11 juill 2017 [cité 2 mai 2021];10(487). Disponible sur: <https://stke.sciencemag.org/content/10/487/eaag2476>
228. Goodall EF, Leach V, Wang C, Cooper-Knock J, Heath PR, Baker D, et al. Age-Associated mRNA and miRNA Expression Changes in the Blood-Brain Barrier. *Int J Mol Sci*. janv 2019;20(12):3097.
229. Spaethling JM, Na YJ, Lee J, Ulyanova AV, Baltuch GH, Bell TJ, et al. Primary cell culture of live neurosurgically-resected aged adult human brain cells and single cell transcriptomics. *Cell Rep*. 17 janv 2017;18(3):791-803.
230. Dusart P, Hallström BM, Renné T, Odeberg J, Uhlén M, Butler LM. A Systems-Based Map of Human Brain Cell-Type Enriched Genes and Malignancy-Associated Endothelial Changes. *Cell Rep*. 5 nov 2019;29(6):1690-1706.e4.
231. Wolburg H, Noell S, Fallier-Becker P, Mack AF, Wolburg-Buchholz K. The disturbed blood–brain barrier in human glioblastoma. *Mol Aspects Med*. 1 oct 2012;33(5):579-89.
232. Luo H, Shusta EV. Blood–Brain Barrier Modulation to Improve Glioma Drug Delivery. *Pharmaceutics* [Internet]. 12 nov 2020 [cité 1 mars 2021];12(11). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7697580/>
233. Colclough N, Chen K, Johnström P, Fridén M, McGinnity DF. Building on the success of osimertinib: achieving CNS exposure in oncology drug discovery. *Drug Discov Today*. 1 mai 2019;24(5):1067-73.
234. Jambusaria A, Hong Z, Zhang L, Srivastava S, Jana A, Toth PT, et al. Endothelial heterogeneity across distinct vascular beds during homeostasis and inflammation. *eLife* [Internet]. [cité 1 mai 2021];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7002042/>
235. Dando SJ, Mackay-Sim A, Norton R, Currie BJ, St. John JA, Ekberg JAK, et al. Pathogens Penetrating the Central Nervous System: Infection Pathways and the Cellular and Molecular Mechanisms of Invasion. *Clin Microbiol Rev*. oct 2014;27(4):691-726.
236. McCall RL, Cacaccio J, Wrabel E, Schwartz ME, Coleman TP, Sirianni RW. Pathogen-inspired drug delivery to the central nervous system. *Tissue Barriers*. 8 août 2014;2(4):e944449.

237. Jiménez-Munguía I, Tomečková Z, Mochnáčová E, Bhide K, Majerová P, Bhide M. Transcriptomic analysis of human brain microvascular endothelial cells exposed to laminin binding protein (adhesion lipoprotein) and *Streptococcus pneumoniae*. *Sci Rep* [Internet]. 12 avr 2021 [cité 5 mai 2021];11. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8041795/>
238. Huang Q, Chan KY, Tobey IG, Chan YA, Poterba T, Boutros CL, et al. Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids. *PLoS ONE*. 14 nov 2019;14(11):e0225206.
239. Zhang W, Liu QY, Haqqani AS, Leclerc S, Liu Z, Fauteux F, et al. Differential expression of receptors mediating receptor-mediated transcytosis (RMT) in brain microvessels, brain parenchyma and peripheral tissues of the mouse and the human. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 22 juill 2020 [cité 8 mai 2021];17. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7376922/>
240. Shusta EV, Zhu C, Boado RJ, Pardridge WM. Subtractive Expression Cloning Reveals High Expression of CD46 at the Blood-Brain Barrier. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1 juill 2002;61(7):597-604.
241. Huntley MA, Bien-Ly N, Daneman R, Watts RJ. Dissecting gene expression at the blood-brain barrier. *Front Neurosci*. 6 nov 2014;8:355.
242. Jiang L, Wang M, Lin S, Jian R, Li X, Chan J, et al. A Quantitative Proteome Map of the Human Body. *Cell*. 1 oct 2020;183(1):269-283.e19.
243. Li J, Mäger I, Johansson HJ, Lenter M, Hildebrandt T, Leparç G, et al. Proteomic and transcriptomic study to identify membrane proteins highly enriched in brain, lung and liver microvascular endothelial cells using human primary cultures. *Scientific reports*, manuscript in preparation.
244. Haqqani AS, Stanimirovic DB. Chapter 73 - Proteomes and Biomarkers of the Neurovascular Unit. In: Caplan LR, Biller J, Leary MC, Lo EH, Thomas AJ, Yenari M, et al., éditeurs. *Primer on Cerebrovascular Diseases (Second Edition)* [Internet]. San Diego: Academic Press; 2017 [cité 21 oct 2021]. p. 346-50. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128030585000734>
245. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 23 janv 2015;347(6220):1260419.
246. Wang. A deep proteome and transcriptome abundance atlas of 29 healthy human tissues. *Mol Syst Biol*. 1 févr 2019;15(2):e8503.
247. Lu Q, Murugesan N, Macdonald JA, Wu SL, Pachter JS, Hancock WS. Analysis of mouse brain microvascular endothelium using immuno-laser capture microdissection coupled to a hybrid linear ion trap with Fourier transform-mass spectrometry proteomics platform. *ELECTROPHORESIS*. 2008;29(12):2689-95.
248. Uchida Y, Ohtsuki S, Katsukura Y, Ikeda C, Suzuki T, Kamiie J, et al. Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J Neurochem*. 2011;117(2):333-45.

249. Chun HB, Scott M, Niessen S, Hoover H, Baird A, Yates J, et al. The proteome of mouse brain microvessel membranes and basal lamina. *J Cereb Blood Flow Metab.* déc 2011;31(12):2267-81.
250. Pottiez G, Duban-Deweere S, Deracinois B, Gosselet F, Camoin L, Hachani J, et al. A differential proteomic approach identifies structural and functional components that contribute to the differentiation of brain capillary endothelial cells. *J Proteomics.* 21 déc 2011;75(2):628-41.
251. Ohtsuki S, Ikeda C, Uchida Y, Sakamoto Y, Miller F, Glacial F, et al. Quantitative Targeted Absolute Proteomic Analysis of Transporters, Receptors and Junction Proteins for Validation of Human Cerebral Microvascular Endothelial Cell Line hCMEC/D3 as a Human Blood–Brain Barrier Model. *Mol Pharm.* 7 janv 2013;10(1):289-96.
252. Sato K, Tachikawa M, Watanabe M, Miyauchi E, Uchida Y, Terasaki T. Identification of Blood–Brain Barrier-Permeable Proteins Derived from a Peripheral Organ: In Vivo and in Vitro Evidence of Blood-to-Brain Transport of Creatine Kinase. *Mol Pharm.* 7 janv 2019;16(1):247-57.
253. Ohtsuki S, Terasaki T. 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.* 1 sept 2007;24(9):1745-58.
254. Kamiie J, Ohtsuki S, Iwase R, Ohmine K, Katsukura Y, Yanai K, et al. Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria. *Pharm Res.* juin 2008;25(6):1469-83.
255. Uchida Y, Tachikawa M, Obuchi W, Hoshi Y, Tomioka Y, Ohtsuki S, et al. A study protocol for quantitative targeted absolute proteomics (QTAP) by LC-MS/MS: application for inter-strain differences in protein expression levels of transporters, receptors, claudin-5, and marker proteins at the blood–brain barrier in ddY, FVB, and C57BL/6J mice. *Fluids Barriers CNS.* 8 juin 2013;10(1):21.
256. Uchida Y, Tachikawa M, Ohtsuki S, Terasaki T. Blood–Brain Barrier (BBB) Pharmacoproteomics: A New Research Field Opened Up by Quantitative Targeted Absolute Proteomics (QTAP). In: Hammarlund-Udenaes M, de Lange ECM, Thorne RG, éditeurs. *Drug Delivery to the Brain: Physiological Concepts, Methodologies and Approaches* [Internet]. New York, NY: Springer; 2014 [cité 20 juill 2022]. p. 63-100. (AAPS Advances in the Pharmaceutical Sciences Series). Disponible sur: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9105-7_3
257. Ito K, Uchida Y, Ohtsuki S, Aizawa S, Kawakami H, Katsukura Y, et al. Quantitative Membrane Protein Expression at the Blood–Brain Barrier of Adult and Younger Cynomolgus Monkeys. *J Pharm Sci.* 1 sept 2011;100(9):3939-50.
258. Hoshi Y, Uchida Y, Tachikawa M, Inoue T, Ohtsuki S, Terasaki T. Quantitative Atlas of Blood–Brain Barrier Transporters, Receptors, and Tight Junction Proteins in Rats and Common Marmoset. *J Pharm Sci.* 1 sept 2013;102(9):3343-55.
259. Gomez-Zepeda D, Taghi M, Smirnova M, Sargent P, Liu WQ, Chhuon C, et al. LC–MS/MS-based quantification of efflux transporter proteins at the BBB. *J Pharm Biomed Anal.* 5 févr 2019;164:496-508.
260. Agarwal S, Uchida Y, Mittapalli RK, Sane R, Terasaki T, Elmquist WF. Quantitative Proteomics of Transporter Expression in Brain Capillary Endothelial Cells Isolated from P-

Glycoprotein (P-gp), Breast Cancer Resistance Protein (Bcrp), and P-gp/Bcrp Knockout Mice. *Drug Metab Dispos.* 1 juin 2012;40(6):1164-9.

261. Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F, Scherrmann JM. Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein *Abcg2* at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res.* 1 mai 2004;64(9):3296-301.
262. Al Feteisi H, Al-Majdoub ZM, Achour B, Couto N, Rostami-Hodjegan A, Barber J. Identification and quantification of blood–brain barrier transporters in isolated rat brain microvessels. *J Neurochem.* 2018;146(6):670-85.
263. Al-Majdoub ZM. Proteomic Quantification of Human Blood–Brain Barrier SLC and ABC Transporters in Healthy Individuals and Dementia Patients | *Molecular Pharmaceutics* [Internet]. 2019 [cité 2 mai 2021]. Disponible sur: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.8b01189>
264. Saubaméa B, Cochois-Guégan V, Cisternino S, Scherrmann JM. Heterogeneity in the rat brain vasculature revealed by quantitative confocal analysis of endothelial barrier antigen and P-glycoprotein expression. *J Cereb Blood Flow Metab.* janv 2012;32(1):81-92.
265. Badhwar A, Stanimirovic DB, Hamel E, Haqqani AS. The proteome of mouse cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* juin 2014;34(6):1033-46.
266. Pottiez G, Deracinois B, Duban-Deweere S, Cecchelli R, Fenart L, Karamanos Y, et al. A large-scale electrophoresis- and chromatography-based determination of gene expression profiles in bovine brain capillary endothelial cells after the re-induction of blood-brain barrier properties. *Proteome Sci.* 15 nov 2010;8(1):57.
267. Haqqani AS, Delaney CE, Tremblay TL, Sodja C, Sandhu JK, Stanimirovic DB. Method for isolation and molecular characterization of extracellular microvesicles released from brain endothelial cells. *Fluids Barriers CNS.* 10 janv 2013;10(1):4.
268. Horvat R, Hovorka A, Dekan G, Poczewski H, Kerjaschki D. Endothelial cell membranes contain podocalyxin--the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *J Cell Biol.* 1 févr 1986;102(2):484-91.
269. Ghandour MS, Langley OK, Zhu XL, Waheed A, Sly WS. Carbonic anhydrase IV on brain capillary endothelial cells: a marker associated with the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci.* 1 août 1992;89(15):6823-7.
270. Cornford EM, Hyman S. Localization of Brain Endothelial Luminal and Abluminal Transporters with Immunogold Electron Microscopy. *NeuroRX.* 1 janv 2005;2(1):27-43.
271. Kubo Y. Quantitative Determination of Luminal and Abluminal Membrane Distributions of Transporters in Porcine Brain Capillaries by Plasma Membrane Fractionation and Quantitative Targeted Proteomics - *ScienceDirect* [Internet]. 2015 [cité 12 nov 2021]. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354916300855?via%3Dihub>
272. Testa JE, Chrastina A, Li Y, Oh P, Schnitzer JE. Ubiquitous yet Distinct Expression of Podocalyxin on Vascular Surfaces in Normal and Tumor Tissues in the Rat. *J Vasc Res.* 2009;46(4):311-24.
273. Wang XX, Cho YK, Shusta EV. Mining a Yeast Library for Brain Endothelial Cell-Binding Antibodies. *Nat Methods.* févr 2007;4(2):143-5.

274. Huang J, Ru B, Dai P. Bioinformatics Resources and Tools for Phage Display. *Molecules*. janv 2011;16(1):694-709.
275. Bazan J, Całkosiński I, Gamian A. Phage display—A powerful technique for immunotherapy. *Hum Vaccines Immunother*. 1 déc 2012;8(12):1817-28.
276. Pasqualini R, Ruoslahti E. Organ targeting In vivo using phage display peptide libraries. *Nature*. mars 1996;380(6572):364-6.
277. van Rooy I, Cakir-Tascioglu S, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Storm G, et al. Identification of Peptide Ligands for Targeting to the Blood-Brain Barrier. *Pharm Res*. 2010;27(4):673-82.
278. Li J, Feng L, Fan L, Zha Y, Guo L, Zhang Q, et al. Targeting the brain with PEG–PLGA nanoparticles modified with phage-displayed peptides. *Biomaterials*. 1 juill 2011;32(21):4943-50.
279. Smith MW, Al-Jayyousi G, Gumbleton M. Peptide sequences mediating tropism to intact blood–brain barrier: An in vivo biodistribution study using phage display. *Peptides*. 1 nov 2012;38(1):172-80.
280. Majerova P, Hanes J, Olesova D, Sinsky J, Pilipcinec E, Kovac A. Novel Blood–Brain Barrier Shuttle Peptides Discovered through the Phage Display Method. *Molecules* [Internet]. 17 févr 2020 [cité 8 mai 2021];25(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7070575/>
281. Yamaguchi S, Ito S, Masuda T, Couraud PO, Ohtsuki S. Novel cyclic peptides facilitating transcellular blood-brain barrier transport of macromolecules in vitro and in vivo. *J Controlled Release*. 10 mai 2020;321:744-55.
282. Zhang X, Chai Z, Lee Dobbins A, Itano MS, Askew C, Miao Z, et al. Customized blood-brain barrier shuttle peptide to increase AAV9 vector crossing the BBB and augment transduction in the brain. *Biomaterials*. 1 févr 2022;281:121340.
283. Tanha J, Muruganandam A, Stanimirovic D. Phage Display Technology for Identifying Specific Antigens on Brain Endothelial Cells. In: Nag S, éditeur. *The Blood-Brain Barrier: Biology and Research Protocols* [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 2003 [cité 20 oct 2021]. p. 435-49. (Methods in Molecular Medicine™). Disponible sur: <https://doi.org/10.1385/1-59259-419-0:435>
284. Muruganandam A, Tanha J, Narang S, Stanimirovic D. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transigrate across human blood-brain barrier endothelium. *FASEB J*. 2002;16(2):1-22.
285. Abulrob A, Sprong H, Stanimirovic D. The blood–brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J Neurochem*. 2005;14.
286. Abulrob A, Zhang J, Tanha J, MacKenzie R, Stanimirovic D. Single domain antibodies as blood–brain barrier delivery vectors. *Int Congr Ser*. 1 avr 2005;1277:212-23.
287. Webster CI, Caram-Salas N, Haqqani AS, Thom G, Brown L, Rennie K, et al. Brain penetration, target engagement, and disposition of the blood-brain barrier-crossing bispecific antibody antagonist of metabotropic glutamate receptor type 1. *FASEB J*. 2016;30(5):1927-40.

288. Thom G, Hatcher J, Hearn A, Paterson J, Rodrigo N, Beljean A, et al. Isolation of blood-brain barrier-crossing antibodies from a phage display library by competitive elution and their ability to penetrate the central nervous system. *mAbs*. 14 déc 2017;10(2):304-14.
289. Georgieva JV, Goulatis LI, Stutz CC, Canfield SG, Song HW, Gastfriend BD, et al. Antibody screening using a human iPSC-based blood-brain barrier model identifies antibodies that accumulate in the CNS. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. sept 2020;34(9):12549-64.
290. Cho YK, Chen I, Wei X, Li L, Shusta EV. A Yeast Display Immunoprecipitation Method for Efficient Isolation and Characterization of Antigens. *J Immunol Methods*. 28 févr 2009;341(1-2):117-26.
291. Poul MA, Becerril B, Nielsen UB, Morisson P, Marks JD. Selection of tumor-specific internalizing human antibodies from phage libraries. Edited by J. Karn. *J Mol Biol*. 1 sept 2000;301(5):1149-61.
292. Pardridge WM, Yang J, Eisenberg J, Mietus LJ. Antibodies to Blood—Brain Barrier Bind Selectively to Brain Capillary Endothelial Lateral Membranes and to a 46K Protein. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1 avr 1986;6(2):203-11.
293. Shusta EV, Boado RJ, Pardridge WM. Vascular Proteomics and Subtractive Antibody Expression Cloning*. *Mol Cell Proteomics*. 1 janv 2002;1(1):75-82.
294. Shusta EV, Li JY, Boado RJ, Pardridge WM. The Ro52/SS-A autoantigen has elevated expression at the brain microvasculature. *Neuroreport*. 6 oct 2003;14(14):1861-5.
295. Shusta EV. Blood-brain barrier genomics, proteomics, and new transporter discovery. *NeuroRX*. 1 janv 2005;2(1):151-61.
296. Agarwal N, Lippmann ES, Shusta EV. Identification and expression profiling of blood–brain barrier membrane proteins. *J Neurochem*. 2010;112(3):625-35.
297. Udani M, Zen Q, Cottman M, Leonard N, Jefferson S, Daymont C, et al. Basal cell adhesion molecule/lutheran protein. The receptor critical for sickle cell adhesion to laminin. *J Clin Invest*. 1 juin 1998;101(11):2550-8.
298. Boado RJ, Li JY, Pardridge WM. Selective Lutheran Glycoprotein Gene Expression at the Blood—Brain Barrier in Normal Brain and in Human Brain Tumors. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1 juill 2000;20(7):1096-102.
299. Takeda T, Go WY, Orlando RA, Farquhar MG. Expression of Podocalyxin Inhibits Cell–Cell Adhesion and Modifies Junctional Properties in Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Mol Biol Cell*. 1 sept 2000;11(9):3219-32.
300. Horvath TL, Warden CH, Hajos M, Lombardi A, Goglia F, Diano S. Brain Uncoupling Protein 2: Uncoupled Neuronal Mitochondria Predict Thermal Synapses in Homeostatic Centers. *J Neurosci*. 1 déc 1999;19(23):10417-27.
301. Paradis É, Clavel S, Bouillaud F, Ricquier D, Richard D. Uncoupling protein 2: a novel player in neuroprotection. *Trends Mol Med*. 1 déc 2003;9(12):522-5.
302. Andrews ZB, Diano S, Horvath TL. Mitochondrial uncoupling proteins in the cns: in support of function and survival. *Nat Rev Neurosci*. nov 2005;6(11):829-40.

303. Cubelos B, González-González IM, Giménez C, Zafra F. Amino acid transporter SNAT5 localizes to glial cells in the rat brain. *Glia*. 15 janv 2005;49(2):230-44.
304. Lajoie JM, Katt ME, Waters EA, Herrin BR, Shusta EV. Identification of lamprey variable lymphocyte receptors that target the brain vasculature. *Sci Rep*. 11 avr 2022;12(1):6044.
305. Stone NL, England TJ, O'Sullivan SE. A Novel Transwell Blood Brain Barrier Model Using Primary Human Cells. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 6 juin 2019 [cité 8 mars 2021];13. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6563620/>
306. Stewart PA, Magliocco M, Hayakawa K, Farrell CL, Del Maestro RF, Girvin J, et al. A quantitative analysis of blood-brain barrier ultrastructure in the aging human. *Microvasc Res*. 1 mars 1987;33(2):270-82.
307. Banks WA, Reed MJ, Logsdon AF, Rhea EM, Erickson MA. Healthy aging and the blood-brain barrier. *Nat Aging*. mars 2021;1(3):243-54.
308. Munji RN, Soung AL, Weiner GA, Sohet F, Semple BD, Trivedi A, et al. Profiling the mouse brain endothelial transcriptome in health and disease models reveals a core blood-brain barrier dysfunction module. *Nat Neurosci*. nov 2019;22(11):1892-902.
309. Lochhead JJ, Yang J, Ronaldson PT, Davis TP. Structure, Function, and Regulation of the Blood-Brain Barrier Tight Junction in Central Nervous System Disorders. *Front Physiol* [Internet]. 6 août 2020 [cité 2 mars 2021];11. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7424030/>
310. Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*. 19 nov 2015;163(5):1064-78.
311. Israelov H, Ravid O, Atrakchi D, Rand D, Elhaik S, Bresler Y, et al. Caspase-1 has a critical role in blood-brain barrier injury and its inhibition contributes to multifaceted repair. *J Neuroinflammation* [Internet]. 9 sept 2020 [cité 1 mars 2021];17. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7488082/>
312. Mahamar A, Attaher O, Swihart B, Barry A, Diarra BS, Kanoute MB, et al. Host factors that modify *Plasmodium falciparum* adhesion to endothelial receptors. *Sci Rep*. 24 oct 2017;7(1):13872.
313. Chakraborty S, ValiyaVeetil M, Sadagopan S, Paudel N, Chandran B. c-Cbl-mediated selective virus-receptor translocations into lipid rafts regulate productive Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection in endothelial cells. *J Virol*. déc 2011;85(23):12410-30.
314. Coureuil M, Lécuyer H, Bourdoulous S, Nassif X. A journey into the brain: insight into how bacterial pathogens cross blood-brain barriers. *Nat Rev Microbiol*. mars 2017;15(3):149-59.
315. Sinha B, François PP, Nüsse O, Foti M, Hartford OM, Vaudaux P, et al. Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5\beta 1$. *Cell Microbiol*. sept 1999;1(2):101-17.
316. Gril B, Paranjape AN, Woditschka S, Hua E, Dolan EL, Hanson J, et al. Reactive astrocytic S1P3 signaling modulates the blood-tumor barrier in brain metastases. *Nat Commun*. 13 juill 2018;9(1):2705.

317. Gril B, Wei D, Zimmer AS, Robinson C, Khan I, Difilippantonio S, et al. HER2 antibody-drug conjugate controls growth of breast cancer brain metastases in hematogenous xenograft models, with heterogeneous blood–tumor barrier penetration unlinked to a passive marker. *Neuro-Oncol.* 26 nov 2020;22(11):1625-36.
318. Griffith JI, Sarkaria JN, Elmquist WF. Efflux Limits Tumor Drug Delivery Despite Disrupted BBB. *Trends Pharmacol Sci* [Internet]. 15 mars 2021 [cité 19 avr 2021]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165614721000481>
319. Tashima T. Smart Strategies for Therapeutic Agent Delivery into Brain across the Blood–Brain Barrier Using Receptor-Mediated Transcytosis. *Chem Pharm Bull.* 2020;68(4):10.
320. Lv T, Zhao B, Hu Q, Zhang X. The Glymphatic System: A Novel Therapeutic Target for Stroke Treatment. *Front Aging Neurosci.* 8 juill 2021;13:689098.
321. Lin L, Wu Y, Chen Z, Huang L, Wang L, Liu L. Severe Hypoglycemia Contributing to Cognitive Dysfunction in Diabetic Mice Is Associated With Pericyte and Blood–Brain Barrier Dysfunction. *Front Aging Neurosci.* 26 nov 2021;13:775244.
322. Mowry FE, Peaden SC, Stern JE, Biancardi VC. TLR4 and AT1R mediate blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, and autonomic dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacol Res.* 1 déc 2021;174:105877.
323. Taler M, Mekori–Domachevsky E, Vergaelen E, Claes S, Serur Y, Dar S, et al. Blood brain barrier permeability increases with age in individuals with 22q11.2 deletion syndrome. *World J Biol Psychiatry.* 2 déc 2021;0(ja):1-26.
324. Perrière N, Yousif S, Cazaubon S, Chaverot N, Bourasset F, Cisternino S, et al. A functional in vitro model of rat blood–brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res.* 30 mai 2007;1150:1-13.
325. Zhang W, Teske N, Samadi M, Sarem M, Shastri VP. Unraveling the role of β 1 integrin isoforms in cRGD-mediated uptake of nanoparticles bearing hydrophilized alkyne moieties in epithelial and endothelial cells. *Acta Biomater.* 15 oct 2020;116:344-55.
326. Hartz AMS, Schulz JA, Sokola BS, Edelmann SE, Shen AN, Rempe RG, et al. Isolation of Cerebral Capillaries from Fresh Human Brain Tissue. *J Vis Exp JoVE.* 12 sept 2018;(139):57346.
327. Maciag T, Kadish J, Wilkins L, Stemerman MB, Weinstein R. Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol.* sept 1982;94(3):511-20.
328. Chaves C, Campanelli F, Chapy H, Gomez-Zepeda D, Glacial F, Smirnova M, et al. An Interspecies Molecular and Functional Study of Organic Cation Transporters at the Blood-Brain Barrier: From Rodents to Humans. *Pharmaceutics* [Internet]. 28 mars 2020 [cité 2 mars 2021];12(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7238036/>
329. Luo H, Saubamea B, Chasseigneaux S, Cochois V, Smirnova M, Glacial F, et al. Molecular and Functional Study of Transient Receptor Potential Vanilloid 1-4 at the Rat and Human Blood–Brain Barrier Reveals Interspecies Differences. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 11 nov 2020 [cité 1 mars 2021];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7686441/>
330. Gericke B, Römermann K, Noack A, Noack S, Kronenberg J, Blasig IE, et al. A face-to-face comparison of claudin-5 transduced human brain endothelial (hCMEC/D3) cells with porcine brain endothelial cells as blood–brain barrier models for drug transport studies. *Fluids Barriers*

CNS [Internet]. 26 août 2020 [cité 1 mars 2021];17. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7449095/>

331. Bernard A, Lubbers LS, Tanis KQ, Luo R, Podtelezhnikov AA, Finney EM, et al. Transcriptional Architecture of the Primate Neocortex. *Neuron*. 22 mars 2012;73(6):1083-99.
332. Pardridge WM. Blood-Brain Barrier Transport, Plasma Pharmacokinetics, and Neuropathology Following Chronic Treatment of the Rhesus Monkey with a Brain Penetrating Humanized Monoclonal Antibody Against the Human Transferrin Receptor. *Mol Pharm*. 2018;10.
333. Bien-Ly N, Yu YJ, Bumbaca D, Elstrott J, Boswell CA, Zhang Y, et al. Transferrin receptor (Tf R) trafficking determines brain uptake of Tf R antibody affinity variants. 2014;211(2):12.
334. Cucullo L, Hossain M, Tierney W, Janigro D. A new dynamic in vitro modular capillaries-venules modular system: Cerebrovascular physiology in a box. *BMC Neurosci*. 6 févr 2013;14:18.
335. Lippmann ES, Al-Ahmad A, Palecek SP, Shusta EV. Modeling the blood–brain barrier using stem cell sources. *Fluids Barriers CNS*. 10 janv 2013;10:2.
336. Ribecco-Lutkiewicz M, Sodja C, Haukenfrers J, Haqqani AS, Ly D, Zachar P, et al. A novel human induced pluripotent stem cell blood-brain barrier model: Applicability to study antibody-triggered receptor-mediated transcytosis. *Sci Rep [Internet]*. 30 janv 2018 [cité 23 avr 2021];8. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5789839/>
337. Lauschke K, Frederiksen L, Hall VJ. Paving the Way Toward Complex Blood-Brain Barrier Models Using Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 15 juin 2017;26(12):857-74.
338. Ito S, Oishi M, Ogata S, Uemura T, Couraud PO, Masuda T, et al. Identification of Cell-Surface Proteins Endocytosed by Human Brain Microvascular Endothelial Cells In Vitro. *Pharmaceutics [Internet]*. 23 juin 2020 [cité 2 mars 2021];12(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7356521/>
339. Fridén M, Winiwarter S, Jerndal G, Bengtsson O, Wan H, Bredberg U, et al. Structure–Brain Exposure Relationships in Rat and Human Using a Novel Data Set of Unbound Drug Concentrations in Brain Interstitial and Cerebrospinal Fluids. *J Med Chem*. 22 oct 2009;52(20):6233-43.
340. Özgür B, Saaby L, Janfelt C, Langthaler K, Eneberg E, Jacobsen AM, et al. Screening novel CNS drug candidates for P-glycoprotein interactions using the cell line iP-gp: In vitro efflux ratios from iP-gp and MDCK-MDR1 monolayers compared to brain distribution data from mice. *Eur J Pharm Biopharm*. 1 déc 2021;169:211-9.
341. Stanimirovic DB, Bani-Yaghoub M, Perkins M, Haqqani AS. Blood–brain barrier models: in vitro to in vivo translation in preclinical development of CNS-targeting biotherapeutics. *Expert Opin Drug Discov*. 1 févr 2015;10(2):141-55.
342. Haqqani AS, Delaney CE, Brunette E, Baumann E, Farrington GK, Sisk W, et al. Endosomal trafficking regulates receptor-mediated transcytosis of antibodies across the blood brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. avr 2018;38(4):727-40.
343. Garberg P, Ball M, Borg N, Cecchelli R, Fenart L, Hurst RD, et al. In vitro models for the blood–brain barrier. *Toxicol In Vitro*. 1 avr 2005;19(3):299-334.

344. Goldeman C, Ozgür B, Brodin B. Culture-induced changes in mRNA expression levels of efflux and SLC-transporters in brain endothelial cells. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 22 avr 2020 [cité 2 mars 2021];17. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7178567/>
345. Pandit R, Chen L, Götz J. The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1 janv 2020;165-166:1-14.
346. Michalicova A, Majerova P, Kovac A. Tau Protein and Its Role in Blood–Brain Barrier Dysfunction. *Front Mol Neurosci* [Internet]. 30 sept 2020 [cité 1 mars 2021];13. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7554615/>
347. Bourassa P, Alata W, Tremblay C, Paris-Robidas S, Calon F. Transferrin Receptor-Mediated Uptake at the Blood–Brain Barrier Is Not Impaired by Alzheimer’s Disease Neuropathology. *Mol Pharm.* 4 févr 2019;16(2):583-94.
348. Yu YJ, Watts RJ. Developing therapeutic antibodies for neurodegenerative disease. *Neurother J Am Soc Exp Neurother.* juill 2013;10(3):459-72.
349. Mitsui S, Osako Y, Yuri K. Mental retardation-related protease, motopsin (prss12), binds to the BRICHOS domain of the integral membrane protein 2a. *Cell Biol Int.* 2014;7.
350. Cegarra C, Chaves C, Déon C, Do TM, Dumas B, Frenzel A, et al. Exploring ITM2A as a new potential target for brain delivery. *Fluids Barriers CNS.* 21 mars 2022;19(1):25.
351. Bangsow T, Baumann E, Bangsow C, Jaeger MH, Pelzer B, Gruhn P, et al. The Epithelial Membrane Protein 1 is a Novel Tight Junction Protein of the Blood—Brain Barrier. 2008;12.
352. Johnson ECB, Carter EK, Dammer EB, Duong DM, Gerasimov ES, Liu Y, et al. Large-scale deep multi-layer analysis of Alzheimer’s disease brain reveals strong proteomic disease-related changes not observed at the RNA level. *Nat Neurosci.* févr 2022;25(2):213-25.
353. Samaha HS, Pignata A, Byrd T, Stossi F, Lam F, Shum T, et al. Targeted Gene and Cell Therapies for Cancer. :2.
354. Williams DW, Anastos K, Morgello S, Berman JW. JAM-A and ALCAM are therapeutic targets to inhibit diapedesis across the BBB of CD14+CD16+ monocytes in HIV-infected individuals. *J Leukoc Biol.* févr 2015;97(2):401-12.
355. Tanti GK, Singarapu N, Muthuswami R, Goswami SK. Among the three striatin family members, SG2NA was first to arise during evolution. *Front Biosci Sch Ed.* 1 janv 2014;6:1-15.
356. Kang S, Lee S, Park S. iRGD Peptide as a Tumor-Penetrating Enhancer for Tumor-Targeted Drug Delivery. *Polymers* [Internet]. 24 août 2020 [cité 8 mai 2021];12(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7563641/>
357. Bass MD, Williamson RC, Nunan RD, Humphries JD, Byron A, Morgan MR, et al. A syndecan-4 hair trigger initiates wound healing through cavéolin- and RhoG-regulated integrin endocytosis. *Dev Cell.* 18 oct 2011;21(4):681-93.
358. Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis.* 1 nov 2008;32(2):200-19.

359. Schnittert J, Bansal R, Storm G, Prakash J. Integrins in wound healing, fibrosis and tumor stroma: High potential targets for therapeutics and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* avr 2018;129:37-53.
360. Moreno-Layseca P, Icha J, Hamidi H, Ivaska J. Integrin trafficking in cells and tissues. *Nat Cell Biol.* févr 2019;21(2):122-32.
361. Blystone. Integrin alpha v beta 3 differentially regulates adhesive and phagocytic functions of the fibronectin receptor alpha 5 beta 1. *J Cell Biol.* 2 nov 1994;127(4):1129-37.
362. Magnussen SN, Toraskar J, Wilhelm I, Hasko J, Figenschau SL, Molnar J, et al. Nephronectin promotes breast cancer brain metastatic colonization via its integrin-binding domains. *Sci Rep [Internet].* 22 juill 2020 [cité 2 mars 2021];10. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7376038/>
363. Malin D, Strelakova E, Petrovic V, Deal AM, Ahmad AA, Adamo B, et al. α B-Crystallin: A Novel Regulator of Breast Cancer Metastasis to the Brain. *Clin Cancer Res.* 2013;13.
364. Hauck CR, Ohlsen K. Sticky connections: extracellular matrix protein recognition and integrin-mediated cellular invasion by *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Microbiol.* 1 févr 2006;9(1):5-11.
365. Ragnarsson EG, Schoultz I, Gullberg E, Carlsson AH, Tafazoli F, Lerm M, et al. *Yersinia pseudotuberculosis* induces transcytosis of nanoparticles across human intestinal villus epithelium via invasin-dependent macropinocytosis. *Lab Invest.* 2008;88:12.
366. Isberg RR, Barnes P. Subversion of integrins by enteropathogenic *Yersinia*. *J Cell Sci.* janv 2001;114(Pt 1):21-8.
367. Isberg RR, Hamburger Z, Dersch P. Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. *Microbes Infect.* juin 2000;2(7):793-801.
368. Isberg RR, Leong JM. Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell.* 9 mars 1990;60(5):861-71.
369. Plançon L, Friec SL, Gounon P, Jouve M, Guignot J, Servin A, et al. Recognition of the cellular β 1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of afa-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. *Cell Microbiol.* 2003;13.
370. Guignot J, Bernet-Camard MF, Poüs C, Plançon L, Le Bouguenec C, Servin AL. Polarized Entry of Uropathogenic Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli* Strain IH11128 into Human Epithelial Cells: Evidence for α 5 β 1 Integrin Recognition and Subsequent Internalization through a Pathway Involving Caveolae and Dynamic Unstable Microtubules. *Infect Immun.* mars 2001;69(3):1856-68.
371. Schwarz-Linek U, Höök M, Potts JR. The molecular basis of fibronectin-mediated bacterial adherence to host cells. *Mol Microbiol.* 2004;52(3):631-41.
372. Banerjee A, Kim BJ, Carmona EM, Cutting AS, Gurney MA, Carlos C, et al. Bacterial Pili exploit integrin machinery to promote immune activation and efficient blood-brain barrier penetration. *Nat Commun.* 6 sept 2011;2:462.
373. Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. α V β 5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med.* janv 1999;5(1):78-82.

374. Ivanenkov VV, Menon AG. Peptide-Mediated Transcytosis of Phage Display Vectors in MDCK Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;276(1):7.
375. Staquicini DI, Barbu EM, Zemans RL, Dray BK, Staquicini FI, Dogra P, et al. Targeted Phage Display-based Pulmonary Vaccination in Mice and Non-human Primates. *Med N Y N.* 12 mars 2021;2(3):321-42.
376. Cw S, Cs Y, Cs C, Ch H, Sy C. Multistage Continuous Targeting with Quantitatively Controlled Peptides on Chitosan-Lipid Nanoparticles with Multicore-Shell Nanoarchitecture for Enhanced Orally Administrated Anticancer In Vitro and In Vivo. *Macromol Biosci [Internet].* févr 2017 [cité 6 avr 2022];17(2). Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27634372/>
377. Liu C, Shan W, Liu M, Zhu X, Xu J, Xu Y, et al. A novel ligand conjugated nanoparticles for oral insulin delivery. *Drug Deliv.* :12.
378. Xu Y, Xu J, Shan W, Liu M, Cui Y, Li L, et al. The transport mechanism of integrin $\alpha\beta 3$ receptor targeting nanoparticles in Caco-2 cells. *Int J Pharm.* 16 mars 2016;500(1-2):42-53.
379. Kassa EG, Zlotkin-Rivkin E, Friedman G, Ramachandran RP, Melamed-Book N, Weiss AM, et al. Enteropathogenic *Escherichia coli* remodels host endosomes to promote endocytic turnover and breakdown of surface polarity. 2019;32.
380. Alfsen A, Yu H, Magérus-Chatinet A, Schmitt A, Bomsel M. HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol Biol Cell.* sept 2005;16(9):4267-79.
381. Ruan S, Xiao W, Hu C, Zhang H, Rao J, Wang S, et al. Ligand-Mediated and Enzyme-Directed Precise Targeting and Retention for the Enhanced Treatment of Glioblastoma. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2017;9(24):20348-60.
382. Deshayes de Cambronne R, Fouet A, Picart A, Bourrel AS, Anjou C, Bouvier G, et al. CC17 group B *Streptococcus* exploits integrins for neonatal meningitis development. *J Clin Invest.* 131(5):e136737.
383. Selewski DT, Shah GV, Segal BM, Rajdev PA, Mukherji SK. Natalizumab (Tysabri). *AJNR Am J Neuroradiol.* oct 2010;31(9):1588-90.
384. Nieri P, Donadio E, Rossi S, Adinolfi B, Podestà A. Antibodies for Therapeutic Uses and the Evolution of Biotechniques. 2009;27.
385. Kadry YA, Calderwood DA. Chapter 22: Structural and signaling functions of integrins. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 1 mai 2020;1862(5):183206.
386. Régent M, Planus E, Bouin AP, Bouvard D, Brunner M, Faurobert E, et al. Specificities of $\beta 1$ integrin signaling in the control of cell adhesion and adhesive strength. *Eur J Cell Biol.* mars 2011;90(2-3):261-9.
387. Byron A, Humphries JD, Askari JA, Craig SE, Mould AP, Humphries MJ. Anti-integrin monoclonal antibodies. *J Cell Sci.* 15 nov 2009;122(Pt 22):4009-11.
388. Hu Z, Luo F, Pan Y, Hou C, Ren L, Chen J, et al. Arg-Gly-Asp (RGD) peptide conjugated poly(lactic acid)-poly(ethylene oxide) micelle for targeted drug delivery. *J Biomed Mater Res A.* 2008;85A(3):797-807.

389. Chen X, Plasencia C, Hou Y, Neamati N. Synthesis and Biological Evaluation of Dimeric RGD Peptide–Paclitaxel Conjugate as a Model for Integrin-Targeted Drug Delivery. *J Med Chem.* 1 févr 2005;48(4):1098-106.
390. Li Z, Huang P, Zhang X, Lin J, Yang S, Liu B, et al. RGD-Conjugated Dendrimer-Modified Gold Nanorods for in Vivo Tumor Targeting and Photothermal Therapy. *Mol Pharm.* 1 févr 2010;7(1):94-104.
391. Jiang X. Integrin-facilitated transcytosis for enhanced penetration of advanced gliomas by poly(trimethylene carbonate)-based nanoparticles encapsulating paclitaxel. 2013;11.
392. Wei X, Gao J, Zhan C, Xie C, Chai Z, Ran D, et al. Liposome-based glioma targeted drug delivery enabled by stable peptide ligands. *J Controlled Release.* 2015;9.
393. Neburkova J, Hajek M, Rehor I, Schimer J, Sedlak F, Stursa J, et al. Targeting Glioma Cancer Cells with Fluorescent Nanodiamonds via Integrin Receptors. 2018;21.
394. Bazzoni G, Shih DT, Buck CA, Hemler ME. Monoclonal antibody 9EG7 defines a novel beta 1 integrin epitope induced by soluble ligand and manganese, but inhibited by calcium. *J Biol Chem.* 27 oct 1995;270(43):25570-7.
395. Humphries MJ. Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol.* 1 oct 1996;8(5):632-40.
396. Humphries MJ, Askari JA, Mould AP, Aota S ichi, Yamada KM, Irie A, et al. Defining the Topology of Integrin $\alpha 5\beta 1$ -Fibronectin Interactions Using Inhibitory Anti- $\alpha 5$ and Anti- $\beta 1$ Monoclonal Antibodies: EVIDENCE THAT THE SYNERGY SEQUENCE OF FIBRONECTIN IS RECOGNIZED BY THE AMINO-TERMINAL REPEATS OF THE $\alpha 5$ SUBUNIT*. *J Biol Chem.* 11 juill 1997;272(28):17283-92.
397. Demeule M, Beaudet N, Régina A, Besserer-Offroy É, Murza A, Tétreault P, et al. Conjugation of a brain-penetrant peptide with neurotensin provides antinociceptive properties. *J Clin Invest.* 3 mars 2014;124(3):1199-213.
398. Wouters Y, Jaspers T, De Strooper B, Dewilde M. Identification and in vivo characterization of a brain-penetrating nanobody. *Fluids Barriers CNS [Internet].* 14 oct 2020 [cité 23 avr 2021];17. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7556960/>