



**HAL**  
open science

# Expression et rôle des transporteurs ABCG4 et ABCA2 au niveau de la barrière hémato-encéphalique, chez la souris

Agnès Dodacki

► **To cite this version:**

Agnès Dodacki. Expression et rôle des transporteurs ABCG4 et ABCA2 au niveau de la barrière hémato-encéphalique, chez la souris. Pharmacologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2017. Français. NNT : 2017USPCB125 . tel-04274220

**HAL Id: tel-04274220**

**<https://theses.hal.science/tel-04274220v1>**

Submitted on 7 Nov 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.

**UNIVERSITE PARIS DESCARTES**

**Faculté de Pharmacie de Paris**

**Ecole Doctorale n°563 : MEDICAMENT, TOXICOLOGIE, CHIMIE et IMAGERIE**

Unité INSERM UMR-S 1144 : Variabilité de Réponse aux Psychotropes

Equipe de recherche : Physiopathologie et cibles thérapeutiques de la barrière hémato-encéphalique

**THESE DE DOCTORAT**

soutenue le 30 janvier 2017

**par Agnès Dodacki**

**Expression et rôle des transporteurs ABCG4 et  
ABCA2 au niveau de la barrière hémato-  
encéphalique, chez la Souris**

Composition du jury :

Olivier Fardel, Professeur, rapporteur

Fabien Gosselet, Professeur, rapporteur

Guylène Page, Professeur, examinatrice

Claire Paquet, Professeur, examinatrice

Jean-Michel Scherrmann, Professeur, directeur de thèse

Fanchon Bourasset, Maître de Conférences, co-encadrante

# Remerciements

La réalisation de mon travail de doctorat n'aurait pas pu aboutir sans le soutien et l'aide d'un grand nombre de personnes. Je tenais à les remercier pour tout ce qu'ils ont pu apporter au cours de ces trois années de doctorat.

Je souhaiterais tout d'abord remercier le Pr Olivier Fardel et le Pr Fabien Gosselet pour avoir bien voulu accepter d'être les rapporteurs de ma thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à lire ce manuscrit. Je remercie également les Pr Guylène Page et Claire Paquet pour avoir accepté d'être membres de mon jury de thèse.

Je remercie le Pr Jean-Michel Scherrmann pour avoir bien voulu être mon directeur de thèse. Merci pour votre aide et vos conseils notamment pour la rédaction des articles. Je remercie le Pr Jean-Louis Laplanche pour m'avoir donné la possibilité d'effectuer mon doctorat au sein de l'unité INSERM UMR-S 1144.

Mes remerciements vont tout particulièrement à Fanchon. Je voulais te remercier de m'avoir accueillie au sein de ton projet de recherche et de m'avoir encadrée, tout d'abord durant mon stage de Master 2 et ensuite durant mon doctorat. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir fait confiance pour pouvoir travailler sur ton projet durant cette longue période. J'ai été très heureuse de travailler avec toi. Je te remercie pour ta disponibilité, pour tous tes précieux conseils, pour ton soutien, pour ton aide, sans oublier pour tes relectures et corrections des articles et de la thèse. Je pense sincèrement que toutes tes qualités en tant que chercheuse mais surtout en tant que personne, ont pour beaucoup contribué à ce que mes trois années de thèse se soient passées le mieux possible. Un grand MERCI pour tout !!!

Je remercie également l'ensemble des membres de l'unité INSERM UMR-S 1144 et en particulier les personnes qui ont participé à la réalisation de ce travail :

Merci à notre gestionnaire, Ariane, sans qui le laboratoire ne fonctionnerait pas aussi bien. Merci pour ta réactivité et ton organisation !!

Merci aux filles de la Radiophar : A Sophie - pour toute ton aide dans la réalisation des manips et aussi pour tes nombreux gâteaux, bonbons, chocolats ... que tu as ramenés au labo ! A Maria – j'ai été très heureuse d'avoir pu faire ta connaissance. Nos pauses thés et nos conversations entre « gens de l'est » vont beaucoup me manquer ! A Murielle, notre anesthésiste de souris attirée ! A mes deux voisines de bureau, Hélène et Camille – Merci pour les bons moments passés !

Merci à l'équipe 3 pour votre bonne humeur et pour vos conseils: merci à Xavier, Salvatore, Stéphanie, Bruno, Véronique, Amina, et sans oublier ma belle Olivia !! Je voulais tout particulièrement te remercier David pour ton aide, ta gentillesse et surtout pour avoir bien voulu partager la recette secrète de ton délicieux guacamole !

Merci à mes deux doctorantes préférées de l'équipe 2, Anne-So et Caca. Je suis vraiment heureuse de vous connaître. Vous êtes des filles au top, sur lesquelles on peut vraiment compter. Ne changez pas ! Ma chère Anne-So adorée, je souhaitais notamment te remercier de nous avoir si bien accueillies dans ta ville parisienne, pour nos merveilleuses « journées glandage » ! Ma Caca, également adorée, n'oublie pas ces trois mots : Life is life !

Merci à mon Jevounet, pour ta bonne humeur, tes blagues et surtout pour tes besos pleins de paillettes-paillettes !

Merci aussi à toutes les autres personnes travaillant dans l'unité et aussi à Virginie qui fait pratiquement partie de l'unité ! Je ne pourrais pas tous vous citer. Mais je souhaite notamment remercier Lucie, Pierre-Alexis, Catarina, Sylvain, Nathalie, Cynthia ...

Un énorme MERCI à toi ma binôme, pour tout ton soutien. C'est très compliqué de résumer en quelques lignes tout ce que j'aimerais te dire, surtout que je n'ai pas mon inspiration à côté de moi ! Mais je vais quand même essayer ! Voilà déjà 8 ans qu'on se connaît et on peut dire qu'ensemble on en a vécu des choses bonnes ou mauvaises, qui ont renforcé encore plus notre amitié ! Je suis vraiment contente qu'un jour, par le plus pur des hasards, nous ayons toutes les deux ratées notre tout 1<sup>er</sup> cours de L1, ce jour-là a marqué le début de notre belle aventure ! Pour te remercier je t'ai préparé une magnifique métaphore, j'espère qu'elle te plaira ;-): c'est vrai qu'au départ nous parcourions le chemin de notre amitié sur un tricycle et que malheureusement nous avons perdu une roue en cours de route. Mais un tricycle avec une roue en moins, et bien c'est tout simplement un vélo et même si tu ne peux pas vraiment t'en rendre compte, crois-moi un vélo c'est tout aussi bien !! Pour conclure: #retard #téléfilm #cit&alzheimer #hashtag.

Enfin, tout ce travail n'aurait pas pu être réalisé sans la présence et le fort soutien de mes proches :

Je remercie mes « Krakowiaki » préférés : Alicja, Wojtek, Filipek i Pawcio. Merci pour tous ces bons moments partagés avec vous ! Merci aussi aux familles Stepa, Rarog et Pinaud !

Merci à mes amies les plus proches : Aneta et Martyna, Paulina (ma soeurette adorée) et à Célinou et Caro. Merci pour votre si longue et si belle amitié !

Bien entendu, tous mes remerciements vont à ma famille et en particulier à mes parents, mon frère, Agnès et bien entendu ma Lise adorée. C'est à vous que je dédie avec grande fierté cette thèse. Merci tout simplement d'être là, de me soutenir et de croire en moi comme vous le faites depuis toujours. Merci aussi à ma petite Lisou pour avoir bien voulu pointer le bout de ton joli petit nez à temps pour ma soutenance !

---

# RESUME de THESE

---

La barrière hémato-encéphalique (BHE) est la principale barrière séparant le sang du système nerveux central. Elle permet un contrôle strict des échanges entre le cerveau et le sang. La BHE est majoritairement constituée par les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, au niveau desquelles sont exprimées des jonctions serrées et des transporteurs membranaires d'efflux qui limitent fortement le passage de molécules endogènes ou exogènes à travers cette barrière. Les transporteurs d'efflux sont principalement représentés par les membres de la superfamille de protéines ATP-binding cassette (ABC). A ce jour, les transporteurs ABC exprimés à la BHE ne sont pas encore tous identifiés ou restent encore peu étudiés. C'est notamment le cas pour deux transporteurs de lipides, qui sont ABCA2 et ABCG4. Ces transporteurs semblent être impliqués dans des pathologies neurodégénératives telle la maladie d'Alzheimer (MA). La connaissance de leurs fonctions au niveau de la BHE pourrait permettre d'identifier des cibles physiopathologiques et/ou thérapeutiques. Ainsi, le but de ce travail de doctorat a été de caractériser ces deux transporteurs ABC à la BHE, chez la Souris.

Nous avons tout d'abord démontré l'expression de ces deux transporteurs sur des microvaisseaux isolés de souris par différentes méthodes d'étude dont la qRT-PCR et la protéomique quantitative absolue ciblée (QTAP). Nos études *in vivo* utilisant la technique de perfusion cérébrale *in situ* chez la souris, nous ont permis de montrer qu'Abcg4 et Abca2 étaient bien fonctionnels au niveau de la BHE, en tant que transporteurs d'efflux. Nous avons identifié des substrats endogènes (desmostérol et peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ )) et de nouveaux inhibiteurs d'Abcg4 (probucofol, L-thyroxine, estramustine). Nos données montrent que le peptide A $\beta$  est également substrat d'Abca2 et que le  $\beta$ -estradiol et l'estramustine peuvent inhiber cet efflux au niveau de la BHE, chez la souris. Ainsi, nos résultats ont permis de caractériser deux nouveaux transporteurs ABC fortement impliqués dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$ , venant s'ajouter aux deux autres transporteurs identifiés comme étant impliqués dans cet efflux cérébral, à savoir Abcb1 (P-glycoprotéine, P-gp) et Abcg2 (breast cancer resistance protein, Bcrp). L'efflux cérébral d'A $\beta$  met donc en jeu une coopération entre quatre transporteurs ABC dont les contributions respectives sont de 9%, 13%, 22% et 54% pour Abcb1, Abcg2, Abcg4 et Abca2, montrant qu'Abcg4 et Abca2 permettent à eux seuls l'efflux de près de 80% du peptide A $\beta$ .

En conclusion, grâce à ce travail, nous avons pu caractériser Abcg4 et Abca2 à la BHE de la souris, permettant ainsi de compléter la cartographie des transporteurs ABC fonctionnels à la BHE murine et d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques notamment pour la MA.

## TABLE DES MATIERES

Abréviations .....	2
Liste des figures et des tableaux .....	4
INTRODUCTION GENERALE .....	5
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
I. La barrière hémato-encéphalique .....	7
1. La structure de la barrière hémato-encéphalique .....	8
2. Mécanismes de transport à la barrière hémato-encéphalique.....	15
II. Les transporteurs ABC.....	19
1. Généralités .....	19
2. Les transporteurs ABC exprimés à la barrière-hémato encéphalique .....	21
3. Les transporteurs ABC potentiellement exprimés à la barrière hémato-encéphalique .....	33
4. Résumé.....	41
III. Les transporteurs SLC exprimés à la barrière hémato-encéphalique .....	42
1. Généralités .....	42
2. La famille OATP.....	42
IV. La maladie d'Alzheimer .....	45
1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer.....	45
2. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer .....	45
MATERIEL ET METHODES .....	64
I. Matériel .....	64
1. Animaux.....	64
II. Méthodes d'étude <i>in vivo</i> du transport à la barrière hémato-encéphalique .....	66
1. La technique de perfusion cérébrale <i>in situ</i> .....	66
2. Analyse des résultats.....	69
DISCUSSION GENERALE .....	153
1. Caractérisation des transporteurs Abcg4 et Abca2 à la BHE : implication dans le transport de molécules endogènes.....	153
2. Les acteurs de l'efflux cérébral du peptide A $\beta$ à travers la barrière hémato-encéphalique...	156
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES .....	163
ANNEXE .....	165
REFERENCES .....	187

# Abréviations

A $\beta$  :  $\beta$ -amyloïde

ABC : ATP-binding cassette

AGE : advanced glycation end products

AICD: APP intracellular domain

APH-1 : anterior pharynx-defective 1

APP: amyloid precursor protein

ATP : adénosine triphosphate

BACE1 : beta-site amyloid precursor protein cleaving-enzyme 1

BCRP: breast cancer resistance protein

BHE : barrière hémato-encéphalique

CAA : cerebral amyloid angiopathy

CE : cellule endothéliale

CECC : cellule endothéliale des capillaires cérébraux

Cl<sub>up</sub> : clairance d'entrée cérébrale

DHCR24 : 24-déhydrocholestérol réductase

DNF : dégénérescence neurofibrillaire

E2 : 17- $\beta$ -estradiol

ECE: enzyme de conversion de l'endothéline

FTDP-17 : Frontotemporal dementia with parkinsonism-17GLUT1 : glucose transporter 1

HDL : high density lipoprotein

HMGB1: high-mobility group box 1 ou amphotérine

IDE: insulin degrading enzyme

JA : jonction adhérente

JAMs: junctional adhesion molecules

JS : jonction serrée

KO : knockout

LDL : low density lipoprotein

LRP1 : low-density lipoprotein receptor related protein 1

LXR : liver X receptor

MA : maladie d'Alzheimer

MAGUK : membrane-associated guanylate-kinase

MAPs : microtubule-associated proteins

MB : membrane basale

MDR : multidrug resistance

MMP: matrix metalloproteinase

MRP : multidrug resistance-associated protein

MTBD: microtubule-binding domain

NBD : nucleotide-binding domain

NEP: néprilysine  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor-*kappa* B  
NFTs: neurofibrillary tangles  
OATP: organic anion transporting polypeptide  
27-OHC: 27-hydroxycholestérol  
P-gp : P-glycoprotéine  
PCIS: perfusion cérébrale *in situ*  
PEN-2 : presenilin enhancer 2  
PHF : paired helical filaments  
PPAR $\gamma$  : peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$   
RAGE : receptor for advanced glycation end products  
RAP : receptor-associated protein  
RXR : retinoid X receptor  
qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction  
SLC : solute carrier  
SNC : système nerveux central  
SNP : single-nucleotide polymorphism  
T<sub>4</sub> : L-thyroxine  
TMD : transmembrane domain  
tPA : tissue plasminogen activator  
UNV : unité neurovasculaire  
WT : wild-type  
VIH : virus de l'immunodéficience humaine  
ZO : zonula occludens



# Liste des figures et des tableaux

<b>Figure 1:</b> L'unité neurovasculaire (UNV) .....	8
<b>Figure 2 :</b> Représentation schématique des protéines constitutives des jonctions serrées (JS) et adhérentes (JA) .....	10
<b>Figure 3 :</b> Schéma des différents mécanismes de transport à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) .....	15
<b>Figure 4 :</b> Schéma représentant le modèle « ABC switch » du mécanisme de transport d'un substrat par un transporteur ABC .....	20
<b>Figure 5 :</b> Schéma représentant les principaux transporteurs ABC décrits comme étant impliqués dans l'efflux cérébral à la barrière hémato-encéphalique.....	21
<b>Figure 6 :</b> Structure secondaire du transporteur ABCB1 .....	22
<b>Figure 7 :</b> Structure secondaire des transporteurs ABCG .....	27
<b>Figure 8 :</b> Structure secondaire des transporteurs ABCA .....	31
<b>Figure 9 :</b> Structure secondaire prédite du transporteur ABCA2 .....	38
<b>Figure 10 :</b> Classification phylogénétique des membres de la sous-famille OATP chez l'Homme .....	43
<b>Figure 11 :</b> Structure secondaire des OATPs .....	44
<b>Figure 12 :</b> Lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (MA) .....	46
<b>Figure 13 :</b> Fonction de la protéine tau dans un neurone sain[A] et dans une tauopathie[B] .....	48
<b>Figure 14 :</b> Les deux voies métaboliques de l'APP .....	50
<b>Figure 15 :</b> L'hypothèse de la cascade amyloïde.....	51
<b>Figure 16 :</b> Structure des différentes isoformes de RAGE .....	57
<b>Figure 17 :</b> Schéma de la perfusion cérébrale <i>in situ</i> adaptée chez la Souris.....	67
<b>Figure 18 :</b> Cartographie des transporteurs ABC exprimés à la BHE .....	155
<b>Figure 19 :</b> Schéma représentant les différents acteurs impliqués dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$ à travers la BHE.....	160
<b>Tableau 1 :</b> Exemples de substrats de la P-glycoprotéine.....	24
<b>Tableau 2 :</b> Exemples de substrats d'ABCG2 .....	28
<b>Tableau 3 :</b> Récapitulatif sur les généralités des transporteurs ABC étudiés durant le doctorat.....	41

---

# INTRODUCTION GENERALE

---

Le système nerveux central (SNC) nécessite, pour son bon fonctionnement, un environnement très contrôlé ainsi que le maintien de son homéostasie. Parmi les principaux acteurs de cette régulation se trouve la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui entoure et isole le cerveau du reste de l'organisme. Le rôle principal de cette barrière est de réguler le passage de substances endogènes ou exogènes entre le cerveau et le sang, et ainsi de participer au maintien de l'homéostasie cérébrale. L'intégrité de la BHE est un facteur essentiel qui détermine la perméabilité de cette barrière. Un dysfonctionnement de la BHE peut être impliqué dans de nombreuses pathologies touchant le SNC comme la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson ou encore la sclérose en plaque.

La BHE est principalement constituée de cellules endothéliales des capillaires cérébraux (CECCs) qui sont liées entre elles par des jonctions serrées complexes, rendant cette barrière très peu perméable. A la surface de ces cellules sont exprimés des transporteurs d'influx et d'efflux qui permettent l'acheminement de nombreuses molécules du sang vers le cerveau et *vice-versa*. Deux grandes familles de transporteurs sont représentées au niveau de la BHE : la famille des protéines solute carrier (SLC) et la famille des transporteurs ABC (adénosine triphosphate binding cassette ou ATP-binding cassette). La famille des ABC est divisée en 7 sous-familles notées de A à G. Ces transporteurs participent notamment à l'élimination de déchets et de substances toxiques pour le SNC. ABCB1 (P-glycoprotéine, P-gp) et ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP) sont, à ce jour, les principaux représentants exprimés à la BHE. Ces deux protéines participent à l'efflux du cerveau vers le sang de nombreuses molécules exogènes, dont les médicaments. A côté de ces deux protéines, d'autres transporteurs ABC appartenant aux sous-familles A et G pourraient aussi être exprimés au niveau de la BHE et y jouer un rôle d'efflux de molécules endogènes comme les lipides. Ainsi, ces transporteurs ABCA et ABCG pourraient conférer à la BHE un rôle dans le maintien de l'homéostasie des lipides dans le SNC. Cependant, la caractérisation de ces transporteurs au niveau de la BHE est encore mal connue. Au cours de ce travail de doctorat, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux transporteurs ABCA2 et ABCG4. Dans la littérature, il n'existe, à ce jour, que peu de données sur ces deux

transporteurs au niveau de la BHE. Bien que leur expression y ait été détectée, leur localisation exacte et leur fonction restent encore non connues. Cependant, la caractérisation de leur expression et rôle au niveau de la BHE pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles physiopathologiques et/ou thérapeutiques dans certaines pathologies cérébrales associées aux lipides telle la MA.

ABCG4 est principalement exprimé au niveau du SNC, il est en particulier décrit dans les neurones et les astrocytes. Il participe à l'efflux cellulaire de certains stérols, comme le cholestérol et le desmostérol, vers les lipoprotéines de haute densité (ou HDL pour high density lipoprotein). Le transporteur ABCA2 semble, quant à lui, être impliqué dans la régulation intracellulaire de lipides dont le cholestérol et les sphingolipides, notamment au niveau des oligodendrocytes et des cellules de Schwann. Ces deux transporteurs de lipides sont, de plus, associés à la MA. L'un des marqueurs de cette pathologie est l'accumulation du peptide béta-amyloïde (A $\beta$ ) dans le cerveau, formant des plaques amyloïdes. Un défaut de clairance cérébrale de ce peptide semble être en partie à l'origine de cette accumulation. Certains transporteurs ABC, dont ABCB1 et ABCG2, sont impliqués dans l'efflux cérébral d'A $\beta$  à travers la BHE. Cependant, il semble qu'ils ne soient pas les deux seuls transporteurs impliqués dans ce processus. Les stérols et lipides étant étroitement liés à la MA et les transporteurs ABCG4 et ABCA2 étant des transporteurs de lipides, notre hypothèse est que, si ces deux transporteurs sont présents et fonctionnels au niveau de la BHE, ils pourraient également jouer un rôle dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$ .

Ainsi, notre premier objectif était d'étudier, chez la Souris, l'expression et la fonction des transporteurs Abca2 et Abcg4 au niveau de la BHE, afin de compléter la cartographie des transporteurs ABC présents et fonctionnels au niveau de la BHE. Notre second objectif était d'étudier l'implication de ces deux transporteurs dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  ainsi que l'importance relative de leurs fonctions d'efflux pour ce peptide par rapport à celles d'Abcb1 et d'Abcg2.

---

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

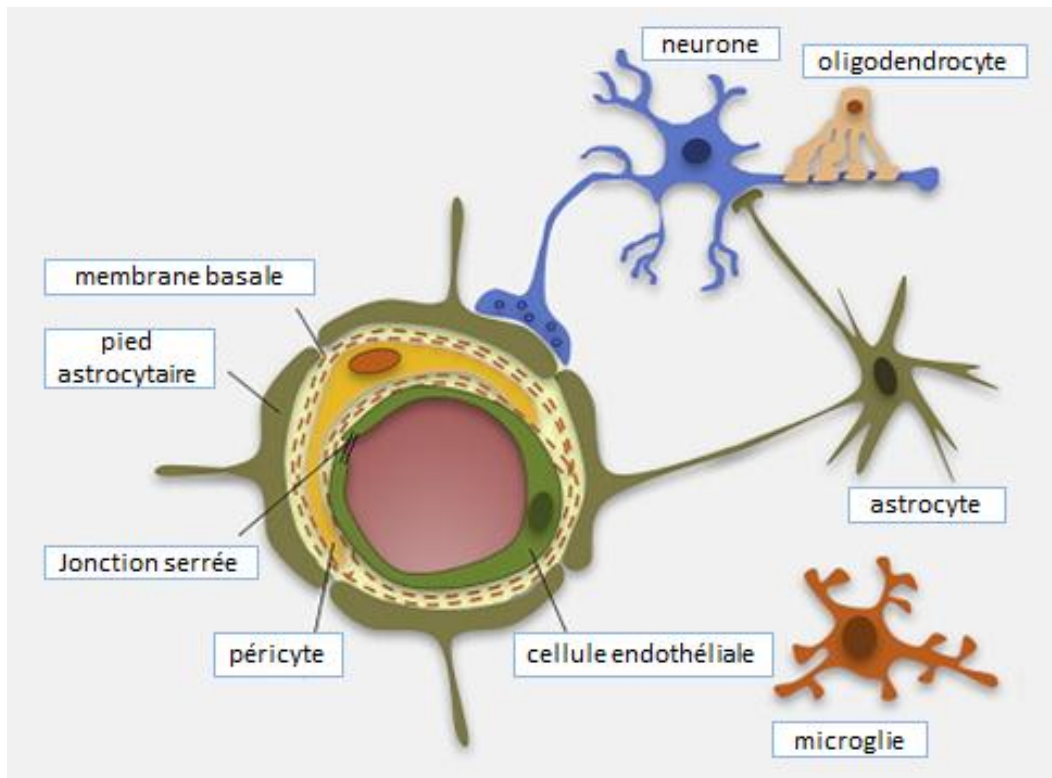
---

## I. La barrière hémato-encéphalique

Le sang irrigue les différents tissus de l'organisme, pour lesquels il assure l'acheminement de substances nécessaires à leur fonctionnement et également l'élimination de leurs déchets. Les échanges entre les différents tissus et le sang se font principalement au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins. L'un des plus importants sites d'échanges sang-tissus est localisé au niveau du cerveau et correspond à une surface comprise entre 12 et 18 m<sup>2</sup> chez l'Homme adulte (Abbott et al., 2010). Le cerveau est un constituant vital du SNC, qui nécessite le maintien de son homéostasie pour assurer ses fonctions physiologiques. Le contrôle du microenvironnement qui protège la transmission synaptique est assuré par des interactions entre les différents éléments constitutifs de l'unité neurovasculaire (UNV), à savoir les neurones, les cellules gliales (astrocytes et oligodendrocytes), les microglies et la BHE (Lo and Rosenberg, 2009; Cai et al., 2016a) [Figure 1].

Le concept d'une barrière séparant le SNC du reste de l'organisme a été évoqué pour la première fois à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Un médecin, Paul Ehrlich, avait observé qu'après une injection intraveineuse de colorants solubles dans l'eau, la plupart des organes étaient colorés sauf le cerveau et la moelle épinière. Ce médecin avait alors conclu que les colorants avaient une faible affinité pour le cerveau. Cependant, des travaux ont montré que l'injection intraveineuse d'acides biliaires ou de ferrocyanure de sodium n'avait aucun effet sur le SNC, tandis qu'une injection directe dans le cerveau entraînait des convulsions ou le coma. De plus, Edwin Goldman, l'un des étudiants d'Ehrlich, remarqua qu'après une injection de bleu trypan dans le liquide céphalo-rachidien chez différents animaux, seul le cerveau était coloré. Ce résultat était en contradiction avec la conclusion faite précédemment par Ehrlich (Dyrna et al., 2013). Bien que Goldman évoquait déjà la notion de barrière entre le cerveau et le sang, le terme de « barrière hémato-encéphalique » n'a été proposé pour la première fois qu'en 1922. Ce n'est que dans les années 60 que des études histologiques réalisées par microscopie électronique ont permis d'identifier un phénotype particulier de cette barrière : la présence de jonctions serrées liant entre-elles les CECCs les

rendant ainsi très peu perméables (Reese and Karnovsky, 1967). Depuis, un grand nombre de travaux ont permis de mieux caractériser les propriétés structurales et fonctionnelles de la BHE, qui seront détaillées dans les paragraphes suivants.



**Figure 1: L'unité neurovasculaire (UNV) :** La UNV est une structure cellulaire complexe formée par les neurones, les cellules gliales et la barrière hémato-encéphalique. Celle-ci est constituée de cellules endothéliales des capillaires cérébraux, reliées entre elles par des jonctions serrées, de péricytes, d'une lame basale et des pieds astrocytaires. La fonction principale de l'UNV est d'assurer le maintien de l'homéostasie cérébrale. [D'après (Zenaro et al., 2016)]

## ***1. La structure de la barrière hémato-encéphalique***

La BHE est une barrière sélective à la fois physiologique et métabolique (Gosselet et al., 2011). Elle est principalement constituée par les CECCs reliées entre-elles par des jonctions serrées. D'autres structures, tels les péricytes, la lame basale et les astrocytes sont en contact étroit avec ces CECCs et participent à la formation, au maintien et à la fonction de la BHE (Abbott et al., 2006, 2010).

## **1.1 Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux**

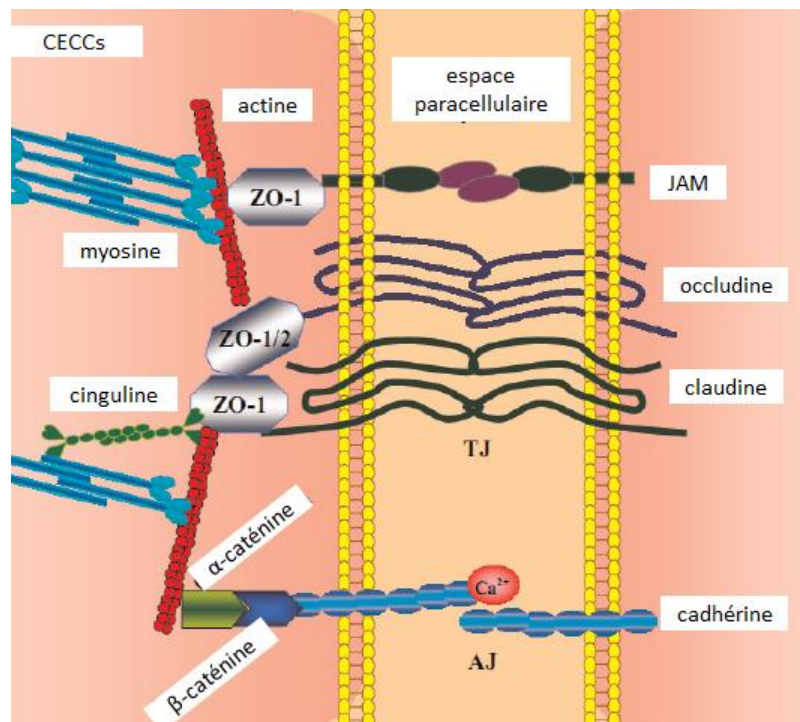
La paroi des vaisseaux sanguins est délimitée par l'endothélium, formé d'une monocouche de cellules endothéliales (CEs) qui sont en contact direct avec le sang. Ces cellules représentent la première interface d'échanges entre la circulation sanguine et le tissu qu'elles entourent.

Les CECCs possèdent un phénotype particulier qui les différencie des autres CEs périphériques. Leur principale caractéristique est l'absence de fenestration et la présence de jonctions complexes serrées et adhérentes qui lient les CECCs adjacentes entre elles, les rendant ainsi très peu perméables (Abbott et al., 2006; Keaney and Campbell, 2015). Les CECCs ne possèdent que très peu de vésicules de pinocytose, ce qui contribue à limiter le passage transcellulaire de molécules (Rubin and Staddon, 1999). Ces cellules sont plus riches en mitochondries que les autres CEs périphériques, suggérant une forte activité métabolique dans ces cellules (Oldendorf et al., 1977; Weiss et al., 2009). Une distribution polarisée à la surface des CECCs de protéines tels des transporteurs ou des récepteurs participe à la régulation du passage à travers la BHE. Les CECCs forment une barrière métabolique notamment grâce à la présence d'enzymes, qui peuvent soit être localisées dans la cellule où elles catalysent la dégradation de peptides et d'ATP (nucléotidases, peptidases), soit avoir une localisation extracellulaire où elles participent à la détoxification en dégradant des composés toxiques (monoamines oxydases, cytochromes P450 1A et 1B) (Abbott et al., 2006). Ainsi, grâce à leur rôle de barrières anatomique et métabolique, les CECCs sont la première ligne de défense pour contrôler le passage de substances entre le sang et le cerveau.

### ***1.1.1. Les jonctions serrées***

Les jonctions serrées (JS) sont constituées de protéines impliquées dans la régulation du passage paracellulaire de composés endogènes ou exogènes (Tietz and Engelhardt, 2015). Fortement exprimées à la BHE, ces JS font partie des acteurs majeurs du maintien de la très faible perméabilité de cette barrière. Ce complexe est une structure dynamique sujette à des modulations pouvant être induites par son environnement, notamment par d'autres constituants de la BHE tels les péricytes et les astrocytes (Abbott et al., 2006; Förster, 2008;

Daneman et al., 2010). Les constituants des JS sont des protéines transmembranaires (les occludines, les claudines, les molécules d'adhésion jonctionnelles) reliées au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de protéines adaptatrices localisées dans le cytosol (Abbott et al., 2010) [Figure 2].



**Figure 2 : Représentation schématique des protéines constitutives des jonctions serrées (JS) et adhérentes (JA):** Les cellules endothéliales des capillaires cérébraux présentent un phénotype particulier : la présence de JS et JA complexes qui lient les cellules entre elles. Ces jonctions sont formées grâce à l'interaction de protéines transmembranaires et de protéines cytoplasmiques qui vont rendre la BHE très peu perméable [D'après (Huang et al., 2014)]

### 1.1.1.1. Les protéines transmembranaires

#### ❖ *Les occludines*

L'occludine est une protéine transmembranaire d'environ 65 kDa, qui possède quatre domaines transmembranaires (Cummins, 2012). Elle fut la première des protéines constitutives des JS à avoir été identifiée dans des cellules épithéliales et endothéliales (Furuse et al., 1993). Le rôle principal de l'occludine est de participer au bon fonctionnement

des JS et ainsi contribuer au maintien de l'intégrité de la BHE. Une étude a montré que la présence d'un virus dans une culture primaire de CECCs humaines était responsable d'une diminution de la production d'occludines, ce qui perturbait l'intégrité de la BHE (Xu et al., 2012). Cependant, l'occludine ne semble pas être indispensable pour la formation des JS (Luissint et al., 2012). En effet, malgré l'absence de cette protéine, des souris déficientes en occludines ont des JS bien formées et sans différence structurale par rapport aux JS présentes chez des souris contrôles (Saitou et al., 2000).

#### ❖ **Les claudines**

Les claudines sont les plus importantes protéines constitutives des JS. Elles ont été caractérisées en 1998 (Furuse et al., 1998). Chez les mammifères, il existe plus de 24 protéines appartenant à la famille des claudines (Redzic, 2011). Ces protéines de 20 à 34 kDa possèdent quatre domaines transmembranaires et deux boucles extracellulaires. La plus petite des boucles possède deux résidus cystéines qui peuvent se lier par des interactions hydrophobes à une claudine localisée à la membrane d'une autre cellule proche (Piontek et al., 2008). Le domaine C-terminal des claudines est localisé dans le cytosol où il interagit avec des protéines dites « adaptatrices » telles les zonula occludens. Les claudines interviennent dans la régulation de la diffusion des molécules (Redzic, 2011). La présence de ces protéines semble être primordiale pour la formation et le bon fonctionnement des JS. Des souris n'exprimant pas la claudine 1 ou 5 ne survivent pas plus d'une journée après leur naissance (Furuse et al., 2002; Nitta et al., 2003). A la BHE, les claudines 3, 5 et 12 sont exprimées au niveau des CECCs où elles participent fortement au maintien de l'intégrité de la BHE (Luissint et al., 2012). Ainsi, une augmentation de la perméabilité de la BHE a été montrée chez des souris déficientes en *claudine 5* (Nitta et al., 2003).

#### ❖ **Les molécules d'adhésion jonctionnelle**

Les molécules d'adhésion jonctionnelle (JAMs pour junctional adhesion molecules) représentent le troisième groupe de molécules constitutives des JS. Elles ont été identifiées pour la première fois en 1998 au niveau des cellules endothéliales et épithéliales (Martín-Padura et al., 1998). Ces molécules appartenant à la superfamille des immunoglobulines ne



possèdent qu'un domaine transmembranaire. Les trois principaux représentants des JAMs sont les JAM A, B et C, mais il existe aussi les JAM 4 et les molécules JAM-like (Jia et al., 2013). Les JAMs ne semblent pas être essentielles à la formation des JS. Néanmoins, elles sont fortement impliquées dans la diminution de la perméabilité des cellules, notamment en favorisant l'assemblage des JS, ainsi que dans la polarisation des cellules (Liu et al., 2000; Luissint et al., 2012). De par leur fonction, les JAMs participent au maintien de l'intégrité de la BHE (Jia et al., 2013). Les JAMs ne sont pas uniquement retrouvées dans les JS. Elles sont également localisées au niveau des leucocytes, où elles vont favoriser l'adhésion et la migration de ces cellules à travers les cellules épithéliales ou endothéliales (Weber et al., 2007).

#### **1.1.1.2. Les protéines adaptatrices**

Les trois protéines transmembranaires constitutives des JS, qui sont les occludines, les claudines et les JAMs, vont se lier au niveau de leur terminaison C-terminale à des protéines cytoplasmiques adaptatrices telles les zonula occludens (ZO) et les cingulines (Abbott et al., 2010). Les ZO appartiennent à la famille des protéines MAGUK (membrane-associated guanylate-kinase). Ces protéines sont importantes pour la formation des barrières endothéliales, car elles sont essentielles dans l'assemblage des protéines transmembranaires des JS (occludines, claudines et JAMs) et leur servent de lien avec les filaments d'actine du cytosquelette (Tornavaca et al., 2015). A la BHE, trois types de ZO sont exprimés : ZO-1, 2 et 3 (Luissint et al., 2012).

#### **1.1.2. Les jonctions adhérentes**

A côté des JS, les CECCs expriment des jonctions adhérentes (JA) qui interviennent dans l'interaction entre des cellules adjacentes et aussi dans la régulation de l'organisation du cytosquelette (Harrison et al., 2011). Les JA sont des complexes protéiques constitués de protéines transmembranaires, les VE-cadhérines (vascular endothelial cadherin) et de protéines cytoplasmiques, les caténines [Figure 2]. Les VE-cadhérines appartiennent à une superfamille de protéines membranaires d'adhésion qui sont dépendantes du  $Ca^{2+}$  et qui sont impliquées dans la régulation de la perméabilité des vaisseaux sanguins. Ces protéines

interagissent avec le cytosquelette *via* les caténines (Rodrigues and Granger, 2015). Les JA interviennent dans le maintien de l'intégrité physique de la BHE.

## **1.2. La membrane basale**

Les membranes (ou lames) basales (MB) sont des couches formées de protéines de la matrice extracellulaire qui servent de support à différents tissus. Elles jouent un rôle dans des voies de signalisation cellulaire notamment celles impliquées dans la différenciation, la prolifération et la migration des cellules (Pöschl et al., 2004; Morris et al., 2014). A la BHE, la MB est principalement composée de protéines appartenant à quatre familles de glycoprotéines, qui sont les laminines, les nidogènes, les protéoglycanes (perlecan, agrine) et le collagène de type IV (Thomsen et al., 2016). Ce dernier sert de charpente à la MB pour assurer la stabilité et le maintien de l'intégrité membranaire (Pöschl et al., 2004). La MB au niveau de la BHE peut être divisée en deux MB : la MB endothéliale sur laquelle reposent les CECCs ainsi que les péricytes et la MB parenchymale (ou astrogliale) qui soutient les pieds astrocytaires (Thomsen et al., 2016). La MB a une fonction importante dans le développement des vaisseaux et dans le maintien de la stabilité et de l'intégrité des barrières (Engelhardt and Sorokin, 2009). Elle est impliquée dans la régulation de la perméabilité de la BHE notamment en jouant un rôle dans la stabilité des JS des CECCs (Savettieri et al., 2000). Une perturbation de la MB peut conduire à une modification de l'intégrité de la BHE. Ce processus pourrait être impliqué dans des pathologies cérébrales tels les glioblastomes, la maladie d'Alzheimer ou encore les ischémies cérébrales (Almutairi et al., 2016).

## **1.3. Les péricytes**

Les péricytes sont des cellules murales qui reposent sur la membrane basale des CECCs (Armulik et al., 2011). Ces cellules ont également été appelées cellules de Rouget en référence au chercheur français, Charles Marie Benjamin Rouget, qui a été le premier à les décrire en 1873. Les péricytes sont des cellules de forme ovale et possèdent des prolongements pouvant recouvrir plusieurs cellules endothéliales (Díaz-Flores et al., 2009).

La quantité de péricytes présente dans les vaisseaux varie en fonction de l'espèce, du tissu ainsi que du type de vaisseaux. Ils occupent, selon les études, 30 à 99% de la surface totale des microvaisseaux cérébraux (Sims, 1986; Engelhardt and Sorokin, 2009; Mathiisen et al., 2010; Armulik et al., 2011). Les péricytes possèdent de multiples fonctions. Ils participent à la néovascularisation, à la synthèse de la MB et à la polarisation des pieds astrocytaires. De par leur propriété contractile, les péricytes semblent participer à la régulation du flux sanguin dans les capillaires (Peppiatt et al., 2006; Sá-Pereira et al., 2012). Ces cellules sont également impliquées dans la formation de la BHE au stade embryonnaire, puis dans le maintien de son intégrité (Díaz-Flores et al., 2009; Armulik et al., 2010; Daneman et al., 2010). Ils vont intervenir dans la formation des JS et dans la régulation du transport vésiculaire (Daneman et al., 2010). Les péricytes sont des constituants importants de la BHE. Il a été montré chez des souris qu'une déficience en péricytes entraînait une augmentation de la perméabilité de la BHE et une dégradation des vaisseaux conduisant à une neurodégénérescence progressive (Armulik et al., 2010; Bell et al., 2010).

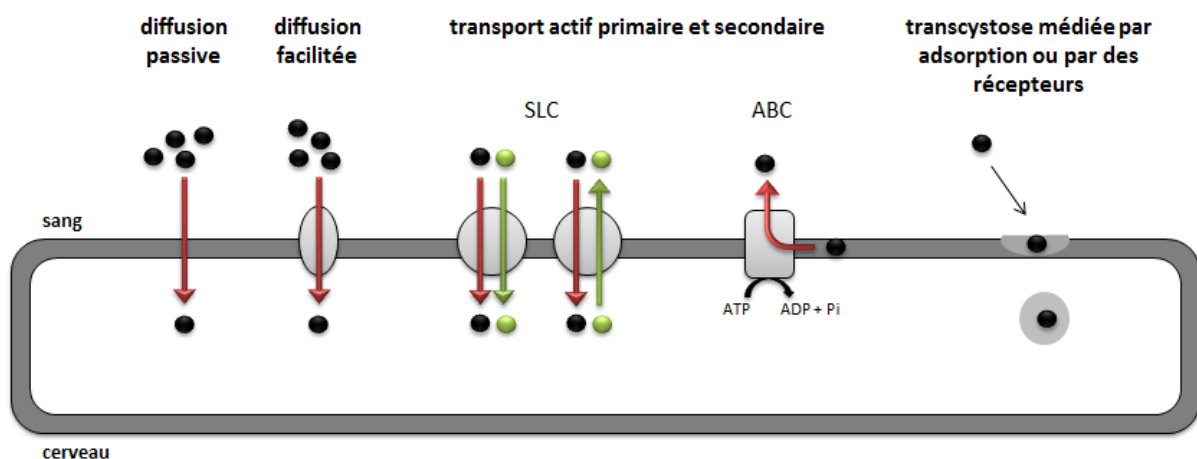
#### **1.4. Les astrocytes**

Les astrocytes sont des cellules gliales qui dérivent du tube neural (Abbott et al., 2006). Ce sont les cellules non-neuronales les plus abondantes du SNC qui occupent environ 50% de la surface cérébrale. Il existe 11 phénotypes parmi lesquels 8 ont une implication au niveau des vaisseaux sanguins (Abbott et al., 2006). Les fonctions des astrocytes au niveau du SNC sont multiples. Ils sont notamment impliqués dans le développement et dans l'activité des synapses. Ils jouent également un rôle dans le contrôle de l'homéostasie des neurotransmetteurs et des ions, ainsi que dans le métabolisme des neurones (Abbott et al., 2006; Cecchelli et al., 2007; Bernacki et al., 2008; Sofroniew and Vinters, 2010). D'un point de vue structural, les astrocytes ont des prolongements cytoplasmiques dont les terminaisons sont appelées des pieds astrocytaires. Les astrocytes servent de lien entre les cellules neuronales et les vaisseaux sanguins (Bernacki et al., 2008). Au niveau des vaisseaux, ils sont impliqués dans la régulation du flux sanguin lors de changements de l'activité synaptique, notamment en sécrétant des molécules (prostaglandine, oxyde nitrique) qui peuvent réguler le diamètre des vaisseaux sanguins (Sofroniew and Vinters, 2010). Les astrocytes recouvrent plus de 99% de la surface du côté abluminal de la BHE au niveau de

laquelle ils participent à la régulation des fonctions de cette barrière (Hawkins and Davis, 2005; Persidsky et al., 2006). Ils jouent en particulier un rôle dans la formation des JS et dans l'expression et la localisation de transporteurs à la BHE (Abbott et al., 2006; Cecchelli et al., 2007). Ces cellules sont donc importantes pour le maintien de la perméabilité et de l'intégrité de la BHE.

## 2. Mécanismes de transport à la barrière hémato-encéphalique

La présence des JS entre les CECCs rend la BHE très peu perméable et limite le passage paracellulaire de molécules endogènes ou exogènes. De ce fait, les molécules sont obligées de franchir la membrane plasmique des CECCs afin de pouvoir traverser la BHE. Le passage se fait par différents mécanismes (Abbott et al., 2010) [Figure 3].



**Figure 3 : Schéma des différents mécanismes de transport à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) :** Le passage à travers la BHE est assuré par différents mécanismes selon la nature de la molécule. Le transport peut se faire par diffusion passive suivant le gradient de concentration de la molécule. Il peut également être facilité par la présence de protéines de transport tels les transporteurs SLC (solute carriers) et ABC (ATP-binding cassette). Enfin certaines molécules peuvent passer à travers les membranes *via* un processus de transcytose. [Adapté d'après (Abbott et al., 2010)]

## **2.1. Passage par diffusion passive**

La diffusion passive de molécules correspond à un mode de transport membranaire qui ne nécessite pas d'énergie. Ce transport se fait suivant le sens du gradient de concentration de la molécule, c'est-à-dire de la zone la plus concentrée en molécules vers la zone la moins concentrée. Néanmoins, pour qu'une molécule puisse être une bonne candidate pour la diffusion passive elle doit répondre à des critères physico-chimiques précis (Mikitsh and Chacko, 2014). Ces paramètres sont regroupés dans la « règle des cinq de Lipinski » qui permet de définir la perméabilité d'un tissu pour une molécule donnée. Cinq paramètres sont à prendre en considération : le poids moléculaire, le degré de lipophilie, la polarité, le nombre de liaisons hydrogènes et de charges (Lipinski et al., 2001). Une molécule ayant une bonne diffusion passive doit être de petite taille (< à 500 Da) et être lipophile, puisque les membranes sont principalement constituées de couches hydrophobes. La lipophilie est mesurée grâce au coefficient de partition octanol/eau (logP). Plus une molécule est lipophile, plus elle peut traverser la membrane. Cependant, il ne faut pas que le logP soit supérieur à 5 car une trop grande lipophilie diminue la perméabilité. Par ailleurs, le nombre de liaisons hydrogènes ne doit pas être trop important car cela diminue aussi la perméabilité. Une molécule ne doit pas avoir plus de cinq donneurs et plus de dix accepteurs de liaisons hydrogènes pour être une bonne candidate à la diffusion passive (Mikitsh and Chacko, 2014).

## **2.2. Passage par diffusion facilitée**

Le transport à travers la BHE peut également se faire par diffusion facilitée. Ce mode de transport nécessite la présence de protéines de transport à la surface des CECCs, qui ont la caractéristique d'être saturables. Ces protéines peuvent être soit des transporteurs soit des canaux transmembranaires. Leur rôle est d'assurer le transport de leur substrat à travers la membrane en suivant le gradient de concentration de la molécule transportée, sans dépense d'énergie. Ces protéines de transport sont des uniports, c'est-à-dire qu'elles ne transportent qu'une molécule à la fois. La diffusion facilitée permet le transport notamment de nutriments tels certains acides aminés, des vitamines et le D-glucose, dont le transport est assuré par le transporteur de glucose GLUT1 (glucose transporter 1) (Abbott et al., 2010).

### **2.3. Passage par transcytose**

Le transport des macromolécules à travers les CECCs de la BHE se fait par transcytose *via* des mécanismes d'endocytose. Ce mode de transport peut mettre en jeu deux mécanismes différents : la transcytose par adsorption ou médiée par des récepteurs membranaires. La transcytose initiée par un phénomène d'adsorption se fait grâce à des interactions électrostatiques entre la macromolécule cationique chargée positivement (par exemple l'albumine) et la surface de la cellule chargée négativement. La transcytose médiée par un récepteur est, quant à elle, initiée par la liaison spécifique entre un ligand, ici une macromolécule (par exemple la transferrine ou l'insuline), et son récepteur exprimé à la surface membranaire de la cellule. Cette première étape va déclencher les processus d'endocytose. La macromolécule va être contenue dans une vésicule qui va pénétrer et traverser la cellule jusqu'à l'autre pôle cellulaire où la macromolécule sera libérée hors de la cellule par exocytose (Abbott et al., 2010; Strazielle and Ghersi-Egea, 2013; Georgieva et al., 2014).

### **2.4. Passage par transport actif**

Le transport au niveau des CECCs peut également se faire par l'intermédiaire de transporteurs transmembranaires actifs qui vont assurer le passage de molécules contre leur gradient de concentration. Ce transport actif est saturable et nécessite un apport d'énergie. Au niveau de la BHE, les transporteurs actifs sont retrouvés des deux côtés (pôles apical et basolatéral) des CECCs et appartiennent à deux superfamilles de protéines : les transporteurs SLC (solute carriers) et les transporteurs ABC (Abbott et al., 2010). Les transporteurs SLC sont les principaux représentants des transporteurs d'influx qui permettent le passage de molécules du sang vers le cerveau. Ils assurent un transport actif dit secondaire en utilisant comme source d'énergie le gradient électrochimique des composés qu'ils transportent (Tashima, 2015). Les SLC peuvent être soit des symports, qui assurent le transport dans un même sens de plusieurs molécules à la fois, soit des antiports, qui peuvent transporter plusieurs molécules mais dans des sens opposés. Une description plus approfondie de ces transporteurs sera faite dans le chapitre III « *Les transporteurs SLC au niveau de la BHE : OATP1A2/Oatp1a4* ».

Les transporteurs d'efflux vont assurer, à la BHE, le transport de leur substrat du cerveau vers la circulation sanguine. Ils sont majoritairement représentés par les transporteurs ABC, qui sont des transporteurs actifs primaires ayant la capacité de se lier et d'hydrolyser l'ATP, ce qui va leur fournir l'énergie nécessaire pour assurer leur fonction (Abbott et al., 2010). Une description plus approfondie de ces transporteurs sera faite dans le chapitre II « *Les transporteurs ABC* ».

## II. Les transporteurs ABC

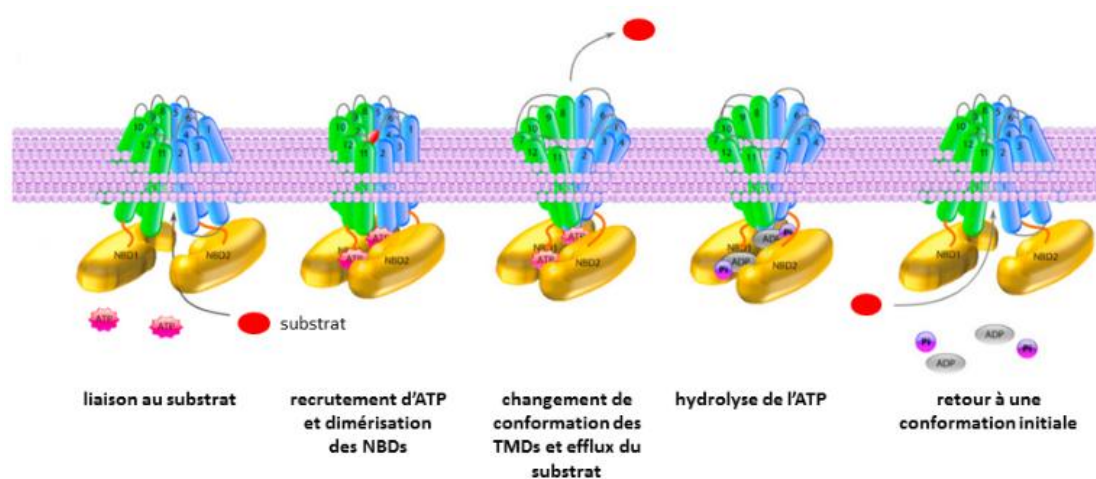
### 1. Généralités

Les transporteurs ABC constituent une superfamille de protéines présente chez les procaryotes et les eucaryotes. Leur fonction est d'assurer le passage transmembranaire d'un grand nombre de composés, allant du simple ion aux petites protéines, grâce à l'énergie fournie après hydrolyse de l'ATP (Locher, 2016).

La majorité de ces protéines possède une structure similaire caractérisée par deux domaines transmembranaires (TMDs), suivis chacun par un domaine NBD (nucleotide-binding domain) ou ABC. Les protéines ABC ayant une telle configuration sont définies comme des transporteurs « complets ». Il existe également des transporteurs « longs » qui sont pourvus d'un TMD supplémentaire en leur extrémité N-terminale, ainsi que des demi-transporteurs n'ayant qu'un TMD et un NBD (Mahringer and Fricker, 2016). Ces derniers ont la capacité de s'homo- ou s'hétérodimériser pour devenir fonctionnels (Kerr et al., 2011). Les NBDs sont des domaines caractéristiques des protéines ABC (Wilkens, 2015). Ils comportent des motifs fortement conservés essentiels à la fixation et à l'hydrolyse de molécules d'ATP et à la transduction de l'énergie : les motifs Walker A (ou P-loop), Walker B et Signature LSGGQ (ou C-loop) (Frelet and Klein, 2006; ter Beek et al., 2014; Beis, 2015). A l'inverse, les séquences d'acides aminés et la structure des TMDs peuvent, quant à elles, différer d'une protéine ABC à une autre. Les TMDs sont composés d'hélices *alpha*, dont le nombre peut varier entre 6 et 10, cependant la majorité des TMDs possède 6 hélices (Wilkens, 2015).

Le mécanisme par lequel se fait le transport n'est pas encore très bien compris. Toutefois, différents modèles de fonctionnement des transporteurs ABC ont été proposés dont le modèle « ABC switch » (Higgins and Linton, 2004; Wilkens, 2015) [Figure 4]. Dans ce modèle, le transport est initié par la liaison du substrat aux TMDs qui va permettre le rapprochement des hélices et stimuler la liaison des NBDs à l'ATP. Cette étape est suivie d'une dimérisation des deux NBDs et d'un changement de conformation des TMDs permettant ainsi le passage et l'expulsion du substrat. L'hydrolyse de l'ATP va entraîner la dissociation des deux NBDs et, de ce fait, un retour à l'état basal de la protéine (Beis, 2015).



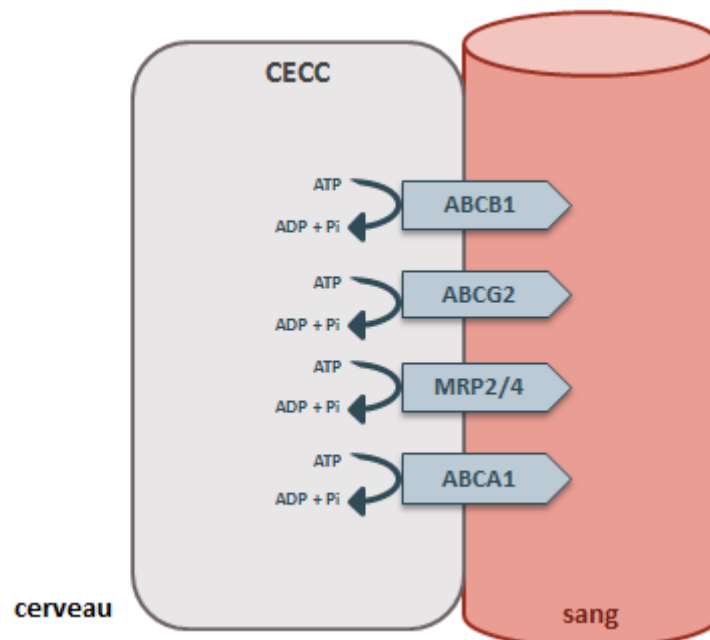


**Figure 4 : Schéma représentant le modèle « ABC switch » du mécanisme de transport d'un substrat par un transporteur ABC :** Le substrat se fixe aux TMDs, ce qui facilite le recrutement d'une molécule d'ATP par les NBDs qui se dimérisent. Les TMDs vont alors changer de conformation et permettre le transport du substrat. Un retour à l'état basal se fait après hydrolyse de la molécule d'ATP. [D'après (Li et al., 2016)]

Chez l'Homme, il existe 48 protéines ABC, classées selon leur homologie structurale en sept sous-familles phylogénétiques (ABCA à ABCG) qui se différencient notamment par leur spécificité vis-à-vis des substrats (Tachikawa et al., 2005; Matsuo, 2010; Theodoulou and Kerr, 2015). Cependant, toutes les protéines ne sont pas impliquées dans le transport transmembranaire de leur substrat, c'est notamment le cas pour un membre de la sous-famille ABCC, le régulateur de la conductance transmembranaire de la fibrose kystique (Gu and Manautou, 2010). Par leur rôle de transporteur à travers les membranes, les protéines ABC sont impliquées dans de nombreux processus dont la mise en place d'un phénotype de résistance aux molécules tels les médicaments ou encore dans la réponse immunitaire adaptative (Sodani et al., 2012; Eggenberger and Tampé, 2015). L'expression et la fonction des transporteurs ABC peuvent être régulées par des facteurs endogènes ou exogènes, comme des récepteurs nucléaires ou des molécules pro-inflammatoires (Kooij et al., 2012). De plus, un dysfonctionnement de ces protéines, notamment dû à des mutations génétiques, peut avoir des conséquences physiopathologiques (Löscher and Potschka, 2005). L'implication de certains transporteurs ABC dans la physiopathologie de maladies sera décrite dans les sous-parties détaillant les différents transporteurs ABC utiles pour ce travail de doctorat.

## 2. Les transporteurs ABC exprimés à la barrière-hémato encéphalique

Certains transporteurs ABC sont exprimés au niveau de la BHE où ils assurent le transport de molécules endogènes ou exogènes hors du cerveau. Ainsi par leur rôle de pompe d'efflux au niveau de cette barrière, les transporteurs ABC participent à l'élimination de déchets et de substances pouvant avoir des effets néfastes sur le SNC (Abbott et al., 2010). Par ailleurs, ils contribuent également à la restriction du passage des médicaments destinés à agir au niveau du SNC (Gosselet et al., 2011). Le premier transporteur ABC à avoir été décrit au niveau de la BHE est ABCB1. La présence d'autres membres de cette superfamille tels qu'ABCG2 ou encore certaines MRPs (multidrug resistance-associated proteins, membres de la sous-famille ABCC) a aussi été démontrée (Miller, 2015; Strazielle and Ghersi-Egea, 2015). D'autres transporteurs pourraient également jouer un rôle au niveau de la BHE, néanmoins leurs localisations cellulaire et membranaire exactes ainsi que leur fonction ne sont pas encore connues [Figure 5]. Dans cette partie seront décrits les transporteurs ABC étudiés au cours de ce doctorat.



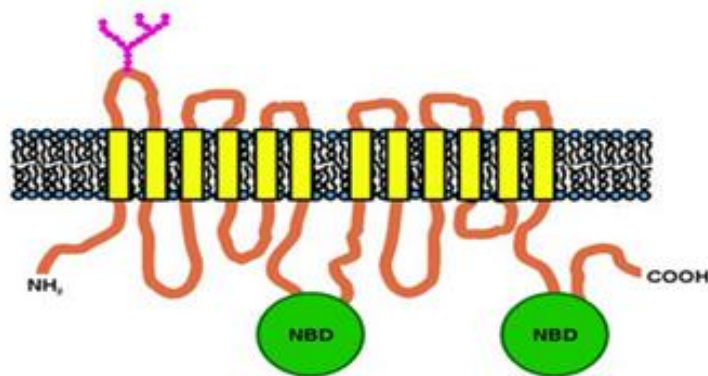
**Figure 5 : Schéma représentant les principaux transporteurs ABC décrits comme étant impliqués dans l'efflux cérébral à la barrière hémato-encéphalique.** (CECC = cellule endothéliale des capillaires cérébraux) [D'après (Do et al., 2011; Strazielle and Ghersi-Egea, 2015; Mahringer and Fricker, 2016)]

## 2.1. Le transporteur ABCB1 : la P-glycoprotéine

### 2.1.1. Présentation

La P-glycoprotéine (P-gp, ABCB1) a été le premier transporteur ABC décrit chez l'Homme. Cette protéine appartient à la sous-famille ABCB qui regroupe onze membres dont quatre sont des transporteurs « complets » et sept sont des demi-transporteurs. La P-gp a été caractérisée pour la première fois en 1974 dans des cellules tumorales qui présentaient un phénotype de résistance multiple aux drogues (ou MDR) (Juliano and Ling, 1976).

Cette protéine est codée par le gène *ABCB1* (ou *MDR1*) chez l'Homme et par deux gènes *Abcb1a* et *Abcb1b* (ou *Mdr1a* et *Mdr1b*) chez la Souris (Borst and Schinkel, 1997). Le gène possède 28 exons et se situe sur le chromosome 7 chez l'Homme (Fojo et al., 1986). Il a été cloné pour la première fois en 1985 chez l'Homme, la Souris et le Hamster (Riordan et al., 1985). La protéine de 170 kDa est composée de 1280 acides aminés. Cette dernière fait partie des quatre transporteurs « complets » de la sous-famille ABCB, ayant deux TMDs et deux NBDs [Figure 6].



**Figure 6 : Structure secondaire du transporteur ABCB1 :** ABCB1 est un transporteur ABC complet possédant deux domaines transmembranaires et 2 sites de liaison nucléotidique (NBD). [D'après (Sharom, 2011)]

### **2.2.2. Localisation**

La P-gp a, tout d'abord, été identifiée dans des cellules tumorales, puis une localisation physiologique de cette protéine a été mise en évidence (Cordon-Cardo et al., 1990). La P-gp est exprimée dans un grand nombre de tissus. Elle est notamment retrouvée dans l'intestin (à la membrane luminale des cellules épithéliales), le foie (au niveau des canalicules biliaires), le pancréas (au niveau des canalicules), le rein (à la membrane apicale des cellules épithéliales du tubule proximal rénal) (Thiebaut et al., 1987; Sharom, 2011). La P-gp est également présente au niveau de la barrière hémato-testiculaire et de la BHE (Melaine et al., 2002; Young et al., 2003; Fromm, 2004). A la BHE, la P-gp a été décrite comme étant fortement exprimée à la membrane luminale des CECCs dans de nombreuses espèces, dont l'Homme et les Rongeurs (Cordon-Cardo et al., 1990; Shawahna et al., 2011; Chaves et al., 2014).

### **2.2.3. Substrats et inhibiteurs**

Il existe plus de 300 composés décrits comme pouvant interagir avec la P-gp (Callaghan, 2015). Ces molécules présentent entre elles une grande variabilité au niveau de leur structure, de leur taille et de leur fonction [Tableau 1]. Elles sont souvent des molécules organiques non chargées ayant des poids moléculaires variés (compris entre 200 et 1900 Da) et pouvant contenir des noyaux aromatiques (Schinkel and Jonker, 2003). Il semblerait que le seul point commun entre ces différentes molécules soit leur propriété amphiphile. Les premiers substrats identifiés pour la P-gp étaient des molécules anticancéreuses.

**Tableau 1: Exemples de substrats de la P-glycoprotéine** [d'après (Fromm, 2002; Schinkel and Jonker, 2003)]

<b>SUBSTRATS DE LA P-GLYCOPROTEINE</b>	
<b>anticancéreux</b>	actinomycine D, daunorubicine, doxorubicine, étoposide, imitinib, mitoxantrone, topotécan, vinblastine, ...
<b>antibiotiques</b>	érythromycine, lévofloxacine
<b>antiépileptiques</b>	carbamazépine, felbamate, phénobarbital
<b>antiprotéases du VIH</b>	amprénavir, indinavir, nelfinavir, saquinavir, ritonavir
<b>cardio-vasculaires</b>	digoxine, quinidine
<b>hypocholestérolémiant</b>	atorvastatine, lovastatine, simvastatine
<b>inhibiteurs calciques</b>	diltiazem, vérapamil
<b>immunosuppresseurs</b>	ciclosporine A, tacrolimus

Des inhibiteurs de la P-gp ont été développés afin de contrer son implication dans la mise en place du phénotype MDR et ainsi, d'augmenter l'efficacité d'un traitement médicamenteux. L'inhibition peut se faire à différents niveaux : en bloquant le site de liaison au substrat ou le site de liaison à l'ATP ou encore en modulant l'expression ou l'activité du transporteur (Seebacher et al., 2016).

Il existe trois générations d'inhibiteurs pour la P-gp. Les inhibiteurs de la première génération regroupent des médicaments tels le vérapamil, la ciclosporine A et la quinidine. Ces molécules n'ont un effet inhibiteur efficace qu'à de fortes concentrations plasmatiques qui se sont avérées être des concentrations cytotoxiques (Tan et al., 2000). Il a été montré que de fortes doses de vérapamil pouvaient être responsables d'effets secondaires toxiques notamment cardiaques (Pennock et al., 1991).

Une amélioration de la structure des inhibiteurs de première génération a permis de développer des molécules avec une meilleure efficacité à des concentrations moins élevées et donc avec une cytotoxicité diminuée. Ces molécules appartiennent aux inhibiteurs de deuxième génération, parmi lesquels se trouvent le valspodar (PSC833) ou encore le biricodar (VX710). Le valspodar a des effets 5 à 10 fois plus efficaces que son analogue, la ciclosporine A (Friche et al., 1992). Cependant, cette molécule n'inhibe pas uniquement la P-gp, c'est également un inhibiteur d'autres transporteurs comme ABCA1 ou encore Oatp1a4 (Bourasset et al., 2003; Nagao et al., 2013). Le valspodar a aussi un effet inhibiteur sur

d'autres molécules dont des enzymes du métabolisme, des cytochromes P450. Cette inhibition va engendrer une diminution de l'élimination de molécules dont les médicaments qui peuvent être toxiques (Kathawala et al., 2015).

Enfin, des inhibiteurs de troisième génération ont été développés. Ces molécules présentent une efficacité améliorée (plus de 200 fois meilleure que pour les deux générations précédentes) et cela, à une concentration de l'ordre du nanomolaire. L'un de ces inhibiteurs identifiés est l'elacridar (GF120918), néanmoins l'effet inhibiteur de cette molécule n'est pas spécifique à la P-gp car c'est également un bon inhibiteur d'un autre transporteur ABC, ABCG2 (Thomas and Coley, 2003).

#### ***2.2.4. Rôles physiologiques et pathologiques***

Le rôle majeur de la P-gp est d'assurer l'efflux de molécules endogènes ou exogènes au niveau des différents tissus dans lesquels elle est exprimée (Silva et al., 2015). Ainsi, cette protéine va participer à la limitation de l'absorption de xénobiotiques au niveau de l'intestin, assurer l'élimination de substances *via* la bile ou l'urine et limiter l'entrée de xénobiotiques dans les tissus (Thiebaut et al., 1987; Watkins, 1997; Fromm, 2004; Pfeifer et al., 2014). Dans le placenta, la P-gp participe fortement à la protection du fœtus en limitant le passage de la mère vers le fœtus de composés potentiellement néfastes (Joshi et al., 2016). Une étude a montré une exposition augmentée des fœtus à des médicaments, chez des souris gestantes n'exprimant plus la P-gp, (Smit et al., 1999). A la BHE, ce transporteur est impliqué dans l'élimination de substances pouvant avoir des effets neurotoxiques sur le SNC (Abbott et al., 2010; Sharom, 2011). L'une des premières études sur le rôle de la P-gp à la BHE a été menée par Schinkel et al. sur des souris déficientes en ce transporteur. Ces dernières sont viables et fertiles. Cependant, elles présentaient une accumulation cérébrale de l'ivermectine, un antiparasitaire neurotoxique, 100 fois plus importante que chez les souris contrôles, entraînant des convulsions et la mort des souris (Schinkel et al., 1994). Ces travaux ont permis de démontrer pour la première fois que la P-gp assure un rôle important dans la limitation du passage du sang vers le cerveau. La présence de ce transporteur peut être un obstacle dans le traitement de certaines pathologies touchant le SNC tels la douleur, l'épilepsie, le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), les tumeurs cérébrales et l'ischémie cérébrale (Davis et al., 2014).

La P-gp est aussi très étudiée pour son rôle dans la mise en place du phénotype MDR, notamment au niveau des cellules cancéreuses, où elle participe à l'efflux de médicaments, diminuant ainsi l'efficacité des traitements anticancéreux (Tulsyan et al., 2016).

Enfin, la P-gp est également impliquée dans certaines maladies neurodégénératives telle la MA ou neurologiques comme l'épilepsie (Kim et al., 2008). Son implication dans la MA sera détaillée dans la partie IV (2.2.3.2. *Le transport du peptide  $\beta$ -amyloïde à travers la barrière hémato-encéphalique*).

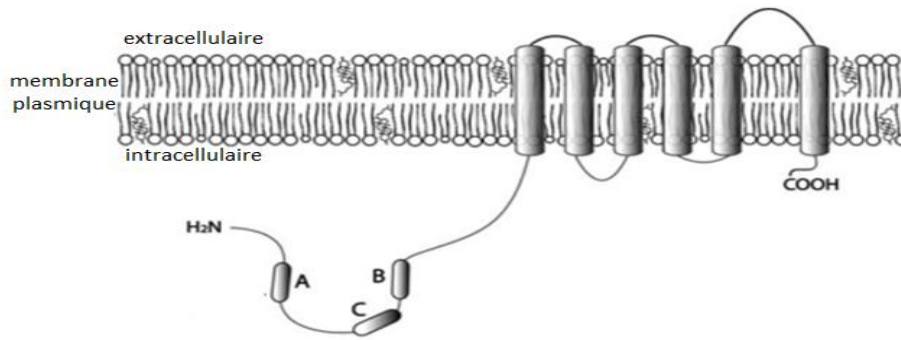
## 2.2. Le transporteur ABCG2

### 2.2.1. Présentation

Le transporteur ABCG2, également appelé BCRP (breast cancer resistance protein) ou encore White Protein, a été initialement caractérisé dans une lignée cancéreuse mammaire qui présentait une résistance aux molécules anticancéreuses (la mitoxantrone et le topotécan) (Doyle et al., 1998). ABCG2 est un membre de la sous-famille des transporteurs ABCG, qui regroupe cinq membres : ABCG1, ABCG2, ABCG4, ABCG5 et ABCG8 (Cserepes et al., 2004; Kusuhara and Sugiyama, 2007; Kerr et al., 2011). Ces transporteurs ont une structure différente des autres protéines ABC. En effet, contrairement à la plupart des autres transporteurs ABC, les ABCG ne possèdent qu'un seul domaine NBD au niveau N-terminal suivi d'un domaine transmembranaire constitué de six hélices *alpha* (Velamakanni et al., 2007) [Figure 7]. Ces protéines sont qualifiées de demi-transporteurs. Ils doivent s'homodimériser ou s'hétérodimériser pour devenir fonctionnels (Kusuhara and Sugiyama, 2007). La majorité des transporteurs appartenant à cette sous-famille participe au transport de lipides (Schmitz et al., 2001; Kerr et al., 2011). Le transporteur ABCG2 est le membre le plus étudié de cette sous-famille notamment pour son rôle important dans la protection de l'organisme contre les xénobiotiques (Cserepes et al., 2004; Choi and Yu, 2014).

Son gène *ABCG2* localisé sur le chromosome 4 chez l'homme code pour une protéine de 72 kDa composée de 655 acides aminés (Robey et al., 2009). Deuxième membre de la sous-famille ABCG, ce demi-transporteur doit s'homodimériser pour devenir fonctionnel (Kusuhara and Sugiyama, 2007). A ce jour, aucune hétérodimérisation n'a été décrite pour

ABCG2. Il semblerait que ce transporteur ait également la capacité de former des oligomères avec d'autres ABCG2 (Xu et al., 2007; Ni et al., 2010).



**Figure 7 : Structure secondaire des transporteurs ABCG** : Les transporteurs de la sous-famille ABCG ne sont constitués que d'un domaine de liaison à l'ATP, composé des trois motifs conservés (Walker A, Walker B et Signature C) en position N-terminale et d'un domaine transmembranaire avec six hélices *alpha* en position C-terminale. [D'après (Cserepes et al., 2004)]

### 5.2.2. Localisation

Le transporteur ABCG2 a été, tout d'abord, localisé dans les cellules cancéreuses. Cependant, dans les conditions physiologiques, ce transporteur est exprimé dans beaucoup de tissus, dont un grand nombre exprime aussi la P-gp. ABCG2 est notamment localisé au niveau du placenta, du cerveau, du foie, du rein, des intestins et des testicules (Doyle et al., 1998; Maliepaard et al., 2001). Une expression de ce transporteur est également retrouvée dans les barrières physiologiques en particulier la barrière placentaire, où il est fortement exprimé au niveau de la membrane apicale du syncytiotrophoblaste (Maliepaard et al., 2001; Young et al., 2003). A la BHE, ABCG2 est très exprimé du côté luminal des CECCs (Cisternino et al., 2004; Aronica et al., 2005). Ce transporteur est retrouvé dans les glandes mammaires et dans une population particulière de cellules souches (Zhou et al., 2001; Jonker et al., 2005).



### 5.2.3. Substrats et inhibiteurs

ABCG2 assure l'efflux d'un grand nombre de molécules de nature et de structure différentes [Tableau 2]. Les substrats de ce transporteur peuvent être non chargés ou bien chargés positivement ou négativement (Wiese, 2015). Ils peuvent être hydrophobes, lipophiles ou encore hydrophiles, toutefois, ils semblent tous posséder dans leur squelette des régions hydrophobes (Szafraniec et al., 2014). Tout comme pour la P-gp, ABCG2 a été caractérisé dans des cellules tumorales et, de ce fait, les premiers substrats identifiés pour ce transporteur furent des molécules anticancéreuses tels la mitoxantrone et le topotécan (Doyle et al., 1998). Cependant, d'autres médicaments n'appartenant pas à la classe des anticancéreux sont aussi transportés par ABCG2 (Mao and Unadkat, 2015). ABCG2 est aussi un transporteur de molécules endogènes dont l'acide urique ou l'hème (Krishnamurthy et al., 2007). Par ailleurs, certaines molécules peuvent être substrats de la P-gp et aussi d'ABCG2, pour lesquels une coopérativité a été décrite dans les tissus où ils sont tous les deux exprimés (Kodaira et al., 2010).

**Tableau 2: Exemples de substrats d'ABCG2** [d'après (Kerr et al., 2011; Mao and Unadkat, 2015)]

<b>SUBSTRATS D'ABCG2</b>	
<b>anticancéreux</b>	daunorubicine, doxorubicine, épirubicine, imatinib, mitoxantrone, méthotrexate, topotécan
<b>antibiotiques</b>	ciprofloxacine, norfloxacine
<b>antihypertenseur</b>	prazosine
<b>antiviraux</b>	delavirdine, lopinavir, zidovudine
<b>autres</b>	acide urique, estrone-3-sulfate, 17- $\beta$ -estradiol glucuronide, hème, protoporphyrine
<b>fluorophores</b>	Hoechst 33342, lyso tracker green, rhodamine 123

A ce jour, plusieurs molécules ont un effet inhibiteur sur ABCG2. La première d'entre elles a été la fumitrimorgine C, qui appartient à la famille des mycotoxines (Rabindran et al., 2000). Toutefois, cette molécule entraîne des effets neurotoxiques, ce qui a conduit au

développement d'analogues plus efficaces et moins toxiques dont le Ko143 (Allen et al., 2002). Ce dernier est décrit comme l'inhibiteur sélectif de référence d'ABCG2. Cependant, une étude récente a montré que Ko143 pouvait avoir également des effets inhibiteurs sur d'autres transporteurs dont la P-gp et ABCC1 (Weidner et al., 2015). Certaines molécules inhibitrices de tyrosine kinase sont aussi des inhibiteurs sélectifs d'ABCG2 dont certaines quinazolines (imatinib, géfitinib) (Ozvegy-Laczka et al., 2004; Juvale et al., 2013a). Les flavonoïdes semblent aussi être de bons inhibiteurs d'ABCG2 (Juvale et al., 2013b; Wiese, 2015). Enfin, certains inhibiteurs de la P-gp ont aussi été décrits comme inhibiteurs d'ABCG2, parmi lesquels se trouvent l'élacridar et le tariquidar (Thomas and Coley, 2003; Robey et al., 2009). Des dérivés de ce dernier ont été développés avec une forte sélectivité vis-à-vis d'ABCG2 (Kühnle et al., 2009).

#### **2.2.4. Rôles physiologiques et pathologiques**

ABCG2 est un transporteur d'efflux qui participe fortement à la protection de l'organisme contre des molécules endogènes ou des xénobiotiques potentiellement toxiques (Horsey et al., 2016). Son expression ubiquitaire et le grand nombre de composés pouvant interagir avec ABCG2 lui confèrent un rôle important dans beaucoup de processus physiologiques. Il est impliqué dans la limitation de l'absorption intestinale de certaines molécules et dans l'excrétion et l'élimination dans le foie et le rein. A la barrière placentaire, il va assurer l'efflux de substances pouvant être néfastes pour le fœtus, vers la circulation sanguine maternelle (Jani et al., 2014). De plus, pendant la période de lactation, une induction de l'expression d'ABCG2 semble avoir lieu dans les glandes mammaires, au niveau desquelles ce transporteur va effluer vers le lait maternel des molécules bénéfiques ou non pour le nouveau-né (Jonker et al., 2005).

A la BHE, ABCG2 est l'un des principaux transporteurs d'efflux avec la P-gp. Il assure la limitation du passage de molécules de la circulation sanguine périphérique vers le cerveau (Chaves et al., 2014; Mahringer and Fricker, 2016). ABCG2 semble coopérer avec la P-gp, avec laquelle il est co-localisé au niveau de la BHE (Polli et al., 2009; Kodaira et al., 2010).

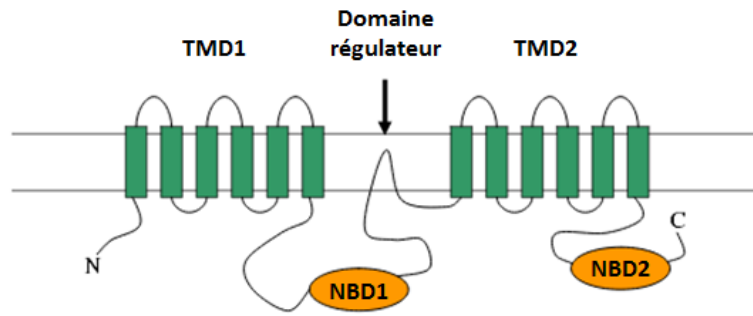
ABCG2 a surtout été étudié pour son efflux de molécules anticancéreuses dont la mitoxantrone, ce qui fait d'elle un acteur majeur de la résistance aux traitements anticancéreux. Ce transporteur assure aussi au niveau rénal l'efflux de l'acide urique du côté

apical des membranes des cellules tubulaires proximales (Horsey et al., 2016). De par cette fonction, ABCG2 semble avoir une implication dans la physiopathologie de la goutte (Woodward, 2015). Par ailleurs, un rôle dans la MA lui a aussi été attribué (Xiong et al., 2009). Son implication dans cette pathologie sera détaillée dans la partie IV (2.2.3.2. *Le transport du peptide  $\beta$ -amyloïde à travers la barrière hémato-encéphalique*).

## **2.3. Le transporteur ABCA1**

### **2.3.1. Présentation**

Le transporteur ABCA1, anciennement appelé ABC1, a été caractérisé pour la première fois chez l'Homme en 1994 par l'équipe de Luciani (Luciani et al., 1994). Il appartient à la sous-famille ABCA constituée de 12 membres (ABCA1 à ABCA10, ABCA12 et ABCA13) caractérisés par leur implication dans le transport de stérols, de phospholipides et d'acides biliaires (Kaminski et al., 2006; Piehler et al., 2012; Davis, 2014). Les membres présentent entre eux une importante homologie dans leur séquence en acides aminés. D'un point de vue structural, ces protéines sont des transporteurs « complets » formés de deux TMDs et deux NBDs. Toutefois les membres de la sous-famille ABCA présentent une particularité dans leur structure : ils possèdent entre leurs deux TMDs un domaine régulateur composé d'un segment très hydrophobe (Broccardo et al., 1999). Ce domaine semble interagir avec la membrane et faciliter le mécanisme de transport [Figure 8]. ABCA1 fut le premier membre de la sous-famille ABCA à avoir été identifié (Oram and Vaughan, 2000). Le gène codant pour ABCA1 est localisé sur le chromosome 9 chez l'Homme et le chromosome 4 chez la Souris et est composé de 49 exons (Langmann et al., 1999; Remaley et al., 1999). Il existe entre ces deux espèces une importante homologie dans leur séquence en acides aminés. La protéine fait 254 kDa et possède 2261 acides aminés (Piehler et al., 2012).



**Figure 8 : Structure secondaire des transporteurs ABCA :** Les transporteurs de la sous-famille ABCA sont constitués de deux domaines transmembranaires (TMD1 et TMD2) ayant chacun six segments transmembranaires, deux domaines de liaison nucléotidique (NBD1 et NBD2) et d'un domaine régulateur situé entre les deux TMDs. [D'après (Albrecht and Viturro, 2007)]

### 2.3.2 Localisation

L'expression d'ABCA1 dans l'organisme est ubiquitaire. Ce transporteur est retrouvé dans de nombreux tissus tels le placenta, le foie, les poumons et le cerveau, en particulier au niveau des neurones et des cellules gliales (Wellington et al., 2002; Karasinska et al., 2009; Piehler et al., 2012). ABCA1 est également très exprimé dans les macrophages du sang total (Langmann et al., 1999). Au niveau cellulaire, ABCA1 est majoritairement localisé à la membrane plasmique, mais il est aussi retrouvé dans des organites tels l'appareil de Golgi ou des vésicules (endosomes, lysosomes) (Orsó et al., 2000; Neufeld et al., 2001).

Des études ont montré qu'à la BHE, ABCA1 était exprimé au niveau des CECCs chez l'Homme, la Souris, le Rat et le Porc (Panzenboeck et al., 2002; Ohtsuki et al., 2004; Do et al., 2011).

### 2.3.3. Substrats et inhibiteurs

A ce jour, seules des molécules endogènes ont été décrites comme substrats pour ABCA1. Parmi ses substrats, sont retrouvés le cholestérol et les phospholipides telles la phosphatidylcholine et la phosphatidylsérine (Nagao et al., 2011; Piehler et al., 2012). Les oxystérols pourraient aussi être des substrats potentiels de ce transporteur (Tam et al., 2006).

Le principal inhibiteur décrit pour ABCA1 est le probucol. Ce dernier est un médicament hypolipidémiant, développé à l'origine pour le traitement de l'hypertension artérielle (Favari

et al., 2004). D'autres molécules peuvent inhiber ABCA1 comme la ciclosporine A et le valsopodar, deux molécules initialement décrites comme inhibiteurs de la P-gp (Nagao et al., 2013). Nagao et al. ont montré *in vitro* que ces deux molécules inhibent l'efflux cellulaire médié par ABCA1 par une liaison directe avec ce transporteur. Récemment, l'effet modulateur d'une statine, la pivasstatine, sur l'expression d'ABCA1 a été décrit *in vitro* dans une lignée humaine de monocytes différenciés en macrophages (Zhang et al., 2016).

#### **2.3.4. Rôles physiologiques et pathologiques**

ABCA1 est l'un des principaux acteurs intervenant dans le métabolisme du cholestérol. Il assure l'efflux cellulaire du cholestérol en particulier vers l'apolipoprotéine A-I, un constituant majeur des lipoprotéines de haute densité (ou HDL pour high density lipoprotein). Son expression et sa fonction peuvent être régulées par le complexe LXR/RXR (liver X receptor/retinoid X receptor) (Repa et al., 2000; Nagao et al., 2011; Koldamova et al., 2014). De plus, il semblerait qu'ABCA1 participe à la synthèse de nouvelles HDL (Wang and Smith, 2014). Notre équipe a montré que ce transporteur était fonctionnel au niveau de la BHE, notamment en participant à la clairance cérébrale du cholestérol (Do et al., 2011).

De par son rôle de transporteur d'efflux du cholestérol, ABCA1 est impliqué dans plusieurs processus physiologiques. La présence d'ABCA1 au niveau de macrophages engagés dans l'élimination de cellules mortes suggère une implication de ce transporteur dans l'apoptose cellulaire (Luciani and Chimini, 1996). Une autre étude a montré que l'absence d'ABCA1 dans le cerveau chez la Souris entraînait des anomalies structurales et fonctionnelles des neurones (Karasinska et al., 2009). La présence de ce transporteur pourrait avoir des effets protecteurs notamment vis-à-vis de certaines infections bactériennes (par exemple : des mycobactéries) ou virales (par exemple : le virus de l'hépatite C) (Bocchetta et al., 2014; Long et al., 2016).

Un dysfonctionnement de ce transporteur peut entraîner le développement de maladies. Ainsi, l'implication pathologique d'ABCA1 est principalement décrite dans la maladie de Tangier. Cette maladie est due à des mutations du gène codant pour ABCA1 (Singaraja et al., 2003). Les personnes atteintes de cette maladie présentent un important déficit en HDL (Brooks-Wilson et al., 1999). De plus, un défaut d'ABCA1 semblerait être un facteur dans le développement de maladies cardiovasculaires telle l'athérosclérose (Aiello et al., 2002;

Oram and Heinecke, 2005). ABCA1 est également étroitement lié à la MA (Koldamova et al., 2010). Le rôle exact d'ABCA1 dans cette pathologie est encore inconnu. Cependant, une augmentation de l'expression d'ABCA1 a été montrée dans les neurones de l'hippocampe ainsi que dans les CECCs dans des modèles de souris développant la MA (Kim et al., 2010a; Do et al., 2015). Son implication dans la MA sera détaillée dans la partie IV (2.2.3.2. *Le transport du peptide  $\beta$ -amyloïde à travers la barrière hémato-encéphalique*).

### **3. Les transporteurs ABC potentiellement exprimés à la barrière hémato-encéphalique**

#### **3.1. Le transporteur ABCG1**

##### **3.1.1. Présentation**

ABCG1, ou encore ABC8, est le premier membre de la sous-famille ABCG. Chez l'Homme, le gène codant pour cette protéine est localisé sur le chromosome 21 et est constitué de 23 exons (Langmann et al., 1999; Kennedy et al., 2001). Il a été cloné pour la première fois en 1996 (Chen et al., 1996). Le gène est traduit en une protéine d'environ 76 kDa composée de 674 acides aminés. ABCG1 est un demi-transporteur qui a la capacité de s'homodimériser ou de s'hétérodimériser avec ABCG4, un autre membre de la sous-famille ABCG. ABCG1 et ABCG4 présentent tous deux une forte homologie, ils partagent environ 80% de similarité dans leur séquence en acides aminés (Bojanic et al., 2010).

##### **3.1.2. Localisation**

Le transporteur ABCG1 est exprimé dans un grand nombre de tissus. Il est principalement retrouvé dans le cerveau ainsi que dans des tissus riches en macrophages tels le foie, la rate ou le poumon (Chen et al., 1996; Cserepes et al., 2004; Wang et al., 2004). Dans le cerveau, ABCG1 est co-localisé avec ABCG4 au niveau des neurones et des astrocytes (Tarr and Edwards, 2008; Wang et al., 2008; Sano et al., 2016). A ce jour, il y a peu de données concernant l'expression de ce transporteur au niveau de la BHE. Une étude réalisée sur un

modèle cellulaire de BHE a mis en évidence sa présence au niveau de CECCs bovines (Gosselet et al., 2009).

Au niveau subcellulaire, ABCG1 semble avoir majoritairement une localisation intracellulaire, mais il peut également être retrouvé à la membrane plasmique (Klucken et al., 2000; Lorkowski et al., 2001). LXR peut induire une augmentation de l'expression d'ABCG1 ainsi qu'une redistribution de ce transporteur vers la membrane plasmique afin d'assurer une partie de ses fonctions (Wang et al., 2006).

### **3.1.3. Substrats et inhibiteurs**

Peu de molécules ont été identifiées comme étant des substrats potentiels d'ABCG1. Parmi elles, se trouvent des stérols (le cholestérol, le desmostérol et des métabolites du cholestérol) et des sphingolipides (Wang et al., 2004; Vaughan and Oram, 2006; Wang et al., 2008; Kerr et al., 2011). A ce jour, il n'existe pas pour ce transporteur d'inhibiteurs spécifiques identifiés *in vivo*. Néanmoins une étude *in vitro* a mis en évidence un effet inhibiteur de trois molécules (benzamil, ciclosporine, L-thyroxine) sur l'activité d'ABCG1 (Cserepes et al., 2004). Par ailleurs, ce transporteur n'est pas inhibé par le probucol (Luthi et al., 2015).

### **3.1.4. Rôles physiologiques et pathologiques**

Dans l'organisme, le transporteur ABCG1 joue un rôle important dans la régulation de lipides tel le cholestérol (Klucken et al., 2000; Kennedy et al., 2005; Kusuhara and Sugiyama, 2007). L'importance de ce rôle a notamment été mise en évidence par une étude faite chez des souris *Abcg1*<sup>-/-</sup> recevant une alimentation riche en graisses et en lipides. Bien que chez ces animaux aucune différence de lipidémie n'a été relevée par rapport aux animaux contrôles, une importante accumulation de lipides a été observée dans les hépatocytes et macrophages de différents tissus (Kennedy et al., 2005). Une hypothèse de collaboration entre ABCG1 et ABCA1 a été proposée pour assurer l'efflux cellulaire du cholestérol vers les HDL (Gelissen et al., 2006; Vaughan and Oram, 2006; Yvan-Charvet et al., 2007). Dans la maladie de Tangier, une augmentation de l'expression d'ABCG1 a été observée dans les

macrophages de patients afin de compenser en partie le déficit en ABCA1 (Lorkowski et al., 2001).

La fonction d'ABCG1 a été décrite comme pouvant être régulée par la voie LXR ou PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) (Li et al., 2004; Wang et al., 2004; Gelissen et al., 2010). Ces deux voies peuvent augmenter l'expression d'ABCG1 et stimuler l'efflux du cholestérol vers les HDL.

Par ailleurs, un rôle dans l'apoptose semble lui être attribué notamment au niveau des macrophages (Seres et al., 2008). Récemment, une étude *in vitro* a montré que l'hétérodimère ABCG1/ABCG4 pouvait induire l'apoptose (Hegyí and Homolya, 2016).

L'implication d'ABCG1 a été suggérée dans la physiopathologie de certaines maladies dont l'inflammation pulmonaire, l'athérosclérose ou encore la MA (Baldán et al., 2006; Out et al., 2007; Wojcik et al., 2008; Abuznait and Kaddoumi, 2012). Une étude récente a mis en évidence l'implication d'ABCG1 avec ABCG4 dans la modification de l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase, une enzyme participant à la synthèse du peptide A $\beta$ , diminuant ainsi sa production (Sano et al., 2016).

## **3.2. Le transporteur ABCG4**

### **3.2.1. Présentation**

ABCG4, membre de la sous-famille ABCG, est peu décrit dans la littérature. Ce transporteur a été identifié pour la première fois en 2001 grâce aux travaux menés par Annilo et son équipe (Annilo et al., 2001). ABCG4 est une protéine de 64 kDa constituée de 646 acides aminés (Engel et al., 2001). Son gène codant a été caractérisé au niveau du chromosome 11 chez l'Homme et du chromosome 9 chez la Souris. Tout comme les autres membres de la sous-famille ABCG, ABCG4 est un demi-transporteur qui, pour devenir fonctionnel, peut s'homodimériser avec un autre ABCG4 ou s'hétérodimériser avec ABCG1. Comme expliqué précédemment, ces deux transporteurs partagent entre eux une forte homologie dans leur séquence en acides aminés (Engel et al., 2001; Oldfield et al., 2002; Bojanic et al., 2010). De ce fait, Annilo et al. avaient émis l'hypothèse d'un potentiel rôle d'ABCG4 dans le transport du cholestérol au niveau cérébral (Annilo et al., 2001).



### **3.2.2. Localisation**

L'expression d'ABCG4 est limitée à certains tissus. Chez l'Homme et le Rongeur, ABCG4 est principalement localisé dans le cerveau où il est co-exprimé avec ABCG1 au niveau des neurones et des astrocytes (Tarr and Edwards, 2008; Wang et al., 2008; Sano et al., 2016). Il est aussi retrouvé dans d'autres tissus tels l'œil, les testicules et les poumons (Oldfield et al., 2002; Koshiba et al., 2008; Matsuo, 2010). L'expression d'ABCG4 semble pouvoir être régulée par le complexe LXR/RXR (Engel et al., 2001; Wang et al., 2008; Graham, 2015). La localisation cellulaire d'ABCG4 a été majoritairement décrite au niveau de la membrane plasmique de différents modèles cellulaires humains et murins (Hegyí and Homolya, 2016). Il semblerait également que ce transporteur soit exprimé au niveau de l'appareil de Golgi, et cela notamment dans les cellules souches hématopoïétiques (Murphy et al., 2013; Westerterp et al., 2014).

Il existe peu d'informations quant à la localisation d'ABCG4 au niveau de la BHE. Des travaux, réalisés dans notre équipe, ont permis de mettre en évidence l'expression de ce transporteur au niveau des microvaisseaux des capillaires cérébraux isolés, chez la Souris (Do et al., 2012). Cependant, sa localisation cellulaire exacte n'est pas encore connue.

### **3.2.3. Substrats et inhibiteurs**

A ce jour, très peu de molécules ont été identifiées comme pouvant être un substrat ou un inhibiteur du transporteur ABCG4. Les seuls substrats connus *in vivo* d'ABCG4 sont le cholestérol et le desmostérol (Wang et al., 2004; Vaughan and Oram, 2006; Wang et al., 2008). Néanmoins, notre équipe a montré *in vitro* sur des cellules transfectées par le gène murin *Abcg4*, que le peptide A $\beta$  était aussi un substrat d'Abcg4. De plus, il a été mis en évidence que ce transport cellulaire médié par Abcg4 était inhibé par le probucol, qui est ainsi le seul inhibiteur d'Abcg4 actuellement identifié *in vitro* (Do et al., 2012).

### **3.2.4. Rôles physiologiques et pathologiques**

Les fonctions physiologiques d'ABCG4 restent encore assez peu connues. ABCG4 participe à l'efflux cellulaire du cholestérol et du desmostérol vers les particules d'HDL (Wang et al., 2004; Vaughan and Oram, 2006; Tarr and Edwards, 2008; Wang et al., 2008). Récemment, il a été montré qu'une déficience en ABCG4 dans les cellules souches hématopoïétiques entraînait un défaut dans l'efflux cellulaire du cholestérol mais aussi une augmentation de la prolifération des cellules souches hématopoïétiques et de la production des plaquettes. Ces observations suggèrent un rôle d'ABCG4 dans la prolifération cellulaire (Murphy et al., 2013; Westerterp et al., 2014). ABCG4 semble également induire *in vitro* l'apoptose (Hegyí and Homolya, 2016).

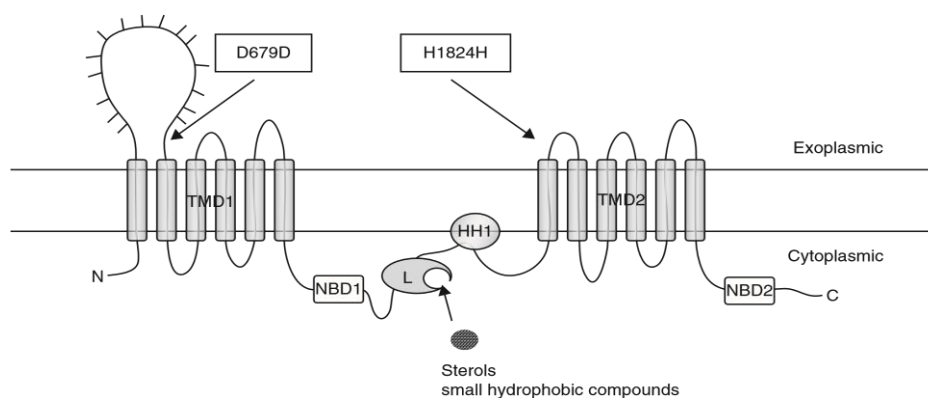
De par sa fonction de transporteur d'efflux de stérols, l'implication d'ABCG4 a été suggérée dans des maladies mettant en jeu le cholestérol telle la MA (Poirier, 2003; Koshiha et al., 2008). Bien que les mécanismes de l'interaction entre ABCG4 et cette pathologie ne soient pas encore bien compris, des études ont montré que les quantités d'ABCG4 étaient augmentées dans les cerveaux de personnes atteintes de cette pathologie (Uehara et al., 2008) et au niveau des CECCs dans un modèle de souris développant la MA (Do et al., 2015). De plus, une détérioration de la mémoire associative a été observée chez des souris déficientes en *Abcg4* (Bojanic et al., 2010). Une étude récente a démontré que la production du peptide A $\beta$  était diminuée en présence d'ABCG1 et ABCG4 (Sano et al., 2016). Son implication dans la MA sera détaillée dans la partie IV (2.2.3.2. *Le transport du peptide  $\beta$ -amyloïde à travers la barrière hémato-encéphalique*).

## **3.3. Le transporteur ABCA2**

### **3.3.1. Présentation**

Le transporteur ABCA2, autrefois nommé ABC2, a été identifié en 1994 par l'équipe de Luciani en même temps que le transporteur ABCA1 (Luciani et al., 1994). Son gène est localisé sur le chromosome 9 près du gène codant pour ABCA1 chez l'Homme et sur le chromosome 2 chez la Souris (Ile et al., 2004; Albrecht and Viturro, 2007). Les deux transporteurs, qui présentent une forte homologie entre eux, semblent être issus de la

duplication d'un ancêtre commun (Albrecht and Viturro, 2007). Le gène *ABCA2* est constitué de 48 exons et code pour une protéine de 270 kDa possédant 2436 acides aminés. Contrairement aux autres ABCA, *ABCA2* possède dans sa structure secondaire un motif signature des lipocalines, le motif L, qui lui confère la capacité de se lier et de transporter des petites molécules hydrophobes tels les stéroïdes ou les lipides (Mack et al., 2008) [Figure 9]. Ce transporteur a été initialement étudié pour son implication dans la résistance à des traitements anticancéreux (Ile et al., 2004).



**Figure 9 : Structure secondaire prédite du transporteur ABCA2 :** ABCA2 a la particularité de posséder un motif particulier, le motif L permettant la liaison de ce transporteur aux petites molécules hydrophobes. HH1 est le domaine régulateur situé entre les deux TMDs (TMD1 et 2) communs à tous les ABCA. [D'après (Mack et al., 2008)]

### 3.3.2. Localisation

Tout comme pour *ABCA1*, ce transporteur est retrouvé dans un grand nombre de tissus. *ABCA2* est majoritairement exprimé dans le cerveau et dans le système nerveux périphérique, et plus particulièrement au niveau des cellules impliquées dans la myélinisation tels les oligodendrocytes et les cellules de Schwann mais aussi au niveau des neurones (Luciani et al., 1994; Kim et al., 2006; Saito et al., 2007). Son expression a également été détectée dans un modèle cellulaire de BHE humaine (hCMEC/D3) ainsi qu'au niveau de CECCs humaines isolées (Shawahna et al., 2011; Ohtsuki et al., 2013). D'autres tissus expriment *ABCA2* tels les ovaires, la prostate, les leucocytes, les macrophages et des cellules cancéreuses (Vulevic et al., 2001; Ile et al., 2004; Kim et al., 2006). La localisation

subcellulaire de ce transporteur est décrite au niveau des organites cytoplasmiques, en particulier dans l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique et des vésicules (endosomes et lysosomes) (Mack et al., 2007a).

### **3.3.3. Substrats et inhibiteurs**

A ce jour, aucun substrat ni inhibiteur n'ont été identifiés pour ABCA2. Néanmoins, il a été suggéré que ce transporteur pouvait avoir un rôle dans le transport du 17- $\beta$ -estradiol et de certains anticancéreux telle l'estramustine (Laing et al., 1998; Boonstra et al., 2004; Efferth et al., 2006; Mack et al., 2007a). De plus, une diminution de sphingomyélines ainsi qu'une accumulation de gangliosides ont été observées dans le cerveau de souris déficientes en *Abca2*, suggérant une implication d'ABCA2 dans le métabolisme lipidique (Sakai et al., 2007). Il semblerait donc qu'à l'inverse d'ABCA1, ABCA2 pourrait assurer le transport de molécules endogènes ainsi que de molécules exogènes.

### **3.3.4. Rôles physiologiques et pathologiques**

Le transporteur ABCA2 est principalement décrit comme jouant un rôle important dans l'homéostasie et le métabolisme intracellulaires du cholestérol et des sphingolipides (Kaminski et al., 2001; Davis et al., 2004; Sakai et al., 2007). L'implication de cette protéine dans le transport des sphingolipides dont les sphingomyélines semble lui conférer un rôle dans le processus de myélinisation au niveau du système nerveux central et périphérique. Une étude réalisée sur des souris déficientes en *Abca2* a mis en évidence un défaut dans la structure des myélines ce qui a pour conséquence une anomalie dans la transmission du signal nerveux. De plus, une hyperactivité et des tremblements ont été observés chez ces souris en comparaison à des souris contrôles. Ces comportements pourraient être liés au dysfonctionnement engendré par l'absence d'*Abca2* (Mack et al., 2007b).

La fonction d'ABCA2 a été associée à certaines pathologies. Ce transporteur est surtout étudié pour son implication en cancérologie (Mack et al., 2008). En effet, son expression dans des cellules cancéreuses est mise en cause dans la mise en place d'un phénotype de résistance aux traitements anticancéreux. Ce phénomène a été mis en évidence pour la première fois dans des cellules cancéreuses ovariennes, au niveau desquelles une

surexpression d'ABCA2 semblait participer à la résistance des cellules tumorales à l'estrามustine, un médicament anticancéreux (Laing et al., 1998). Le phénotype MDR apporté par ABCA2 aux cellules a aussi été observé pour d'autres molécules anticancéreuses tels le méthotrexate, la mitoxantrone, la doxorubicine (Boonstra et al., 2004; Efferth et al., 2006).

Récemment, des études ont montré le rôle pathologique potentiel d'ABCA2 dans la leucémie aiguë lymphoblastique chez l'enfant (Aberuyi et al., 2014; Rahgozar et al., 2014). ABCA2 semble aussi être lié à d'autres maladies telles l'athérosclérose ou encore la MA (Chen et al., 2004; Calpe-Berdiel et al., 2012; Michaki et al., 2012). Pour cette dernière, le mécanisme d'interaction avec ABCA2 n'est pas encore bien compris. Cependant, un polymorphisme de type SNP (single-nucleotide polymorphism) pour ABCA2 a été identifié dans la MA (Macé et al., 2005; Wollmer et al., 2006). Son implication dans cette pathologie sera détaillée dans la partie IV (2.2.3.2. *Le transport du peptide  $\beta$ -amyloïde à travers la barrière hémato-encéphalique*).

## 4. Résumé

**Tableau 3: Récapitulatif des connaissances générales sur les transporteurs ABC étudiés durant le doctorat.** [d'après (Matsuo, 2010; Sodani et al., 2012; Pahnke et al., 2014; Theodoulou and Kerr, 2015)]

Nom	Structure	Substrats	Principaux inhibiteurs	Pathologies
ABCA1	complet	cholestérol, phospholipides	probucol	maladie de Tangier, MA
ABCA2	complet	lipides ? anticancéreux ?	?	cancers, MA
ABCB1 (P-gp)	complet	nombreux médicaments (cf. tableau 1), peptide A $\beta$	élacridar (GF120918), valsopodar (PSC833), vérapamil	cancers, épilepsie, MA
ABCG1	demi	cholestérol, desmostérol, sphingolipides	benzamil, ciclosporine A, L-thyroxine	MA
ABCG2 (BCRP)	demi	nombreux médicaments (cf. tableau 2), acide urique, peptide A $\beta$	élacridar (GF120918), Ko143, quinazoline	cancers, la goutte, MA
ABCG4	demi	cholestérol, desmostérol, sphingolipides, peptide A $\beta$ ?	probucol	MA

### **III. Les transporteurs SLC exprimés à la barrière hémato-encéphalique**

#### ***1. Généralités***

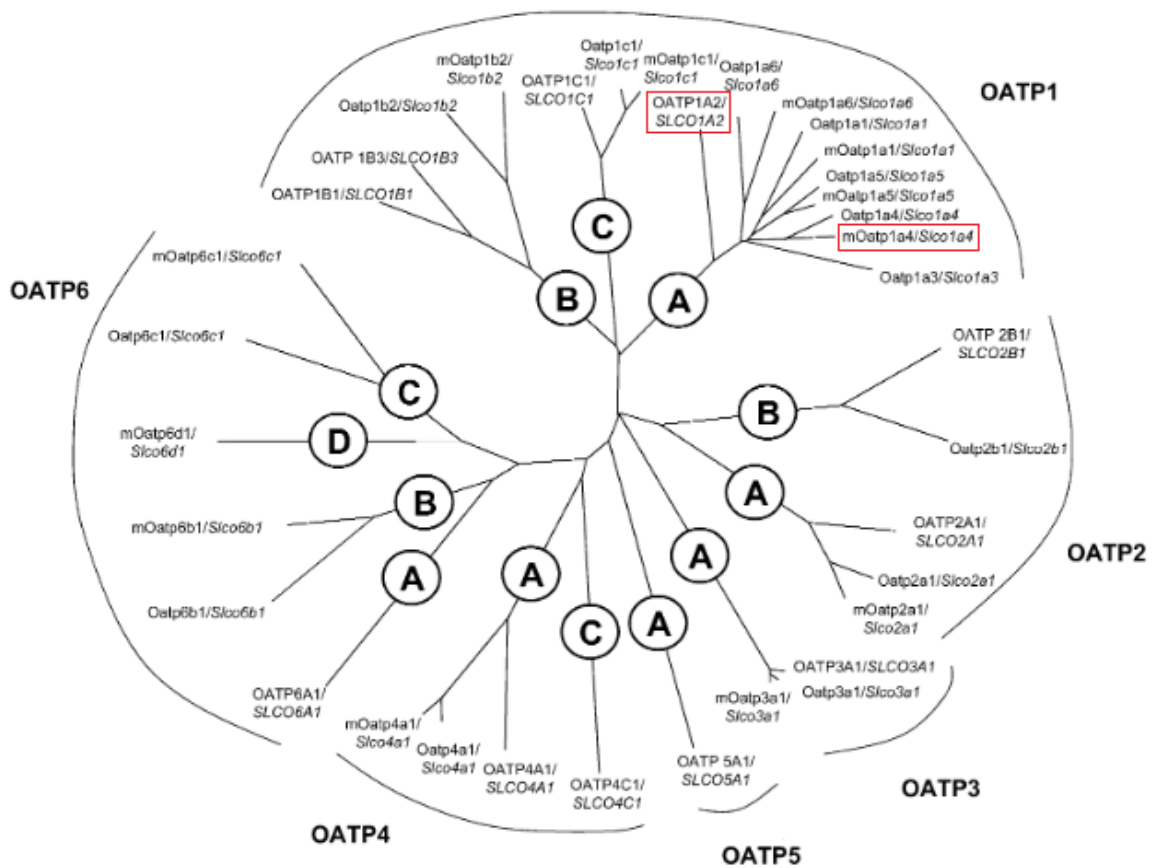
Les transporteurs SLC appartiennent à la plus grande superfamille de protéines. Chez l'Homme, cette superfamille compte environ 395 membres regroupés en 52 familles (Lin et al., 2015). Les transporteurs SLC peuvent assurer un transport facilité ou un transport actif de type secondaire ou tertiaire. Leur principale fonction est de participer à l'efflux ou l'influx, à travers les membranes plasmiques, d'un nombre important de composés endogènes ou exogènes (Lin et al., 2015).

Plusieurs familles de SLC sont retrouvées au niveau des capillaires cérébraux, parmi lesquelles se trouvent les transporteurs de la famille OATP (organic anion transporting polypeptides, SLC21 ou SLCO) (Dahlin et al., 2009).

#### ***2. La famille OATP***

Les membres de la famille OATP transportent une variété importante de molécules endogènes ou exogènes. Leurs substrats sont généralement des molécules amphiphiles ayant une masse moléculaire supérieure à 350 Da, tels les acides biliaires, les stéroïdes conjugués et les hormones thyroïdiennes (Roth et al., 2012). Les mécanismes de transport des OATPs ne sont pas encore bien établis. Bien que ce transport bidirectionnel soit indépendant de l'ATP et du sodium, sa source d'énergie reste encore mal connue (Roth et al., 2012). Néanmoins, il a été suggéré que le transport de substrats par les OATPs pourraient se faire grâce à un échange avec du glutathion ou ses conjugués intracellulaires (Li et al., 2000). De plus, les travaux de Leuthold et al. ont suggéré que le transport médié par les OATPs pourrait être dépendant du pH dans le milieu extracellulaire. Ainsi, un milieu extracellulaire acide serait plus favorable à l'influx par les OATPs, tandis qu'à l'inverse un milieu extracellulaire basique aurait des effets inhibiteurs (Leuthold et al., 2009).

A ce jour, plus de 300 membres de la famille OATP ont été identifiés et sont classés en six sous-familles (OATP1 à OATP6) (Hagenbuch and Stieger, 2013) [Figure 10].

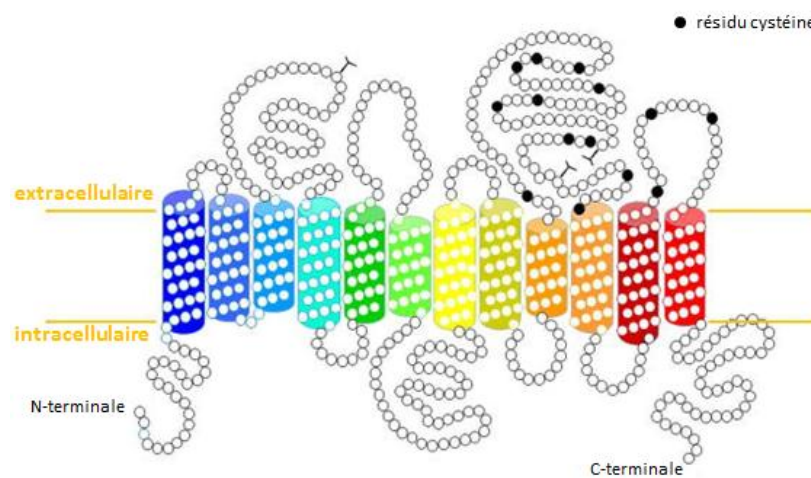


**Figure 10 : Classification phylogénétique des membres de la sous-famille OATP chez l’Homme :** Chez l’Homme, les transporteurs OATP sont regroupés dans six sous-familles (OATP 1 à 6). [D’après (Hagenbuch and Meier, 2003)]

Le premier transporteur OATP caractérisé chez l’Homme fut le transporteur OATP1A2 (SLC21A3, SLCO1A2) (Kullak-Ublick et al., 1995). Son équivalent murin, Oatp1a4 (Slc21a5, Slco1a4), a été identifié pour la première fois chez le Rat en 1997 (Noé et al., 1997). La structure de ces transporteurs n’est pas encore bien connue mais il a été suggéré que la protéine soit composée de 12 hélices  $\alpha$  transmembranaires, avec les terminaisons N- et C-terminales localisées dans le cytosol. De plus, une large boucle riche en résidus cystéines semble relier les hélices 9 et 10 (Hagenbuch and Stieger, 2013; Zhou et al., 2015) [Figure 11]. OATP1A2 (Oatp1a4) est décrit dans plusieurs tissus avec une expression plus importante dans le cerveau, le foie, le rein, les testicules et le poumon (Hagenbuch and Meier, 2003; Roth et al., 2012). Au niveau du foie et du rein, il est principalement localisé sur la membrane apicale des cholangiocytes et des néphrons distaux (Lee et al., 2005). Une forte expression de ce transporteur est aussi retrouvée à la BHE, plus précisément sur les deux



pôles apical et basolatéral des CECCs (Gao et al., 2000; Bronger et al., 2005; Strazielle and Gherzi-Egea, 2013; Zhou et al., 2015). A la BHE, la fonction principale d'OATP1A2 (Oatp1a4) est d'assurer le transport de molécules endogènes ou exogènes dont un grand nombre de médicaments (Kalliokoski and Niemi, 2009). Oatp1a4 semble être la principale isoforme des Oatp impliqués dans l'influx cérébral des statines (Thompson et al., 2014). Une étude réalisée chez des souris n'exprimant plus ce transporteur a mis en évidence une diminution de l'entrée cérébrale de statines dont la rosuvastatine et l'atorvastatine (Ose et al., 2010).



**Figure 11 : Structure secondaire des OATPs :** Les OATPs semblent être constitués de deux hélices  $\alpha$  transmembranaires. Les domaines N- et C-terminales ont une localisation intracellulaire. Entre les hélices 9 et 10 se trouve une grande boucle riche en résidus cystéines. [D'après (Hagenbuch and Stieger, 2013)]

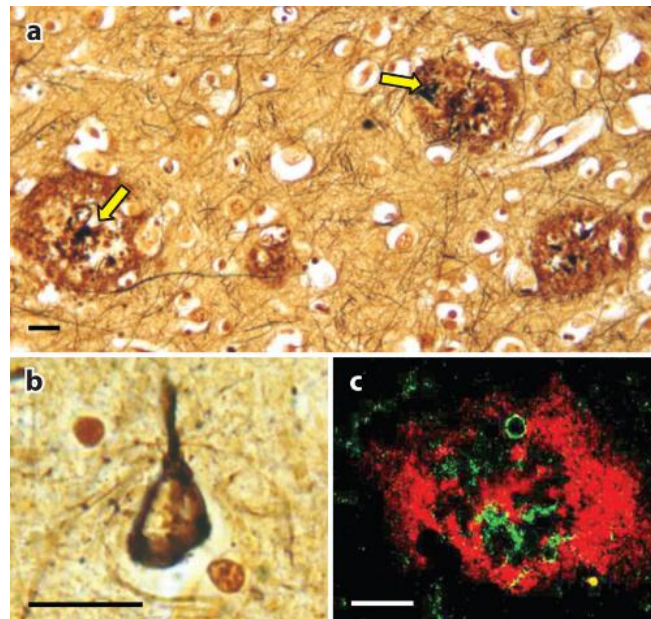
## **IV. La maladie d'Alzheimer**

### ***1. Généralités sur la maladie d'Alzheimer***

La maladie d'Alzheimer (MA) fut décrite pour la première fois par un neuropathologiste et clinicien, le Dr. Aloïs Alzheimer, en 1907 (Ramirez-Bermudez, 2012). Cette pathologie conduit à une mort neuronale progressive qui entraîne petit-à-petit une perte irréversible des fonctions cérébrales telle la mémoire et à terme la mort. La MA fait partie des pathologies neurodégénératives les plus fréquentes chez les personnes âgées. En 2015, environ 50 millions de personnes dans le monde souffraient de démence dont 80% des cas étaient dus à la MA (Kumar et al., 2015). Ce nombre devrait tripler voire quadrupler d'ici 2050. Il existe deux formes de cette maladie qui apparaissent à des âges différents. Les formes précoces (ou familiales) de la MA, représentent environ 1% des cas. Ces formes, souvent liées à des mutations génétiques, peuvent apparaître dès l'âge de 30 ans. Les formes tardives (ou sporadiques) sont les formes les plus fréquentes de la MA, qui apparaissent en général après 65 ans (Kuruva and Reddy, 2016). Différents facteurs de risque seraient liés à ces formes sporadiques tels le style de vie, l'alimentation, le stress, le risque de maladies cardiovasculaires ou encore le diabète (Baumgart et al., 2015).

### ***2. Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer***

Deux types de lésions caractéristiques de la MA ont été décrits : les enchevêtrements neurofibrillaires dus à une accumulation dans les neurones de la protéine tau (tubule associated unit) hyperphosphorylée, et des plaques amyloïdes issues de l'accumulation et de l'agrégation du peptide A $\beta$  (Savelieff et al., 2013). Cependant, les origines de la survenue de ces lésions et donc de la maladie ne sont pas encore très bien connues [Figure 12].



**Figure 12 : Lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (MA) :** Coupes de cerveau d'un patient atteint de la MA montrant les plaques séniles [a] et les enchevêtrements neurofibrillaires [b]. L'image [c] montre une plaque sénile marquée avec un anticorps anti-peptide A $\beta$  (coloration rouge) au niveau de laquelle est observée une infiltration de microglies marquées avec un anticorps anti-IBA1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1, coloration verte). [D'après (O'Brien and Wong, 2011)]

## 2.1. Les enchevêtrements neurofibrillaires : la protéine tau

Les premières descriptions des enchevêtrements (ou dégénérescences) neurofibrillaires (NFTs, neurofibrillary tangles) ont été faites au début du 20<sup>ème</sup> siècle par, entre autres, le Dr. Alois Alzheimer (Ramirez-Bermudez, 2012; Arendt et al., 2016). Ce n'est que plusieurs années plus tard que des travaux ont permis de mettre en évidence que ces NFTs étaient majoritairement formés de filaments appariés en hélices (PHF, paired helical filaments), eux-mêmes constitués de protéines tau hyperphosphorylées (Arendt et al., 2016). Les NFTs sont caractéristiques des tauopathies qui sont des pathologies neurodégénératives de type sporadique ou familial telles la MA, la maladie de Pick ou encore la démence fronto-temporale avec syndrome parkinsonien liée au chromosome 17 (FTDP-17) (Iqbal et al., 2009).

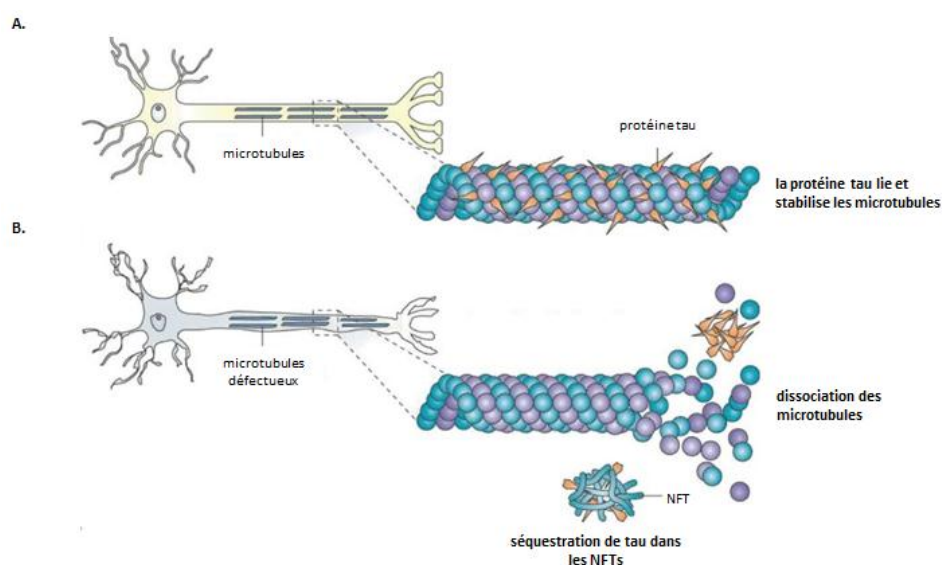
### ***2.1.1. Structure et fonction de la protéine tau***

La protéine tau appartient à la famille des protéines associées aux microtubules (les MAPs) (Savelieff et al., 2013). Elle est codée par un gène localisé chez l'Homme au niveau du chromosome 17 et qui présente six isoformes différentes dont les séquences varient entre 352 et 441 acides aminés (Goedert et al., 1989; Meraz-Ríos et al., 2010). La protéine tau est constituée au niveau N-terminal d'un domaine appelé le domaine de projection qui contient un sous-domaine riche en prolines et un sous-domaine N-terminal. Le domaine de projection est suivi du domaine de liaison aux microtubules (MTBD) qui comporte lui aussi deux sous-domaines : l'un constitué de motifs répétés qui se lient et stabilisent les microtubules et l'autre C-terminal. Le nombre de motifs répétés (3 ou 4) varie d'une isoforme à l'autre (Ballatore et al., 2007; Savelieff et al., 2013). Les protéines tau sont principalement retrouvées au niveau des axones des neurones où elles interagissent avec les tubulines en induisant leur polymérisation en microtubules (Weingarten et al., 1975; Iqbal et al., 2009). Elles sont donc impliquées dans l'assemblage et le maintien des microtubules. Ces derniers sont des constituants importants du cytosquelette des neurones, qui participent notamment au maintien de leur structure cellulaire et au transport axonal (Jakob-Roetne and Jacobsen, 2009; Ward et al., 2012). L'activité biologique de la protéine tau est régulée par des modifications post-traductionnelles dont la phosphorylation et la déphosphorylation (Ballatore et al., 2007). Ainsi, les protéines tau vont continuellement passer d'un état phosphorylé à un état déphosphorylé (Dal Prà et al., 2015). Ces modifications de structure permettent de contrôler la liaison de ces protéines tau aux microtubules. Lorsque les protéines tau sont phosphorylées, leur affinité aux microtubules diminue ce qui entraîne une rupture de la liaison tau/microtubule et donc une déstabilisation cellulaire.

### ***2.1.2. Le rôle physiopathologique de la protéine tau***

Un déséquilibre entre l'état de phosphorylation et de déphosphorylation des protéines tau peut être impliqué dans certaines pathologies neurologiques dont les tauopathies. Ces dernières sont la conséquence d'une hyperphosphorylation des protéines tau (Ballatore et al., 2007). Dans la MA, les six isoformes de la protéine tau semblent être touchées par cette hyperphosphorylation (Goedert et al., 1992). A l'état hyperphosphorylé, les protéines tau ne

peuvent plus se lier aux microtubules et assurer leur fonction. Un défaut de liaison tau/microtubules va engendrer une déstabilisation des microtubules. Ce phénomène peut entraîner une perte du transport axonal et un dysfonctionnement synaptique, qui pourrait participer ainsi à la neurodégénérescence (Dal Prà et al., 2015; Panza et al., 2016). Par ailleurs, les protéines tau hyperphosphorylées vont s'accumuler dans le cytosol des neurones et s'agréger en PHFs pour aboutir à la formation de NFTs (Brunden et al., 2009; Gerson et al., 2016) [Figure 13]. Une corrélation existe entre l'étendue des NFTs dans le cerveau et la gravité de la démence (Guillozet et al., 2003; Santacruz et al., 2005). Néanmoins, les NFTs ne semblent pas être les éléments neurotoxiques dans le MA (Ding and Johnson, 2008; Ward et al., 2012). Au contraire, les NFTs auraient plutôt un effet neuroprotecteur grâce à leur capacité à séquestrer des protéines anormales et des monomères ou des oligomères neurotoxiques de la protéine tau hyperphosphorylée, afin de les empêcher d'exercer leur effet et de favoriser leur élimination (Panza et al., 2016). Les oligomères de la protéine tau hyperphosphorylée, qui sont des formes intermédiaires apparaissant avant les NFTs, ont les effets les plus neurotoxiques dans les tauopathies (Ding and Johnson, 2008; Gerson et al., 2016). Toutefois, à ce jour, les mécanismes responsables des effets neurotoxiques de la protéine tau hyperphosphorylée ne sont pas encore identifiés.



**Figure 13 : Fonction de la protéine tau dans un neurone sain [A] et dans une tauopathie [B]. [D'après (Brunden et al., 2009)]**

## 2.2. Les plaques amyloïdes : le peptide $\beta$ -amyloïde

Les plaques amyloïdes (ou séniles) sont formées par l'agrégation de peptides A $\beta$  accumulés dans l'espace extracellulaire. Ce phénomène peut participer au développement de maladies telles l'angiopathie amyloïde cérébrale (CAA) ou encore la myosite à inclusion sporadique (Deane et al., 2009). Son rôle physiopathologique est surtout étudié dans la MA où l'accumulation du peptide A $\beta$  dans le cerveau, en majorité l'isoforme A $\beta_{1-42}$ , représente l'un des principaux marqueurs de cette maladie.

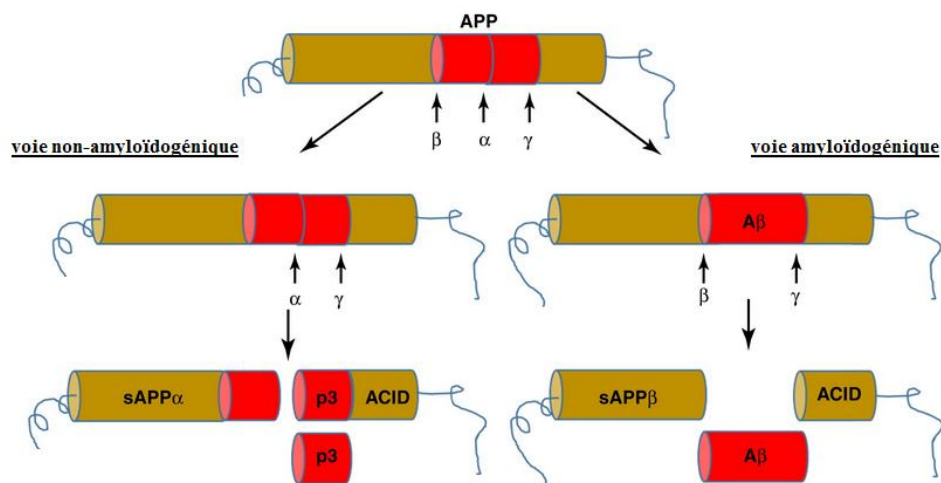
### 2.2.1 Formation du peptide $\beta$ -amyloïde

Le peptide A $\beta$  est un monomère amphiphile synthétisé à partir de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) (Elali and Rivest, 2013; Yates et al., 2013). Cette dernière est une métalloprotéine transmembranaire constituée d'une région N-terminale extracellulaire et d'un domaine transmembranaire à l'extrémité C-terminale, appelé AICD (APP intracellular domain) (Savelieff et al., 2013). L'APP est retrouvée dans différents tissus, notamment au niveau du SNC (Plummer et al., 2016). Le rôle physiologique de cette protéine n'est pas encore bien connu. Cependant, elle possède des domaines de liaisons aux métaux ce qui pourrait lui conférer une implication dans la régulation de l'homéostasie et du transport des métaux (Ciuculescu et al., 2005; DeToma et al., 2012).

L'APP est métabolisée par clivage protéolytique selon deux voies : amyloïdogénique ou non-amyloïdogénique [Figure 14]. La voie non-amyloïdogénique est la voie majoritaire du métabolisme de l'APP dans les conditions physiologiques. Elle débute par le clivage enzymatique de l'APP par une  $\alpha$ -sécrétase qui produit un fragment N-terminal extracellulaire soluble, sAPP $\alpha$ . La partie intracellulaire C-terminale subit ensuite un clivage enzymatique par une  $\gamma$ -sécrétase qui libère un fragment p3 et le domaine AICD (amyloid intracellular domain) (Plummer et al., 2016).

Le peptide A $\beta$  est quant à lui issu du clivage amyloïdogénique de l'APP. Cette voie est initiée par une  $\beta$ -sécrétase, la BACE1 (beta-site amyloid precursor protein cleaving-enzyme 1) qui libère un fragment N-terminal extracellulaire soluble, sAPP $\beta$  (Querfurth and LaFerla, 2010). La partie C-terminale intracellulaire est ensuite clivée par une  $\gamma$ -sécrétase, qui est un complexe protéique composé des présénilines 1 ou 2, PEN-2 (presenilin enhancer 2),

nicastatine et APH-1 (anterior pharynx-defective 1) (Selkoe and Wolfe, 2007). Ce clivage aboutit à la libération dans le cytosol du domaine AICD et à la libération extracellulaire du peptide A $\beta$  (Da Costa Dias et al., 2011; Savelieff et al., 2013). Le cholestérol se trouvant dans les membranes des cellules neuronales semble favoriser le clivage de l'APP par la voie amyloïdogénique et par conséquent la formation du peptide A $\beta$  (Runz et al., 2002). Les principaux isoformes du peptide A $\beta$  obtenus après le clivage protéolytique sont le peptide A $\beta$  40 (A $\beta$ <sub>1-40</sub>, composé de 40 acides aminés) et le peptide A $\beta$  42 (A $\beta$ <sub>1-42</sub>, composé de 42 acides aminés) (Gu and Guo, 2013).



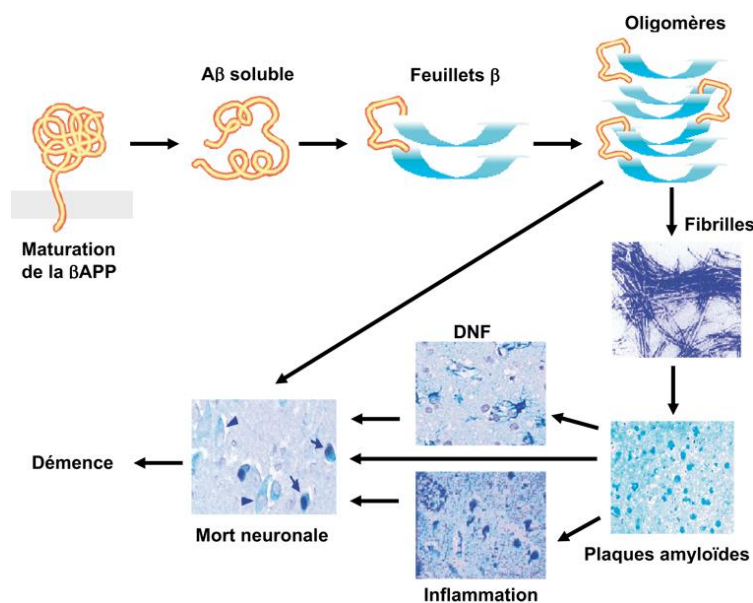
**Figure 14 : Les deux voies métaboliques de l'APP :** Dans la voie non-amyloïdogénique, l'APP subit deux clivages catalysés par une  $\alpha$ -secrétase et une  $\gamma$ -secrétase, qui aboutissent à la libération du fragment p3 et du domaine AICD (amyloid intracellular domain). Dans la voie amyloïdogénique, le peptide A $\beta$  et le domaine AICD sont libérés après clivages de l'APP par une  $\beta$ -secrétase et  $\gamma$ -secrétase. [D'après (Kuruva and Reddy, 2016)]

### 2.2.2. Le rôle physiopathologique du peptide $\beta$ -amyloïde

La concentration cérébrale du peptide A $\beta$  est très contrôlée et régulée par son niveau de production et par des mécanismes de dégradation enzymatique et de clairance, afin d'éviter une accumulation et une agrégation excessives qui pourraient avoir des conséquences pathologiques (Eisele, 2013). Une fois synthétisés, les peptides A $\beta$  ont la capacité de former des oligomères, qui dans des conditions physiologiques, sont rapidement dégradés par

différents mécanismes (Brouillette et al., 2012; Sagare et al., 2013; Savelieff et al., 2013). En effet, il semblerait que la présence d'oligomères de peptides A $\beta$  à des concentrations pathologiques pourrait avoir des effets cytotoxiques, notamment sur les mitochondries. Le peptide A $\beta$  serait responsable d'un dysfonctionnement de ces organites en agissant sur leur métabolisme énergétique, sur l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire ou encore en générant des espèces réactives de l'oxygène (Picone et al., 2014). Ces différents phénomènes pourraient à terme être la cause d'un dysfonctionnement synaptique et d'une perte neuronale (O'Brien and Wong, 2011; Tu et al., 2014).

L'une des hypothèses émise pour la formation des plaques amyloïdes et le développement de la MA est la cascade amyloïde, dans laquelle la cause de la MA serait une surproduction de peptides A $\beta$  qui serait l'initiatrice d'une cascade d'événements aboutissant au développement de la pathologie (Hardy and Higgins, 1992; Hardy and Selkoe, 2002) [Figure 15]. De ce fait, la pathologie amyloïde serait responsable de l'apparition de la pathologie tau, du dysfonctionnement synaptique, de la perte neuronale et à terme de la démence (De Strooper and Karran, 2016; Sala Frigerio and De Strooper, 2016).



**Figure 15 : L'hypothèse de la cascade amyloïde** : La formation des plaques amyloïdes semble être la conséquence d'une surproduction du peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ), qui entrainerait une séquence de phénomènes dont les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et aboutirait à la démence. [D'après ((Inserm), 2007)]



Cette hypothèse a été renforcée par l'identification de mutations génétiques des acteurs dans la voie de synthèse des peptides A $\beta$ , tels l'APP ou encore les présénilines (Selkoe and Wolfe, 2007; Potter et al., 2013; Sala Frigerio and De Strooper, 2016). Néanmoins, ces mutations sont retrouvées dans les formes familiales de la pathologie, qui ne représentent qu'environ 1% des cas. Ainsi, l'augmentation de la synthèse du peptide A $\beta$  ne semble pas expliquer à elle seule l'accumulation cérébrale de ce peptide. Des études ont montré que cette accumulation pathologique pouvait être en partie due à une perturbation de la clairance cérébrale. En effet, Mawuenyega et al. ont montré que dans des cerveaux de patients atteints de la MA, les concentrations augmentées de peptides A $\beta$  étaient liées à un défaut d'élimination cérébrale du peptide, tandis qu'aucune différence du niveau de synthèse des peptides A $\beta$  n'a été constatée entre les cerveaux de personnes saines et ceux de patients atteints de la MA (Mawuenyega et al., 2010).

Différentes études ont mis en évidence les limites de l'hypothèse de la cascade amyloïde (Benilova et al., 2012; Herrup, 2015). En effet, il a été montré qu'une faible corrélation existerait entre les dépôts de peptides A $\beta$  et les déficits cognitifs qui surviennent dans la MA (Villemagne et al., 2011; Barage and Sonawane, 2015). Par ailleurs, selon cette hypothèse, l'hyperphosphorylation de la protéine tau aboutissant à la formation des NFTs surviendrait à la suite de l'agrégation du peptide A $\beta$ . Cependant, une anomalie de la protéine tau a été observée dans des tauopathies ne présentant pas de plaques amyloïdes (Hutton et al., 1998; Reitz et al., 2011).

### ***2.2.3. Les différents mécanismes de clairance cérébrale du peptide A $\beta$***

Un dysfonctionnement des processus de clairance du peptide A $\beta$  à travers la BHE est l'un des mécanismes les plus probables responsables de l'accumulation pathologique du peptide A $\beta$  dans le cerveau (Mawuenyega et al., 2010; Gosselet et al., 2011). Ainsi, comprendre les différentes voies d'élimination cérébrale du peptide A $\beta$  est important. Il existe plusieurs mécanismes de clairance cérébrale des peptides A $\beta$  hors du cerveau, dont la dégradation enzymatique et l'efflux cérébral à travers la BHE.

### **2.2.3.1. La dégradation enzymatique**

Le peptide A $\beta$  peut être métabolisé par plusieurs protéases tels la néprilysine (NEP), l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE), l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE), l'enzyme de conversion de l'angiotensine, des métalloprotéinases matricielles (MMP), l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) ou encore la plasmine (Zlokovic, 2004; Yoon and Jo, 2012; Tarasoff-Conway et al., 2015).

#### **❖ *La néprilysine***

La néprilysine (NEP) est une protéine ubiquitaire qui appartient à la famille des métalloendopeptidases zinc-dépendantes. Dans le cerveau, cette protéase est surtout retrouvée dans les membranes des terminaisons axonales des neurones présynaptiques (Miners et al., 2008; Bayes-Genis et al., 2016). La NEP est la plus importante enzyme de dégradation du peptide A $\beta$ , elle peut métaboliser les monomères A $\beta$ <sub>1-40</sub> et A $\beta$ <sub>1-42</sub> et également les oligomères (Tarasoff-Conway et al., 2015). Dans la MA, l'expression et la fonctionnalité de la NEP sont diminuées dans le cerveau de personnes atteintes de cette pathologie (Akiyama et al., 2001; Wang et al., 2010). Il semble exister une corrélation entre le niveau d'expression de cette protéase et les taux cérébraux du peptide A $\beta$ . En effet, une augmentation de la concentration cérébrale et aussi plasmatique du peptide A $\beta$  a été observée chez des souris déficientes en NEP. Cette absence semblait être un facteur favorable à la formation des plaques amyloïdes et au développement de CAA (Farris et al., 2007). A l'inverse, dans un modèle murin de la MA, il a été montré qu'une surexpression de la NEP pouvait être liée à une diminution des taux cérébraux du peptide A $\beta$  et permettait de diminuer la formation des plaques amyloïdes (Leissring et al., 2003).

#### **❖ *L'enzyme de dégradation de l'insuline***

L'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE) est un membre de la famille des métalloendopeptidases zinc-dépendantes, principalement exprimée dans le cytosol (Miners et al., 2008; Wang et al., 2010). Dans le cerveau, l'IDE est localisée au niveau des neurones, des CECCs et aussi dans les plaques amyloïdes (Bernstein et al., 1999; Morelli et al., 2004).

Cette protéase participe à la dégradation du peptide A $\beta$  (Wang et al., 2010). Tout comme pour la NEP, l'expression d'IDE semble être corrélée aux concentrations du peptide A $\beta$ . En effet, Miller et al. ont montré que des souris déficientes en IDE présentaient des concentrations cérébrales augmentées du peptide A $\beta$  (Miller et al., 2003). En revanche, une diminution des plaques amyloïdes a été observée dans un modèle de souris MA surexprimant IDE (Leissring et al., 2003).

### **2.2.3.2. Le transport du peptide $\beta$ -amyloïde à travers la barrière hémato-encéphalique**

Le peptide A $\beta$  peut avoir une localisation cérébrale mais aussi périphérique. A la BHE, plusieurs récepteurs et transporteurs ont été identifiés comme participant aux échanges du peptide A $\beta$  entre le cerveau et le sang. Ainsi, le passage sang-cerveau du peptide A $\beta$  se fait à travers la BHE principalement par l'intermédiaire du récepteur RAGE (receptor for advanced glycation end products) (Zlokovic, 2011; Sagare et al., 2013). Le peptide A $\beta$  localisé dans le cerveau peut être éliminé du cerveau *via* la BHE par l'intermédiaire de transporteurs/récepteurs présents et fonctionnels à la surface des CECCs (Zlokovic, 2004). L'hypothèse actuelle repose sur une coopération entre le récepteur LRP1 (low-density lipoprotein receptor related protein 1) et des protéines ABC pour assurer l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  à travers la BHE (Zlokovic, 2004; Erickson et al., 2012).

#### **❖ Les acteurs de l'influx cérébral du peptide A $\beta$ à travers la barrière hémato-encéphalique**

##### **➤ RAGE**

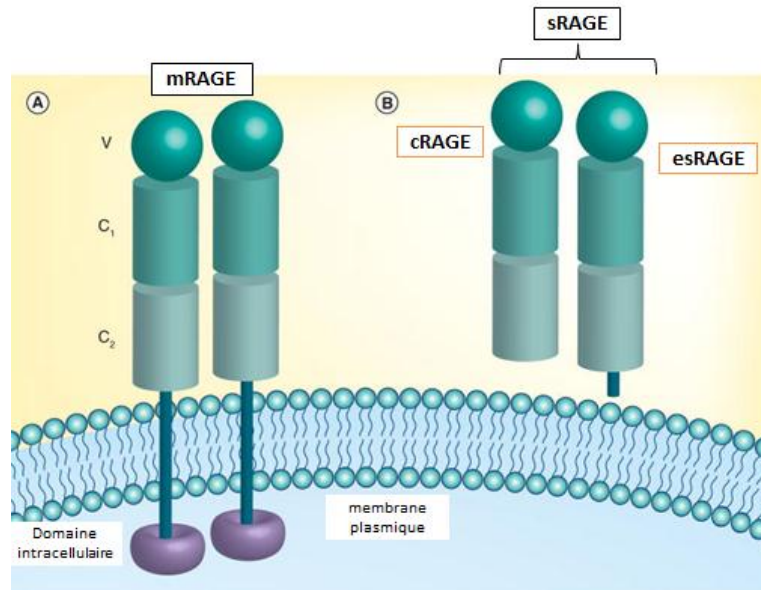
Le récepteur des produits avancés de glycation (RAGE, receptor for advanced glycation end products) est un récepteur transmembranaire d'environ 35-45 kDa. Il a été caractérisé pour la première fois en 1992 dans les poumons chez le bovin (Neeper et al., 1992). Son expression est ubiquitaire, il est retrouvé dans différents types cellulaires dont les astrocytes, les microglies et les cellules endothéliales (Deane, 2012). Dans des conditions physiologiques, RAGE est exprimé dans ces tissus à une faible concentration, toutefois la présence de son ligand entraîne une augmentation de l'expression de RAGE (Bierhaus and

Nawroth, 2009). Ce récepteur appartient à la superfamille des immunoglobulines et a la particularité d'être un récepteur multi-ligands. La liaison RAGE/ligand va activer différentes voies de signalisation tels le stress oxydant, la voie NF- $\kappa$ B ou encore une réponse pro-inflammatoire (Salahuddin et al., 2014; Cai et al., 2016b). D'un point de vue structural, RAGE est constitué d'une région extracellulaire divisée en trois domaines de type immunoglobuline (des domaines de type V et de type C1 et C2) où se trouve le site de liaison au ligand, d'une région transmembranaire et d'une région cytoplasmique courte qui est impliquée dans la signalisation cellulaire. Trois isoformes existent pour RAGE. La protéine complète, mRAGE (membrane RAGE), possédant les trois régions est localisée à la membrane plasmique des cellules. RAGE peut aussi être sous forme soluble (sRAGE) qui regroupe deux isoformes du récepteur dépourvus des domaines transmembranaires et cytosoliques : cRAGE (cleaved RAGE) obtenu par clivage protéolytique et esRAGE (endogenous secretory RAGE) obtenu par épissage alternatif (Deane, 2012; Farmer et al., 2014; Yu et al., 2015) [Figure 16]. Ces trois isoformes de RAGE partagent les mêmes ligands (Cai et al., 2016).

Les principaux ligands de RAGE sont les AGEs (advanced glycation end products) qui sont des protéines ou des lipides formés par glycosylation. L'origine des AGEs peut être endogène ou alimentaire (Perrone and Grant, 2015; Yu et al., 2015). Ce sont des glycotoxines associées à des pathologies telles l'athérosclérose ou des maladies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou la MA (Salahuddin et al., 2014; Kuhla et al., 2015; Perrone and Grant, 2015). Une expression plus importante des AGEs a été retrouvée dans des cerveaux de patients atteints de la MA (Takeuchi et al., 2007). Parmi les autres ligands de RAGE sont retrouvés des protéines de la famille S100/calgranuline, des phosphatidylsérines, la protéine HMGB1 (high-mobility group box 1 ou amphotérine) et le peptide A $\beta$  (Candela et al., 2010; Deane, 2012). La liaison entre RAGE et le peptide A $\beta$  a été caractérisée pour la première fois par l'équipe de Yan et al. (Yan et al., 1996). Cette interaction avec le peptide A $\beta$  confère à RAGE un rôle physiopathologique clé dans la MA. Une augmentation de RAGE a été observée *in vitro* dans des capillaires cérébraux murins, après incubation avec le peptide A $\beta$  (Wan et al., 2015). Des taux augmentés de RAGE ont également été observés dans le cerveau de patients atteints de la MA (Donahue et al., 2006; Jaynes and Provias, 2008). De plus, une étude réalisée sur des microvaisseaux cérébraux humains a mis en évidence le rôle de RAGE dans la transcytose du peptide A $\beta$  du pôle apical vers le pôle basolatéral des CECCs (Mackic

et al., 1998). *In vivo*, l'inhibition de l'activité de RAGE ou l'absence de son expression chez des souris entraîne l'absence de passage du peptide A $\beta$  circulant vers le cerveau, à travers la BHE, faisant de ce récepteur un acteur principal dans l'influx cérébral du peptide A $\beta$  (Deane et al., 2003; Zlokovic, 2011; Sagare et al., 2013). Par ailleurs, la liaison RAGE/peptide A $\beta$  semble être responsable de mécanismes cytotoxiques qui peuvent avoir des conséquences sur l'intégrité de la BHE, notamment en entraînant la diminution de l'expression des protéines constitutives des JS, plus particulièrement les ZO-1, les claudines 5 et les occludines (Wan et al., 2015).

Par ces différents mécanismes, RAGE semble être l'un des acteurs clés de l'accumulation cérébrale du peptide A $\beta$ , faisant de lui une cible thérapeutique contre la MA. Une étude *in vivo* a montré dans un modèle de souris développant la MA qui surexprime l'APP d'origine humaine (APP<sup>sw/0</sup>), qu'une inhibition du récepteur RAGE entraînait une diminution des taux cérébraux des peptides A $\beta_{1-40}$  et A $\beta_{1-42}$  et permettait de normaliser les performances cognitives (Deane et al., 2012). L'un des facteurs favorisant l'effet de RAGE dans la MA est la diminution des taux plasmatiques de l'isoforme sRAGE (Li et al., 2010). Une augmentation des concentrations plasmatiques de cette isoforme pourrait diminuer l'accumulation cérébrale du peptide A $\beta$  en empêchant l'interaction RAGE/A $\beta$ . En effet, Sugihara et al. ont démontré que chez des souris déficientes en RAGE ou surexprimant esRAGE humain, l'influx cérébral du peptide A $\beta$  était diminué (Sugihara et al., 2012).



**Figure 16 : Structure des différents isoformes de RAGE :** A] La structure complète du récepteur RAGE (mRAGE) est composée de trois régions. La région extracellulaire constitue le site de liaison au ligand. Elle possède trois domaines de type immunoglobuline (V, C1 et C2). La région extracellulaire est suivie d'un domaine transmembranaire puis d'un petit domaine intracellulaire impliqué dans la signalisation cellulaire. B] Il existe deux isoformes solubles (sRAGE) de RAGE : cRAGE obtenu par clivage protéolytique et esRAGE obtenu par épissage. Les sRAGE sont dépourvus de domaines transmembranaires et cytosoliques. [D'après (Deane, 2012)]

### ➤ *Oatp1a4*

RAGE pourrait ne pas être le seul acteur dans l'influx cérébral du peptide A $\beta$ . En effet, l'équipe de Jaeger a observé, chez la Souris, une augmentation de l'entrée cérébrale du peptide A $\beta$  dans des conditions d'inflammation alors qu'aucune modification de l'expression de RAGE n'était constatée (Jaeger et al., 2009). Par ailleurs, il a été montré que l'expression d'Oatp1a4 était augmentée sur des microvaisseaux cérébraux isolés de rats soumis à une inflammation (Ronaldson et al., 2011). Récemment, notre équipe a montré par co-immunoprécipitation une interaction entre le transporteur Oatp1a4 et le peptide A $\beta$  chez la Souris. De plus, l'influx cérébral du peptide A $\beta$  pouvait être inhibé à la BHE, chez la Souris par deux molécules : le taurocholate et la rosuvastatine, deux inhibiteurs potentiels d'Oatp1a4 (Do et al., 2013). Ces différents travaux suggèrent l'implication d'Oatp1a4 dans le transport à travers la BHE du peptide A $\beta$  du sang vers le cerveau.

## ❖ **Les acteurs de la clairance cérébrale du peptide A $\beta$ à travers la barrière hémato-encéphalique**

### ➤ **LRP1**

La protéine LRP1 (low-density lipoprotein receptor related protein 1) est un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs aux lipoprotéines de faible densité (LDL, low density lipoprotein). Cette protéine peut exister sous forme soluble ou ancrée dans la membrane plasmique. Sous forme soluble, LRP1 assure une fonction de transporteurs alors que sous forme transmembranaire, il va être impliqué dans le processus d'endocytose de ses ligands. Plus de quarante molécules ont été identifiées comme substrats de LRP1, parmi lesquelles se trouvent l'apolipoprotéine E, l'APP, tPA, l' $\alpha$ 2-macroglobuline et le peptide A $\beta$  (Zlokovic et al., 2010; Kanekiyo and Bu, 2014). LRP1 est principalement retrouvé dans le foie, les poumons et le cerveau. A la BHE, LRP1 est exprimé au niveau des CECCs chez l'Homme et les Rongeurs (Donahue et al., 2006; Ito et al., 2006). Récemment, cette localisation a été remise en question par une étude *in vitro* sur un modèle cellulaire de la BHE, montrant une localisation de LRP1 au niveau des péricytes (Candela et al., 2015).

Différentes études ont mis en évidence l'implication de LRP1 dans la clairance du peptide A $\beta$  (Zlokovic et al., 2010). Principalement exprimé sur la membrane apicale des CECCs, il semble initier l'efflux du peptide A $\beta$  à travers la BHE. Storck et al. ont récemment montré une diminution des concentrations plasmatiques et une augmentation des concentrations cérébrales du peptide A $\beta$  chez des souris n'exprimant plus LRP1 au niveau de leurs CECCs. Ces souris présentaient un défaut d'apprentissage et de mémoire (Storck et al., 2016). De plus, l'expression de LRP1 au niveau des CECCs est diminuée chez les personnes âgées, les patients atteints de la MA ou dans les modèles animaux de la MA (Ramanathan et al., 2015). Une fois dans le sang, le peptide A $\beta$  semble être pris en charge par la forme soluble de LRP1 qui l'acheminerait vers le foie et le rein pour y être dégradé (Sagare et al., 2007, 2013).

Néanmoins, il semblerait que LRP1 ne soit pas la seule protéine initiatrice du transport d'efflux du peptide A $\beta$ . En effet, Ito et al. ont montré chez la Souris, que l'administration d'un inhibiteur de LRP1, la RAP (receptor-associated protein), n'avait pas d'effet sur l'élimination du peptide A $\beta$  à travers la BHE (Ito et al., 2010) suggérant l'existence d'un mécanisme de transport du peptide A $\beta$  indépendant de LRP1.

## ➤ **ABCB1**

ABCB1 a été le premier transporteur ABC décrit comme pouvant effluer le peptide A $\beta$  de la cellule vers le milieu extracellulaire, grâce aux travaux réalisés par Lam et al. sur des vésicules membranaires enrichies en ABCB1 (Lam et al., 2001). Peu de temps après, Vogelgesang et al. ont montré par immunohistochimie sur des échantillons de tissus cérébraux humains, que les niveaux d'expression d'ABCB1 dans les vaisseaux cérébraux étaient inversement corrélés à l'accumulation du peptide A $\beta$  dans le cerveau, chez des personnes âgées non démentes (Vogelgesang et al., 2002).

L'implication d'ABCB1 dans le transport du peptide A $\beta$  a fait l'objet d'un grand nombre d'études (Abuznait and Kaddoumi, 2012; Pahnke et al., 2014). Une diminution de la clairance cérébrale du peptide A $\beta$  a notamment été observée chez des souris déficientes en ce transporteur ou en présence d'inhibiteur d'ABCB1 dans un modèle murin de la MA (APP<sup>sw+/-</sup>) (Cirrito et al., 2005). Une étude réalisée sur des tissus cérébraux extraits de patients âgés ou atteints de la MA, a mis en évidence une diminution de la protéine ABCB1 au niveau de la BHE, sans modification de l'expression des ARNm d'*ABCB1*. Cette diminution serait plutôt liée à des mécanismes post-traductionnels non encore identifiés (Chiu et al., 2015). Récemment, Hartz et al. ont montré que le peptide A $\beta$  induisait la dégradation du transporteur ABCB1 par le système ubiquitine-protéasome, ce qui aurait pour conséquence une diminution d'expression et de fonction d'ABCB1 (Hartz et al., 2016).

Néanmoins, le rôle d'ABCB1 dans la clairance du peptide A $\beta$  reste controversé. En effet, certaines études n'ont pas trouvé de lien entre ce transporteur et le peptide A $\beta$ . Ito et al. n'ont observé aucune modification de la clairance cérébrale du peptide A $\beta$ , après administration d'inhibiteurs d'ABCB1, la quinidine et le vérapamil, dans le cerveau de rats (Ito et al., 2006). De plus, il a été montré que la présence du peptide A $\beta$  n'entraînait aucune modification de l'activité ATPasique d'ABCB1 dans des cellules surexprimant ce transporteur et que ce dernier n'avait pas d'effet protecteur vis-à-vis de la cytotoxicité en raison de la présence du peptide A $\beta$  (Bello and Salerno, 2015). Par ailleurs, une augmentation tardive de l'expression d'*Abcb1* a été observée par notre équipe dans un modèle de souris MA (3xTg-AD) âgées de 18 mois (Do et al., 2015). Cependant, de récents travaux de Kannan et al. ont montré que, dans les capillaires cérébraux, les modifications de l'expression d'ABCB1 sont dépendantes de la région cérébrale et également de la proximité des dépôts du peptide A $\beta$



(Kannan et al., 2016). Ainsi, les disparités de résultats pourraient être expliquées par le fait que les différents paramètres utilisés (régions cérébrales, âge, ...) n'étaient pas les mêmes pour toutes les études.

### ➤ **ABCG2**

Le rôle d'ABCG2 dans l'efflux du peptide A $\beta$  a d'abord été démontré *in vitro*, dans des modèles cellulaires de BHE. Une augmentation du passage du peptide A $\beta$  du pôle apical vers le pôle basolatéral des cellules a été observée en présence d'inhibiteurs d'ABCG2, dont la fumitrimorgine C et le GF120918 (Tai et al., 2009; Candela et al., 2010). Xiong et al. ont montré que la présence du peptide A $\beta$  entraînait une diminution de l'efflux cellulaire d'un substrat connu d'ABCG2, Hoechst 33342, dans des cellules surexprimant le gène humain *ABCG2* (Xiong et al., 2009). Dans cette même étude, une augmentation de l'accumulation du peptide A $\beta$  a été mise en évidence dans le cerveau de souris déficientes en *Abcg2* par rapport aux souris sauvages. De plus, une surexpression du transporteur a été observée dans le cerveau de patients atteints de la MA présentant une CAA, ainsi que dans des modèles de souris MA (3xTg-AD et TgSwDI) (Xiong et al., 2009). Des travaux de notre groupe ont confirmé l'implication d'ABCG2 dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  : *in vitro*, en montrant que l'efflux cellulaire du peptide A $\beta$  était augmenté dans des cellules surexprimant *Abcg2*, en comparaison à des cellules contrôles et *in vivo*, en montrant qu'en présence de GF120918, un inhibiteur commun d'ABCB1 et ABCG2, l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  était inhibé chez des souris déficientes en *Abcb1* alors qu'aucun effet n'était observé chez des souris déficientes en *Abcb1* et *Abcg2* (Do et al., 2012). Zhang et al. ont également observé qu'après injection par voie intraveineuse de peptides A $\beta$  d'origine humaine, l'accumulation du peptide A $\beta$  était augmentée dans le cerveau de souris déficientes en ABCB1 ou en ABCG2 (Zhang et al., 2013). Récemment, notre équipe a mis en évidence une augmentation de l'expression de ce transporteur au niveau de la BHE dans un modèle de souris MA (3xTg-AD) âgées de 18 mois (Do et al., 2015)

### ➤ **Autres transporteurs ABC : ABCA1, ABCG4 et ABCA2**

A ce jour, ABCB1 et ABCG2 sont les deux transporteurs ABC identifiés comme étant impliqués dans le transport du peptide A $\beta$  à travers la BHE. Néanmoins, d'autres transporteurs ABC pourraient participer à cet efflux. L'implication d'ABCA1 dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  a été suggérée par des études montrant une corrélation entre les concentrations d'ABCA1 et l'accumulation cérébrale de ce peptide (Fukumoto et al., 2002; Kim et al., 2010b; Koldamova et al., 2010). Cependant, différents travaux ont montré que ce transporteur ne participerait pas directement à l'efflux du peptide A $\beta$ . En effet, aucune différence entre des souris déficientes en *Abca1* et des souris contrôles n'avait été observée dans l'efflux du peptide A $\beta$  à travers la BHE, une heure après l'administration de peptides A $\beta$  humains directement dans le cerveau des souris (Akanuma et al., 2008). *In vitro*, aucune modification de l'accumulation du peptide A $\beta$  dans des péricytes surexprimant ABCA1 n'a été constatée (Saint-Pol et al., 2012). Des études réalisées par notre équipe ont montré, chez la Souris, que l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  était inhibé par le probucol et que cette interaction était indépendante d'*Abca1* (Do et al., 2012). De plus, dans cette même étude il a été montré qu'*Abcg4* assurait l'efflux cellulaire du peptide A $\beta$  et que le probucol inhibait ce transport. Par ailleurs, une surexpression d'*Abcg4* a été observée à la BHE dans un modèle de souris MA (3xTg-AD) âgées de trois mois, qui pourrait correspondre à la mise en place d'un mécanisme compensatoire suite à l'augmentation de RAGE (Do et al., 2015). Ainsi, le rôle potentiel de ce transporteur a été proposé par notre équipe. Par ailleurs, un lien entre ABCA2 et la MA a été décrit, mais les mécanismes ne sont pas élucidés.

### **2.3. Lien entre le cholestérol et la MA**

Le cerveau est l'un des organes les plus riches en cholestérol, dont la quantité cérébrale représente 20 à 30 % du cholestérol total dans le corps. Il est majoritairement retrouvé dans la gaine de myéline, mais aussi dans la membrane plasmique des neurones et des cellules gliales dont les astrocytes (Arbor et al., 2016). Dans le cerveau, le cholestérol participe à différents processus physiologiques tels la plasticité synaptique, le développement et le maintien de la fonction des neurones (Xue-shan et al., 2016). Du fait de la présence de la BHE qui limite les échanges sang-cerveau de lipides, la synthèse du cholestérol dans le

cerveau se fait *de novo*. La concentration cérébrale du cholestérol est très contrôlée car un déséquilibre peut représenter un facteur de risque dans la physiopathologie de maladies neurodégénératives telles la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington ou la MA (Di Paolo and Kim, 2011; Martín et al., 2014; Doria et al., 2016). L'une des premières études mettant en évidence un lien entre le cholestérol et la MA a été réalisée chez des lapins recevant une alimentation enrichie en cholestérol. Ces animaux présentaient une accumulation intracellulaire importante de peptide A $\beta$ , qui n'était pas retrouvée chez les animaux contrôles (Sparks et al., 1994). *In vitro*, il a été montré que la formation de fibrilles de peptide A $\beta$  était dépendante du cholestérol dans les cellules (Mizuno et al., 1999). Cependant, les mécanismes reliant le cholestérol et la MA ne sont pas encore bien compris. Il semblerait que des variations des quantités cérébrales du cholestérol, entraînant notamment des modifications de la structure membranaire des cellules, pourraient correspondre à l'un des mécanismes de cette interaction. En effet, une augmentation de la concentration intracellulaire du cholestérol favoriserait l'activité de BACE1 et de ce fait la génération de peptides A $\beta$ . A l'inverse, une diminution des quantités de cholestérol favoriserait l'activité de l' $\alpha$ -sécrétase et ainsi privilégierait le métabolisme de l'APP par la voie non-amyloïdogénique (Xue-shan et al., 2016).

L'hypercholestérolémie représente ainsi un facteur de risque dans le développement de la MA. De nombreuses études réalisées chez différentes espèces animales (lapins, rats, modèles murins de la MA) ont montré qu'un régime alimentaire riche en cholestérol pourrait être associé à l'accumulation cérébrale du peptide A $\beta$ , à une phosphorylation anormale de la protéine tau et à des pertes synaptiques entraînant des déficits cognitifs touchant par exemple la mémoire ou l'apprentissage (Ghribi et al., 2006; Lemieux et al., 2010; de Oliveira et al., 2011; Umeda et al., 2012; Zhang et al., 2015). A l'inverse, il a été montré que des composés hypolipémiants comme les statines pourraient réduire les risques de développer la MA, néanmoins certaines études n'ont montré aucun effet de ces molécules dans la MA (Wolozin et al., 2000; Daneschvar et al., 2015). Bien que les modifications des quantités plasmatiques du cholestérol participent au développement des lésions cérébrales associées à la MA, ces modifications n'ont pas d'incidence sur le cholestérol cérébral. Cette absence d'effet est en partie due à la présence de la BHE qui limite les échanges du cholestérol entre le sang et le cerveau. Il a été proposé que les effets de l'hypercholestérolémie sur le cerveau pourraient en partie être expliqués par un

mécanisme indirect qui mettrait en jeu le 27-hydroxycholestérol (27-OHC), un métabolite du cholestérol principalement localisé en périphérie et qui peut traverser la BHE (Marwarha and Ghribi, 2015). Des études ont mis en évidence que le 27-OHC pouvait notamment augmenter l'expression de BACE1, la synthèse de peptides A $\beta$  et la phosphorylation de la protéine tau (Prasanthi et al., 2009, 2011; Marwarha and Ghribi, 2015). Récemment, il a été montré qu'un régime riche en cholestérol était associé à un défaut de mémoire chez des souris sauvages, mais que cet effet n'était pas retrouvé chez des souris *Cyp27<sup>-/-</sup>* qui n'exprimaient pas le 27-OHC (Heverin et al., 2015). Cependant, les mécanismes expliquant le lien entre le 27-OHC et la MA ne sont pas encore élucidés.

Le desmostérol est un stérol, pouvant avoir une origine périphérique ou cérébrale. C'est le dernier précurseur dans la synthèse du cholestérol par la voie Bloch (Zerenturk et al., 2013). La conversion de ce lipide en cholestérol est catalysée par la 24-déhydrocholestérol réductase (DHCR24). Comme le cholestérol, le desmostérol semble également être lié à la MA. Il a notamment été montré que les quantités de desmostérol étaient augmentées au début de la MA dans un modèle de souris développant la MA (APPSLxPS1) (Vanmierlo et al., 2010). A l'inverse, une autre étude a montré une diminution de la quantité de desmostérol dans des tissus cérébraux humains de patients atteints de la MA, par rapport aux tissus cérébraux de personnes saines (Wisniewski et al., 2013). L'expression de DHCR24 dans le cerveau n'est pas différente entre les personnes souffrants de la MA et les personnes saines, suggérant que cette diminution est indépendante du taux de conversion du desmostérol en cholestérol (Sharpe et al., 2012). Toutefois, son implication dans la physiopathologie de la MA reste à ce jour encore peu étudiée. Notre travail de doctorat a porté sur l'étude des transporteurs ABC impliqués dans le transport de ces lipides à la BHE.

---

# MATERIEL ET METHODES

---

Dans cette partie, seront décrites les différentes lignées de souris utilisées pour les travaux de la thèse, ainsi que la technique de perfusion cérébrale *in situ* utilisée pour étudier la fonctionnalité des différents transporteurs à la BHE des souris. Les autres méthodes d'étude que j'ai utilisées au laboratoire (extraction des microvaisseaux cérébraux, RT-qPCR) ou en collaboration (imagerie confocale, LC-MS/MS, modélisation moléculaire) seront décrites dans les différents articles de la partie TRAVAUX PERSONNELS.

## I. Matériel

### **1. Animaux**

Les études *in vivo* ont été réalisées sur des souris mâles ou femelles âgées de 8 à 12 semaines. Toutes les souris ont été hébergées au sein de l'animalerie centrale de la Faculté de Pharmacie de Paris. Elles ont été soumises à un cycle jour-nuit 12h/12h et ont eu un accès libre à l'eau et à la nourriture. L'hébergement et toutes les expériences animales ont été réalisés dans le respect des règles d'éthique des directives européennes (210/63/EU). Le protocole a été soumis et accepté par le Comité d'Ethique de l'Université Paris-Descartes (numéro de saisine : 12-181. CEEA34.FB.151.12).

#### **1.1 Souris sauvages**

Les souris sauvages (wild-type, WT) avec un fond génétique C57BL/6 ou FVB/N ont été commandées chez Janvier (Route des Chênes secs, Le Genest Saint Isle). Les deux lignées sont élevées au sein de l'animalerie centrale de la Faculté de Pharmacie de Paris. Les souris sauvages avec un fond génétique CF-1 ont été achetées chez Charles River (Saint-Germain-L'Abresle, France). Ces souris ont été élevées au sein de l'animalerie centrale de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry.

## **1.2. Souris déficientes en *Abcg4***

Les souris déficientes en *Abcg4* ont un fond génétique C57BL/6 et ont été créées par l'équipe du Dr Shailendra B. Patel (Medical college of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA) au sein de la Medical University of South Carolina. La génération de cette lignée est décrite dans l'article 1, intitulé « *Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: role in Alzheimer's disease* ». Ces souris sont élevées au sein de l'animalerie centrale de la Faculté de Pharmacie de Paris.

## **1.3. Souris déficientes en *Abcb1a***

Les souris déficientes *Abcb1a* (*Mdr1a*<sup>-/-</sup>) ont un fond génétique CF-1 et ne présentent pas le gène *Abcb1a* au niveau de leur BHE (Schinkel et al., 1994). Les couples parentaux homozygotes proviennent de chez Charles River (Saint-Germain-l'Abresle, France) et leur descendance a été élevée au sein de l'animalerie centrale de la Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry.

## **1.4. Souris déficientes en *Abcb1* et *Abcg2***

Les souris triples transgéniques *Mdr1a/b/Bcrp*<sup>-/-</sup> ont été obtenues dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Alfred Schinkel (Amsterdam, Pays-Bas). Ces souris ont un fond génétique FVB/N. Elles sont élevées au sein de l'animalerie centrale de la Faculté de Pharmacie de Paris.

## **1.4. Souris déficientes en *Abca2***

Les souris déficientes *Abca2* ont un fond génétique C57BL/6. Les couples parentaux homozygotes proviennent de chez Jackson Laboratory et leur descendance a été élevée au sein de l'animalerie centrale de la Faculté de Pharmacie de Paris.

## II. Méthodes d'étude *in vivo* du transport à la barrière hémato-encéphalique

### 1. La technique de perfusion cérébrale *in situ*

#### 1.1. Description

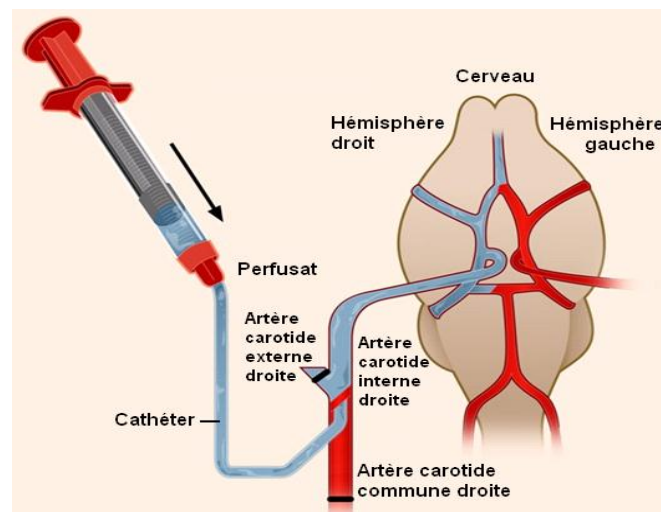
La perfusion cérébrale *in situ* permet l'étude *in vivo* des mécanismes de transport des molécules à travers la BHE, et plus précisément du côté luminal des CECCs. Elle a d'abord été développée chez le Rat par Takasato (Takasato et al., 1984) puis adaptée chez la Souris (Dagenais et al., 2000). Cette technique peut être utilisée pour mesurer les paramètres de transport tels que le volume vasculaire cérébral et la clairance d'entrée cérébrale ( $Cl_{up}$ ) d'une molécule d'intérêt.

Cette technique consiste en l'administration sur un temps très court (30s-120s) d'un perfusé contenant deux molécules radiomarquées : la molécule dont le transport à travers la BHE doit être étudié et une molécule servant de marqueur de l'espace vasculaire (par exemple le saccharose). L'un des avantages de cette technique est qu'elle permet l'administration d'inhibiteurs d'un transporteur ou l'utilisation de souris déficientes en ce transporteur afin d'étudier le rôle de ce dernier au niveau de la BHE. Si la  $Cl_{up}$  est augmentée en présence d'un inhibiteur ou lorsque le transporteur testé n'est pas exprimé, cela signifie que le transporteur joue un rôle dans l'efflux de la molécule d'intérêt au niveau de la BHE. A l'inverse, si la  $Cl_{up}$  est diminuée, le transporteur participe alors à l'influx de la molécule d'intérêt.

#### 1.2. Réalisation de la chirurgie et de la perfusion chez la Souris

Avant la perfusion, les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale d'un mélange de kétamine et de xylazine (140/8 mg/kg). Leur artère carotide commune droite est ligaturée du côté du cœur et leur artère carotide externe droite est ligaturée au niveau de la bifurcation de l'artère carotide commune droite. Cette étape va permettre d'assurer un acheminement du perfusé vers le cerveau. Un cathéter est installé dans l'artère carotide commune droite et est relié à une seringue contenant le perfusé qui est placée sur une

pousse-seringue automatique [Figure 17]. Le cœur de l'animal est coupé juste avant l'administration du perfusat, qui est composé d'un tampon Krebs (128 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4,2 mM KCl, 2,4mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,9 mM MgCl<sub>2</sub> et 9mM D-Glucose) oxygéné par un mélange gazeux O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> afin de normaliser le pH 7,4 et maintenu au bain-marie à 37°C. Des volumes prédéfinis de la molécule d'intérêt et du marqueur de l'espace vasculaire, qui, dans notre étude, sont respectivement le peptide [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> ou le [<sup>3</sup>H]desmostérol (0,2 μCi/mL) et le [<sup>14</sup>C]saccharose (0,1 μCi/mL), sont également ajoutés au perfusat. D'autres composés non radioactifs, comme le 17-β-estradiol (100 μM), l'estramustine (100 μM), le GF120918 (10 μM), la L-thyroxine (10 μM) ou le probucol (10 μM) sont dissous dans leurs véhicules respectifs (DMSO/éthanol, eau, DMSO, eau/NaOH) et ajoutés au perfusat. Après une minute de perfusion à la vitesse de 2,5 mL/min, l'animal est décapité et l'hémisphère droit ainsi que des échantillons du perfusat sont récupérés. L'hémisphère droit est dissous dans du Solvable à 50°C puis mélangé à 9 mL de cocktail à scintillation (Ultima Gold). La radioactivité de chaque échantillon est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation (Tricarb, Perkin Elmer, France). Les résultats du comptage vont permettre de calculer les paramètres du transport.



**Figure 17 : Schéma de la perfusion cérébrale *in situ* adaptée chez la Souris (Dagenais et al., 2000).** Après avoir ligaturé l'artère carotide commune droite et l'artère externe droite chez la Souris anesthésiée, un perfusat composé d'un tampon Krebs, auquel ont été ajoutées deux molécules radiomarquées (la molécule d'intérêt et une molécule servant de marqueur de l'espace vasculaire) est injecté *via* un cathéter installé au niveau de l'artère carotide interne droite. Après la perfusion, l'hémisphère droit est récupéré ainsi que des aliquots du perfusat.



### 1.3. Calcul des paramètres de transport

Le volume de l'espace vasculaire cérébral ( $V_{\text{vasc}}$ ,  $\mu\text{L/g}$ ) est estimé à partir de la distribution tissulaire du marqueur de l'espace vasculaire cérébral qui diffuse très peu à travers la BHE. Dans cette étude, le marqueur de l'espace vasculaire cérébral est le [ $^{14}\text{C}$ ]saccharose. Le  $V_{\text{vasc}}$  permet de vérifier l'intégrité de la BHE (le  $V_{\text{vasc}}$  doit être inférieur à  $20 \mu\text{L/g}$ ) et de corriger la quantité cérébrale totale de la molécule étudiée par la quantité présente dans l'espace vasculaire. Il est calculé en divisant la quantité de [ $^{14}\text{C}$ ]saccharose ( $X^*$ ,  $\text{dpm/g}$ ) contenue dans l'hémisphère droit par la concentration en [ $^{14}\text{C}$ ]saccharose ( $C^*$ ,  $\text{dpm}/\mu\text{L}$ ) dans le perfusat.

$$V_{\text{vasc}} = \frac{X^*}{C^*}$$

Le volume apparent de distribution cérébrale de la molécule étudiée radiomarquée ( $Vd_{\text{cerveau}}$ ,  $\mu\text{L/g}$ ) est calculé à partir de la quantité de radioactivité contenue dans l'hémisphère droit et celle de départ dans le perfusat, selon l'équation :

$$Vd_{\text{cerveau}} = \frac{X_{\text{cerveau}}}{C_{\text{perf}}}$$

où  $X_{\text{cerveau}}$  ( $\text{dpm/g}$ ) correspond à la quantité calculée de la molécule étudiée dans l'hémisphère droit et  $C_{\text{perf}}$  ( $\text{dpm}/\mu\text{L}$ ) correspond à la concentration de la molécule étudiée dans le perfusat. La  $X_{\text{cerveau}}$  ( $\text{dpm/g}$ ) est obtenue par l'équation suivante :

$$X_{\text{cerveau}} = X_{\text{totale}} - (V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}})$$

où  $X_{\text{totale}}$  ( $\text{dpm/g}$ ) est la quantité cérébrale totale de la molécule étudiée (dans l'espace vasculaire et extravasculaire), à laquelle a été soustraite la quantité de la molécule étudiée présente dans l'espace vasculaire ( $V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}}$ ). Le coefficient de transport  $K_{\text{in}}$  ( $\mu\text{L/g/s}$ ), correspondant à la clairance d'entrée cérébrale ( $Cl_{\text{up}}$ ,  $\mu\text{L/g/s}$ ), est défini comme le rapport entre le volume de distribution cérébrale de la molécule étudiée ( $Vd_{\text{cerveau}}$ ,  $\mu\text{L/g}$ ) et le temps de perfusion ( $T$ , s).

$$K_{\text{in}} = \frac{Vd_{\text{cerveau}}}{T}$$

## ***2. Analyse des résultats***

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  SD de n expériences avec n correspondants au nombre de souris ou au nombre de puits cellulaires utilisés.

L'analyse statistique est réalisée en utilisant le test de Student pour les comparaisons de deux groupes (le groupe contrôle et le groupe traité). Les différences sont considérées significatives lorsque p est inférieur à 0,05.

---

# TRAVAUX PERSONNELS

---

Notre **premier objectif** a été, tout d’abord, d’étudier l’expression des transporteurs Abcg4 et Abca2 à la BHE chez la Souris, et de déterminer si ces transporteurs fonctionnent bien comme des transporteurs d’efflux au niveau de la BHE. Pour cela il était nécessaire d’identifier des substrats et inhibiteurs de ces deux transporteurs. Les résultats de cette étude ont fait l’objet de deux articles. L’un est soumis pour une publication dans le journal « Nature Communications ». Le second est actuellement en préparation.

➤ **Article 1 :**

**“Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: role in Alzheimer’s disease”.**

Agnès Dodacki, Matthew Wortman, Bruno Saubaméa, Stéphanie Chasseigneaux, Sophie Nolic, Nathalie Prince, Murielle Lochus, Xavier Declèves, Jean-Michel Scherrmann, Shailendra B. Patel and Fanchon Bourasset [en soumission]

➤ **Article 2 :**

**“Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: involvement in the efflux of amyloid- $\beta$  peptide”.**

Agnès Dodacki, Lucien Tchara, Sophie Nolic, Murielle Locchus, Marie-Claude Menet, Jean-Michel Scherrmann and Fanchon Bourasset [en préparation]

Notre **second objectif** a été d’évaluer l’importance relative de leurs fonctions d’efflux pour le peptide A $\beta$  par rapport à celles d’Abcb1 et Abcg2. Les résultats de ce travail sont présentés dans l’article 3, qui est en préparation.

➤ **Article 3 :**

**“Cooperation between Abcb1, Abcg2, Abcg4 and Abca2 in the blood-brain barrier efflux of amyloid- $\beta$  peptide”.**

Agnès Dodacki, Tuan-Minh Do, Shailendra B. Patel, Sophie Nicolic, Murielle Locchus, Robert Farinotti, Jean-Michel Scherrmann et Fanchon Bourasset [en préparation]

Durant mon doctorat, j’ai également pu participer aux travaux de deux articles (en 2<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> auteure), qui sont présentés dans la partie « *ANNEXE* » du manuscrit.

# 1<sup>er</sup> objectif: Caractérisation d'Abcg4 et d'Abca2 à la barrière hémato-encéphalique

## **Article 1**

### **“Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: role in Alzheimer’s disease”**

Agnès Dodacki, Matthew Wortman, Bruno Saubaméa, Stéphanie Chasseigneaux, Sophie Nolic, Nathalie Prince, Murielle Lochus, Xavier Declèves, Jean-Michel Scherrmann, Shailendra B. Patel et Fanchon Bourasset

#### **❖ Introduction**

Les transporteurs d'efflux majoritairement représentés par la superfamille des protéines ABC (ATP-binding cassette) font partie des acteurs majeurs de la barrière hémato-encéphalique (BHE). ABCB1 (P-glycoprotéine, P-gp) et ABCG2 (breast cancer resistance protein, BCRP) sont les principaux transporteurs exprimés et étudiés à la BHE. ABCG4 est principalement impliqué dans le transport de stérols. Son expression au niveau de la BHE a été démontrée, mais sa localisation cellulaire ainsi que sa fonction à la BHE n'étaient pas encore connues. Il a été montré, sur des cellules HEK transfectées avec le gène *Abcg4*, que le peptide  $\beta$ -amyloïde ( $A\beta$ ) était substrat d'*Abcg4* et que le probucol était un inhibiteur potentiel d'*Abcg4*. Chez la Souris, le probucol inhibe, indépendamment d'*Abca1*, l'efflux du peptide  $A\beta$  à la BHE, suggérant l'implication d'*Abcg4* dans cet efflux.

#### **❖ Objectif**

Ainsi notre objectif était de caractériser l'expression et la fonctionnalité du transporteur *Abcg4* à la BHE chez la Souris.

## ❖ **Méthodes**

Pour ce faire, nous avons utilisé un nouveau modèle de souris développé par l'équipe du Dr Shailendra B. Patel, qui sont déficientes en *Abcg4* (*Abcg4*<sup>-/-</sup>) en comparaison avec des souris sauvages (*Abcg4*<sup>+/+</sup>). L'expression d'*Abcg4* au niveau des capillaires cérébraux a été étudiée par imagerie confocale et RT-qPCR. La fonctionnalité d'*Abcg4* à la BHE a été étudiée en mesurant les clairances d'entrée cérébrale ( $Cl_{up}$ ,  $\mu\text{L/g/s}$ ) du peptide [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$  et du [<sup>3</sup>H]desmostérol (un substrat connu d'ABCG4) par la technique de perfusion cérébrale *in situ* (PCIS), en présence ou en absence de deux inhibiteurs potentiels d'ABCG4 (le probucol et la L-thyroxine (T<sub>4</sub>)). Des modélisations de structure de dimères d'*Abcg4* et d'interactions (docking) ont été réalisées pour étudier les interactions possibles entre *Abcg4* et ses substrats potentiels.

## ❖ **Résultats**

Nous avons démontré qu'*Abcg4* était exprimé au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. En utilisant la technique de PCIS, nous avons mis en évidence qu'en présence du probucol les  $Cl_{up}$  du peptide [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$  et du [<sup>3</sup>H]desmostérol étaient augmentées respectivement d'un facteur 2,1 et 1,8 chez les souris sauvages, mais pas chez les souris *Abcg4*<sup>-/-</sup>. Une interaction directe de type ligand-ligand a été détectée entre le peptide A $\beta$  et le desmostérol par docking. Nous avons également montré que la T<sub>4</sub> augmente significativement les  $Cl_{up}$  du peptide [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$  et du [<sup>3</sup>H]desmostérol d'un facteur 2 et 1,6 chez les souris sauvages, mais pas chez les souris *Abcg4*<sup>-/-</sup>. De plus, la modélisation a permis de montrer une liaison du desmostérol avec *Abcg4* dans le site de liaison au ligand, avec une affinité meilleure que celle du cholestérol.

## ❖ **Conclusion**

Ces résultats ont permis de mettre en évidence, pour la première fois, qu'*Abcg4* est exprimé et fonctionnel à la BHE de la souris. Nous avons identifié pour ce transporteur deux substrats (le peptide A $\beta$  et le desmostérol) et deux inhibiteurs (le probucol et la T<sub>4</sub>). Ces résultats identifient un nouveau transporteur ABC exprimé à la BHE qui semble étroitement lié à la

MA, chez la Souris, car il a pour substrat deux acteurs impliqués dans la physiopathologie de la maladie, et chez l'Homme chez qui une surexpression d'ABCG4 cérébral chez des patients atteints de MA a été mise en évidence (Uehara et al., 2008). Ce nouveau transporteur ABC présent au niveau de la BHE pourrait ainsi constituer une nouvelle cible thérapeutique de la MA.

# Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: role in Alzheimer's disease

Agnès Dodacki<sup>1,2,3</sup>, Matthew Wortman<sup>4</sup>, Bruno Saubaméa<sup>1,2,3</sup>, Stéphanie Chasseigneaux<sup>1,2,3</sup>, Sophie Nicolic<sup>1,2,3</sup>, Nathalie Prince<sup>1,2,3</sup>, Murielle Lochus<sup>1,2,3</sup>, Anne-Laure Raveu<sup>1,2,3</sup>, Xavier Declèves<sup>1,2,3</sup>, Jean-Michel Scherrmann<sup>1,2,3</sup>, Shailendra B. Patel<sup>4,\*</sup> and Fanchon Bourasset<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Variabilité de Réponse aux Psychotropes, INSERM, U1144, Paris, France

<sup>2</sup> Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, UMR-S 1144, Paris, France

<sup>3</sup> Université Paris Diderot, UMR-S 1144, Paris, France

<sup>4</sup> Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, University of Cincinnati, Cincinnati, OH, USA

## Corresponding authors:

\* To whom correspondence should be addressed :

Fanchon Bourasset, PharmD, PhD., Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

Tel: +33 1 53 73 98 59

E-mail: fanchon.bourasset@parisdescartes.fr

or,

Shailendra Patel, MD, PhD. Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, 231 Albert Sabin Way, Cincinnati, OH 45219-0547, USA

Tel : +1 513 558 4444

E-mail : sbpatel@ucmail.uc.edu

**ABBREVIATIONS:** A $\beta$ : amyloid- $\beta$  peptide, ABC: ATP-binding cassette, AD: Alzheimer's disease, BAC: bacterial artificial chromosome, BBB: blood-brain barrier, BCEC: brain capillary endothelial cell, BCRP: breast cancer resistance protein, BSA: bovine serum albumin, Cl<sub>up</sub>: brain uptake clearance, Ct: cycle threshold, DHCR24: 24-dehydrocholesterol reductase, eGFP: enhanced green fluorescent protein, HDL: high-density lipoprotein, ISBP: *in situ* brain perfusion technique, KO: knockout, P-gp: P-glycoprotein, qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction, RAGE: receptor for advanced glycation end product, SLC: solute carrier, T<sub>4</sub>: L-thyroxine, WT: wild-type



## **ABSTRACT**

ABCG4 is an ATP-binding cassette transmembrane protein which has been shown, *in vitro*, to participate in the cellular efflux of desmosterol and amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ). ABCG4 is highly expressed in the brain but its localization and function at the blood-brain barrier (BBB) level remain unknown. We demonstrate by qRT-PCR and confocal imaging that mouse *Abcg4* is expressed in the brain capillary endothelial cells. Modelling studies of the *Abcg4* dimer show that desmosterol and A $\beta$  can bind and interact together in the ligand-binding site. Using a novel *Abcg4*-deficient mice model, we show that *Abcg4* transports A $\beta$  and desmosterol from brain to blood at the BBB level and that *Abcg4* can be inhibited by probucol and L-thyroxine. A direct A $\beta$ /desmosterol interaction was also detected in the mouse BBB. Our data evidence, for the first time, that *Abcg4* is an efficient efflux pump at the mouse BBB level and reveal ABCG4 as a potential new pharmacological BBB target in Alzheimer's disease.

**KEYWORDS:** ABCG4, Amyloid- $\beta$  peptide, blood-brain barrier, desmosterol, structural model

## INTRODUCTION

The brain capillary endothelial cells (BCECs), associated with the basement membrane, pericytes and astrocyte end-feet, constitute the blood–brain barrier (BBB), which represents the main interface separating the blood from the brain (1,2). The permeability restriction of the BBB is mainly due to the presence of tight junctions (TJ) connecting the BCECs to each other (3,4). Several influx and efflux transporters, such as solute carriers (SLC) and ATP-binding cassette (ABC) proteins, are expressed in these BCECs (1). ABC transporters belong to a superfamily of transmembrane proteins, divided into 7 sub-families (A to G) according to their structural homology (5–7). The most studied ABC transporters at the BBB are ABCB1 (P-glycoprotein, P-gp) and ABCG2 (breast cancer resistant protein, BCRP), which carry their substrates, mainly exogenous compounds, out of the brain into the bloodstream (1,2,8). Besides ABCB1 and ABCG2, other ABC transporters belonging to ABCA and ABCG subfamilies are likely to be expressed and functional at the BBB. Since ABCA and ABCG transporters are highly involved in the transport of endogenous compounds such as lipids, their potential expression and efflux function at the BBB level would give to the BBB a role in maintaining the brain lipid homeostasis. However, little is known about their exact localization and role in the BBB. The *ABCA1* mRNA and ABCA1 protein have been localized in cultured human and rat BCECs as well as in isolated mouse microvessels (9,10). We evidenced that *Abca1* acts as an efflux transporter at the BBB level and that probucol, a known inhibitor of ABCA1 (11), inhibits the *Abca1*-mediated cholesterol efflux at the luminal side of the mouse BCECs (10). ABCG proteins are half-transporters that dimerize with another half-protein to become functional (12–14). Hence, ABCG2 forms homodimers whereas ABCG4 can form homo- or hetero-dimers with ABCG1 but not with ABCG2 (12,15,16). Whether ABCG4 exists as a homodimer or as heterodimers *in vivo* has not been established. ABCG proteins are involved in sterol transport, except for ABCG2 which is mostly implicated in drug cell efflux. ABCG4 and ABCG1 are highly expressed in the brain, in particular in neurons and astrocytes (17). We have shown that *Abcg4* protein was also expressed in microvessels isolated from mouse brains (18), but its exact cellular localization as well as its role in the BBB remains unknown. ABCG4 is involved in the cellular efflux of sterols, in particular cholesterol and desmosterol (a cholesterol precursor), to high-density lipoprotein (HDL) (17,19,20). Therefore, ABCG4 could play a role in pathologies involving cholesterol such as Alzheimer's disease (AD) (21,22). In AD, excessive accumulation and aggregation of amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) is observed in the

brain (23). A $\beta$  originates from the amyloid precursor protein (APP) which is cleaved by both the  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases to produce A $\beta$  in the brain (24). Supporting the hypothesis of ABCG4 involvement in AD pathology, Uehara et al. showed, in human AD brains, that ABCG4 was over-expressed in microglia surrounding senile plaques, suggesting a role for ABCG4 in the A $\beta$  phagocytose by microglial cells (25). Recently, a study reported that ABCG1 and ABCG4 can modify the plasma membrane distribution of the  $\gamma$ -secretase, leading to a decrease of its activity and then of the brain A $\beta$  production (26). But the brain accumulation of A $\beta$  might be mainly due to a default of its brain clearance, in particular at the BBB level (18,27–31). Two ABC transporters, ABCB1 and ABCG2, as well as the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) have been shown to be involved in the BBB efflux of A $\beta$ , but other unidentified transporters are likely to be also involved in this efflux process (8,18,32,33). We previously showed, *in vitro*, that A $\beta$  was actively transported by the murine *Abcg4* from intra- to extra-cellular compartment of HEK-*Abcg4* transfected cells and that probucol specifically inhibited this *Abcg4*-mediated cell efflux (18). But whether *Abcg4* can be expressed and able to efflux its substrates through the mouse BCECs is still unknown. The aim of our study was to characterize the expression and function of *Abcg4* at the mouse BBB. For this purpose, we developed and used *Abcg4*-knockout (KO) mice in comparison with C57Bl/6 wild-type (WT) mice.

## RESULTS

### Immunodetection of *Abcg4* in WT and *Abcg4*-KO mice

*Abcg4* and P-gp co-immunostaining of WT vs KO mouse brain cryosections was performed to assess the presence of the transporter at the BBB [Fig. 1]. As can be seen in Fig. 1A, *Abcg4* labelling was detected in WT parenchymal cells, most likely in neurons, and in P-gp-positive brain cortex capillaries. No detectable signal could be observed when primary antibody was omitted (not shown). In *Abcg4*-KO mice, a stronger signal was observed with a predominant localization in the perinuclear region of endothelial cells, reflecting the intracellular retention of misfolded *Abcg4* mutant protein [Fig. 1B]. The *Abcg4* detection in KO mice agrees with the fact that the non-functional *Abcg4* mutant protein still contains the immunoreactive epitope recognized by the anti-ABCG4 antibody (amino acids 321-370 within an N-terminal cytoplasmic domain of ABCG4 of human origin).

### **mRNA quantification of other ABC transporters in WT and *Abcg4*-KO mice BBB**

We compared, by qRT-PCR, the relative mRNA amount of the ABC transporters involved (or suggested to be involved) in sterol and/or A $\beta$  efflux through the mouse BBB (*Abca1*, *Abcb1*, *Abcg1*, *Abcg2* and *Abcg4*) in the brain microvessels of WT vs. *Abcg4*-KO mice. The primers used to detect *Abcg4* were designed in a non-mutant 5' region of *Abcg4* gene (see material and methods section).

As shown in Fig. 2, the *Abca1*, *Abcb1*, *Abcg1* and *Abcg2* mRNA amounts in WT mouse brain microvessels were not significantly different from those in *Abcg4*-KO mice. On the contrary, the mRNA amount of *Abcg4*, judged by primers located 5' of the targeting site, was significantly 20-fold higher in *Abcg4*-KO mice than in WT mice ( $p = 9.4 \times 10^{-6}$ ).

### ***Abcg4* function at the mouse BBB**

We first measured the time-course of the brain volume ( $V_{\text{brain}}$ ,  $\mu\text{L/g}$ ) of distribution of [ $^3\text{H}$ ]desmosterol by using the in situ brain perfusion (ISBP) technique in WT mice [Fig. 3A]. We observed a linear increase of [ $^3\text{H}$ ]desmosterol  $V_{\text{brain}}$  as a function of the perfusion time suggesting that [ $^3\text{H}$ ]desmosterol transport rate remained unchanged over time. We then chose a perfusion time of 60 s for subsequent single time-points experiments. Similar experiments and results had been previously obtained for A $\beta$  (18).

Thus, we evaluated the function of *Abcg4* at the BBB level by measuring the brain uptake clearance ( $\text{Cl}_{\text{up}}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]desmosterol and [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$ , in WT and *Abcg4*-KO mice, in the presence or absence of probucol. The [ $^3\text{H}$ ]desmosterol and [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$   $\text{Cl}_{\text{up}}$  obtained in *Abcg4*-KO mice were not significantly different from those of WT mice ( $p = 0.21$  and  $0.97$  respectively) [Fig. 3B and 3C], suggesting either that *Abcg4* was not involved in the [ $^3\text{H}$ ]desmosterol and [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  efflux at the mouse BBB or that the lack of *Abcg4* has been offset by other efflux proteins at the mouse BBB, like *Abcg1* for desmosterol (17) or *Abcb1/Abcg2* for A $\beta$  (18). To elucidate if *Abcg4* can effectively participate in the desmosterol and A $\beta$  efflux through the BBB, we compared the [ $^3\text{H}$ ]desmosterol and [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$   $\text{Cl}_{\text{up}}$  obtained with and without co-perfusion of probucol in WT and *Abcg4*-KO mice. Probucol has been previously described to inhibit both ABCA1 (11) and *Abcg4* (18) but not ABCG1 (34). Our results show that the [ $^3\text{H}$ ]desmosterol and [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$   $\text{Cl}_{\text{up}}$  obtained in WT but not in *Abcg4*-KO mice, were significantly 1.8- and 2.1-fold increased ( $p = 0.0003$  and  $0.0002$  respectively) by adding probucol in the perfusion buffer, respectively [Fig. 3B and 3C], indicating that probucol had

inhibited the *Abcg4*-mediated efflux of [<sup>3</sup>H]desmosterol and [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> through the BBB in WT mice. These results demonstrate that *Abcg4* is an efficient efflux transporter at the BBB level, able to limit the entry of its substrates, *i.e.* desmosterol and Aβ, from the blood to the brain.

#### **L-thyroxine (T<sub>4</sub>) inhibition of *Abcg4*-mediated efflux of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> and [<sup>3</sup>H]desmosterol at the BBB level**

We measured the Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> and [<sup>3</sup>H]desmosterol in the presence or absence of T<sub>4</sub> in WT and *Abcg4*-KO mice. Adding T<sub>4</sub> to the perfusion buffer significantly increased the Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> (p = 0.0007) and [<sup>3</sup>H]desmosterol (p = 0.002) in WT mice (2-fold and 1.6-fold, respectively) while no significant effect was observed in *Abcg4*-KO mice, neither for [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> nor for [<sup>3</sup>H]desmosterol (p = 0.47 and 0.69 respectively). Thus the efflux ratio, measured as the ratio between the Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> or [<sup>3</sup>H]desmosterol obtained with and without co-perfusion of T<sub>4</sub> (ER<sup>T<sub>4</sub>/ctrl</sup>) were equal to 2 and 1.6, respectively in WT mice and 1 in *Abcg4*-KO mice [Fig. 4]. Taken together, these data demonstrate that T<sub>4</sub> inhibits the *Abcg4*-mediated efflux of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> and [<sup>3</sup>H]desmosterol at the BBB level.

#### **In vivo interaction between [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> and desmosterol at the mouse BBB level**

We tested whether desmosterol and [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> could compete for *Abcg4* by measuring the Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> in the presence or absence of desmosterol in WT and *Abcg4*-KO mice. Adding desmosterol to the perfusion buffer significantly increased the Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> in WT mice (1.5-fold, p = 0.01) while no significant effect was observed in *Abcg4*-KO mice (p = 0.64). Thus the efflux ratio, measured as the ratio between the Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> obtained with and without co-perfusion of desmosterol (ER<sup>desmosterol/ctrl</sup>) was equal to 1.5 in WT mice and 1 in *Abcg4*-KO mice [Fig. 5]. Taken together, these data demonstrate that desmosterol inhibits the *Abcg4*-mediated efflux of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> at the BBB level.

#### ***Abcg4* homology modeling**

A homology model of the *Abcg4* dimer consisting of residues 82-641 was created using the published x-ray structure of a related ABC protein complex ABCG5/ABCG8 (35) that is also known to transport sterols [Fig. 6]. The initial model was optimized by adding missing side-chain atoms, relaxing steric clashes, and sampling rotomers to identify a favorable

configuration. Overall model quality, as assessed by MolProbity (36,37), increased from the 23<sup>rd</sup> to the 92<sup>nd</sup> percentile (N=27675, 0Å – 99Å). While a small segment of residues from the protein sequence could not be modeled, a significant portion had sufficient homology to develop a model that includes the nucleotide-binding domain, the transmembrane domain including the sterol binding site (35), and the extracellular region. Based on the structure and purported mechanism of the related ABCG5/ABCG8 protein complex, sterols bind to a cavity formed at the dimer interface that allows sterols to move from the lipid bilayer into the dimer core followed by translocation to the membrane surface (35). Analogous structural features present in our model suggest that the Abcg4 dimer may translocate sterols by an analogous mechanism.

### **Sterol docking**

We tested the feasibility of desmosterol translocation in the Abcg4 model by performing 15,000 simulations of desmosterol binding to Abcg4 using SwissDock (38) in accurate mode with no side-chain flexibility [Fig. 6B]. While the structure of ABCG5/ABCG8 places the sterol-binding site in a cleft formed at the dimer interface, we chose to allow SwissDock to dock desmosterol over the entire dimer surface to avoid bias toward our hypothetical mechanism. Importantly, of the top 250 predicted binding modes all but 1 were found in the predicted sterol binding cleft and all had favorable binding energetics with  $\Delta G$  between -6.79 and -8.12 kcal/mol. In addition, simulations using cholesterol produced nearly identical results though with less favorable binding energetics ( $\Delta G$  between -6.14 and -7.79 kcal/mol) suggesting a higher affinity for desmosterol.

### **A $\beta$ docking**

Our data support a role for Abcg4 in both desmosterol and A $\beta$  transport despite large differences in the substrate molar mass (384.6 and 4514.1 g/mol respectively) [Fig. 7]. While A $\beta$  is not small molecule ligand and therefore cannot be docked in a binding site using traditional docking software, algorithms are available that predict protein:protein interactions. GRAMM-X (39,40) is a web-based service that accepts two proteins as input and, like SwissDock for small molecules, performs a large number of unbiased simulations in order to determine a thermodynamic ‘best fit’ for a given protein pair. As with sterol docking, we did not define a binding site therefore GRAMM-X sampled the entire surfaces of

both proteins. GRAMM-X also identified the dimer interface cleft as the binding site for A $\beta$  which suggests that A $\beta$  and desmosterol compete for binding.

Abcg4 monomers come together to form a homodimer that includes nearly identical binding clefts which are opposite one another on the dimer surface. The homology model is an approximation of the dimer structure frozen in time which fails to capture the dynamic nature of protein motions. *In vivo* it is likely that nucleotide binding changes the overall configuration of the dimer to allow for sterol binding on one side of the complex followed by translocation of sterol to the dimer core before being exported from the membrane. One consequence of this movement could be that only one sterol-binding site exists at a given time. Thus sterol binding would alternate from one binding site to the other as sterols are translocated. This mechanism could explain why the homology model has a single sterol-binding site despite the presence of two nearly identical binding clefts. Importantly however, this does not appear to be the case for A $\beta$  which is predicted to bind in both clefts equally. Thus, Abcg4 seems to have two A $\beta$  binding sites which agrees with our previous data that percent efflux of A $\beta$  was greater than cholesterol (18) and with our current data that desmosterol competes with A $\beta$  efflux. In addition, we determined, in HEK-*Abcg4* transfected cells, the Abcg4-mediated transport of A $\beta$  parameters (not shown). The velocity of A $\beta$  transport by Abcg4 in function of the A $\beta$  concentrations was best fitted by a Hill equation (sigmoid) with a Hill coefficient at around 2 ( $n = 1.80 \pm 0.08$ ), supporting the hypothesis of 2 binding sites for the Abcg4-mediated transport of A $\beta$ . The  $K_m$  was found equal to  $349.9 \pm 16.8$  pM and the  $V_m$  to  $22.4 \pm 0.2$  pmol/L/min. Taken in a whole, our biological and structural data suggest that Abcg4 contains two A $\beta$  binding sites and one alternating sterol site which explains our observation that Abcg4 transports both A $\beta$  and sterols with a preference for A $\beta$ . While we feel this is a plausible mechanism, more research including direct structural observation of the Abcg4 dimer is needed.

## DISCUSSION

In the literature, ABCG4 was mainly described in neurons and astrocytes of hippocampus, cerebellum and olfactory bulb regions (17,26,41). ABCG4 has been also detected in ependymal cells from non-dement elderly brain patients and in microglial cells in human AD brains (25,42). But, to our knowledge, the expression and function of ABCG4 in human BCECs have not been reported. However, we previously detected Abcg4 in microvessels isolated

from WT and 3xTgAD mouse brains (18,43), but its exact cell localization as well as its mouse BBB function was unknown. In accordance with these previous reports, we detected *Abcg4* mRNA and Abcg4 protein in C57Bl/6 mouse brain microvessels [Fig. 1,2]. The pattern of Abcg4 immunostaining and the observed colocalization with Abcb1 further suggest that Abcg4 is expressed in endothelial cells of mouse brain capillaries. Recently, Hegyi and Homolya reported a predominantly cell plasma membrane localization of ABCG4 in several cell types (15). Furthermore, we clearly evidenced an efflux function of Abcg4 at the mouse BBB level by using the ISBP technique, which allows for the exploration of BBB transport mechanisms occurring at the luminal side of the BCECs (44). Taken together our data strongly suggest that Abcg4 is localized at the luminal side of the mouse BCECs, as are other ABC transporters including ABCB1 (45).

To further study the role of Abcg4 in BBB, we generated and used a novel *Abcg4*-KO mouse model. These mice express an incomplete Abcg4 protein fused to *eGFP* [Fig. 8]. As expected, this mutated Abcg4 is non-functional as demonstrated by our data showing that probucol, a known Abcg4 inhibitor (18), is unable to modulate the  $Cl_{up}$  of a well-known Abcg4 substrate, [<sup>3</sup>H]desmosterol, in KO mice, whereas this modulation was present in WT mice [Fig. 3]. In addition, using primers designed in the non-mutated 5' region of *Abcg4*, we showed, by qRT-PCR, that the mRNA amount of *Abcg4* was increased 20-fold in KO mice, as compared to WT mice. This result was corroborated at the protein level by the observation of a stronger immunofluorescence signal following Abcg4 labelling. Interestingly, such a regulation had been previously observed in another KO mice model deleted from a part of the *Abcg1* gene, but to a lesser extent, since a 2-fold increase of the total brain *Abcg1* mRNA had been reported in *Abcg1*-KO mice compared with WT mice (17,46). Our data suggest that the absence of the complete Abcg4 protein in the plasma membrane of the mouse BCECs led the cells to over-express the *Abcg4* gene to attempt to compensate for the loss of Abcg4 activity. It has been shown that *Abcg4* can be induced by the liver-X receptor (LXR) activation (17,47,48). One explanation may be that *Abcg4* could export a LXR ligand such as desmosterol (17); in the absence of Abcg4 function, the increased intracellular accumulation of this ligand might increase LXR activation resulting in increased *Abcg4* transcription. In addition, our results show that no other ABC transporters mRNA levels (*Abca1*, *Abcb1*, *Abcg1*, *Abcg2*) were up- or down-regulated in *Abcg4*-KO mice, which differ from previous data obtained in complete deleting ABC gene KO mouse models, in which the lacking protein



was compensated by the over-expression of another ABC protein. Hence, we reported that the absence of Abca1 or Abcb1/Abcg2 transporters led to the over-expression of Abcg4 in the BBB of C57Bl/6 mice (10,18). Similarly, the Abcb1 deficiency resulted in an increase in the *Abcg2* mRNA levels in mouse BCECs (49). Such functional compensation was also observed in *Mrp2*-deficient rats in which Abcb1 was up-regulated (50). Nevertheless, the fact that the absence of the complete *Abcg4* gene, and thus of a well addressed Abcg4 protein, was compensated by its own over-expression suggests an important role of Abcg4 in the mouse BCECs.

We previously evidenced that a probucol- and a L-thyroxine-sensitive transporter, different from Abca1, Abcb1 and Abcg2, mediated the efflux of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> through the mouse BBB (18,51). On the other hand, we have shown, in HEK-*Abcg4* transfected cells, that Abcg4 was efficient to efflux Aβ and that this efflux was specifically inhibited by probucol (18). In the current study, we demonstrate that Abcg4 is the probucol- and T<sub>4</sub>-sensitive transporter involved in the mouse BBB efflux of Aβ. For the first time, we clearly demonstrate that Abcg4 is an efficient efflux transporter at the mouse BBB level, able to mediate the efflux of both, desmosterol and Aβ. Moreover, our data confirm that probucol is a potent inhibitor of Abcg4 and evidence for the first time that T<sub>4</sub> is also an Abcg4 inhibitor. Our current *in vivo* and previous *in vitro* (18) data support our docking results. Hence, building a high quality Abcg4 homology model based on the crystal structure of related family members ABCG5/ABCG8 suggests that the Abcg4 dimer contains a sterol binding domain that has a greater affinity for desmosterol than cholesterol. In addition, and somewhat surprisingly, we found that unbiased simulations of Aβ:Abcg4 dimer interactions indicate that Aβ binds to the same cleft as desmosterol despite having greater than ten times the molar mass. While it is possible that modeling Abcg4 using ABCG5/ABCG8 incorporates mechanistic bias into our model (for example, sterol binding) it is important to note that selection of that template was unbiased as was determination of the desmosterol binding site. In addition, no loops or gaps in the sequence were needed to achieve a very high quality model (92<sup>nd</sup> percentile, N=27675, 0Å – 99Å based on MolProbity score). This Aβ/desmosterol interaction was confirmed *in vivo* since desmosterol inhibited the Abcg4-mediated efflux of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> in WT but not in *Abcg4*-KO mice. The interaction between Aβ and desmosterol with Abcg4 suggests the complex may be a target for drug discovery *via* identification of Abcg4 modulators using computational tools and homology modeling as we have reported previously (52).

To our knowledge, we are the first to provide direct evidence that Abcg4 mediates the mouse BBB efflux of desmosterol and A $\beta$ . These data are of a great importance, since it reveals -1) that besides ABCB1 and ABCG2 (53), a third ABC protein is involved in the brain to blood clearance of A $\beta$  and -2) that besides cholesterol (which efflux is mediated by Abca1 at the mouse BBB (10)), another sterol, *i.e.* desmosterol, can also be pumped out of the brain by an ABC protein located at the luminal side of the mouse BCECs. Thus, our data suggest cooperation between several ABC transporters ensuring a proper cerebral efflux of A $\beta$ . Interestingly, the Km that we estimated *in vitro* for the A $\beta$ /Abcg4 interaction indicated a very tighter affinity of A $\beta$  for Abcg4 (350 pM) than reported for Abcb1 (12.5  $\mu$ M) (54). This could be explained by the prediction of two A $\beta$  binding sites on the Abcg4 dimer, obtained both by pharmacokinetic modelling (Hill constant = 1.8) and by docking simulations. This cooperation between several ABC transporters seems to allow for a preservation of the BBB efflux of A $\beta$  in several pathophysiological conditions including the lack of one or two of these transporters. Indeed, the BBB Cl<sub>up</sub> of A $\beta$  was the same in WT and *Abcg4*-KO mice as well as in WT and *Abcb1/Abcg2*-KO mice (18).

Moreover, our data reveal a potential role of the BBB Abcg4 in the pathophysiology of AD. In the literature, a link between AD and ABCG4 has already been described, but not at the BBB level (21,22,26). Hence, mice lacking *Abcg4* have a defective associative fear memory and an over-expression of ABCG4 has been observed in the brain of AD patients (25,55). Our group was the first to point out a link between BBB, ABCG4 and AD, by evidencing an over-expression of *Abcg4* in young 3xTg-AD mice (3 months) (43). Our present data, by demonstrating that *Abcg4* can efflux A $\beta$  through the mouse BBB, suggest that these 3 months-aged 3xTg-AD mice could efflux more A $\beta$  than WT and then compensate for the increased RAGE-mediated influx of A $\beta$  observed at the same time in 3xTg-AD mice (43). This hypothesis is supported by the unchanged Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> observed in 3-months-old 3xTg-AD mice compared with WT mice (43). In addition, an indirect link between ABCG4 and AD can be hypothesized based on the sterol efflux function of ABCG4 (17) and the sterol/AD relationship (22,56–59). In particular, several studies have highlighted the strong interrelations existing between cholesterol and A $\beta$  levels although the mechanisms of this relationship are still not well understood (56,60,61). Desmosterol, a precursor of cholesterol which conversion depends on the DHCR24 (24-dehydrocholesterol reductase), seems to be also linked with AD (62,63). Hence, the brain desmosterol amount was increased in a mouse

model of AD (APP<sup>SLxPS1mut</sup>) compared with WT (64). On the contrary, a decrease of the desmosterol level in brain tissues of AD patients compared to those of age-matched control patients has been observed (65). This decrease seems to be independent of the conversion rate of desmosterol to cholesterol since the gene expression level of DHCR24 was the same in brains of AD and non-AD patients (62). Our results evidenced a role of ABCG4 in the BBB efflux of desmosterol. It is obvious that an increase of the ABCG4 expression and/or function in AD, like observed in AD patients and in 3xTg-AD mice (25,43), could decrease the brain levels of desmosterol. On the other hand, it is known that desmosterol can activate the LXR which target genes are in particular ABCA1, ABCG1 or ABCG4 (17,47,64). Interestingly, it has been shown that an increase of the brain desmosterol levels induced the expression of the LXR-target genes *Abca1* and *Abcg1* in double KO *Abcg1*<sup>-/-</sup>/*Abcg4*<sup>-/-</sup> mice (17). Taken together, it is likely that LXR regulation by desmosterol could be involved in the ABCG4/desmosterol/AD relationship.

In conclusion, we provide evidence, for the first time, that *Abcg4* is expressed and functional in the luminal membrane of mouse BCECs and is an efficient efflux pump for A $\beta$  and desmosterol. This result enriches the knowledge of the ABC transporters expressed at the mouse BBB level and encourage further studies in human brain microvessels, in particular in the context of AD. We identified two inhibitors (probucol and T<sub>4</sub>) of *Abcg4* at the mouse BBB and provide support for a direct interaction between desmosterol and A $\beta$ . Moreover, our results indicate a relationship between AD, ABCG4 and T<sub>4</sub> at the BBB level which deserves to be studied in-depth. In addition, our findings support the hypothesis of cooperation between several ABC transporters to mediate de brain-to-blood efflux of A $\beta$  through the BBB, including ABCG4, ABCB1 and ABCG2. The relative part of each transporter in these efflux processes remains to be determined. However, our data clearly reveals ABCG4 as a new potential drug target in AD.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

*Abcg4*-KO mice were initially produced in the Patel laboratory at the Medical University of South Carolina as described in the *Abcg4*-KO mice line establishment section of this manuscript. The *Abcg4*-KO mice were then maintained and used in the animal house of the

Faculty of Pharmacy of Paris (Animal Platform, CRP2 - UMS 3612 CNRS - US25 Inserm-IRD – Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France). *In vivo* experiments were performed with 8-12 week-old mice. Wild-type C57BL/6 and *Abcg4*-KO mice had free access to standard laboratory food and water and were kept on a 12 hours light-dark cycle at  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ . All studies involving animals and their care were performed according to the National Research Council's guide and complied with the Ethical rules of the European directive (210/63/EU) for experimentation with laboratory animals. All experimental protocols were approved by the ethics review committee of Paris Descartes University (approval n° 12-181/12-2012), the Animal Care and Use Committees of the Medical University of South Carolina, Charleston, SC, and the Medical College of Wisconsin and the IACUC for the Clement J. Zablocki VAMC, Milwaukee, WI.

### **Reagents**

[ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  (20 Ci/mmol) and [ $^3\text{H}$ ]desmosterol (10 Ci/mmol) were purchased from Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany), [ $^{14}\text{C}$ ]sucrose (435 mCi/mmol), liquid scintillation cocktails Ultima Gold XR<sup>®</sup> and Solvable<sup>®</sup> were purchased from PerkinElmer Life Sciences (Courtaboeuf, France). L-thyroxine, probucol, desmosterol, Triton X-100, human serum, and bicinchoninic acid (BCA) assay kits were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). All the other chemicals were commercial products of reagent grade.

### **Brain microvessel isolation, mRNA extraction and reverse transcription**

Mouse brain was collected and the olfactory bulbs, cerebellum, thalamus, white matter, hippocampus, striatum, meninges and large superficial blood vessels were removed. For each sample, six cortices were pooled and immersed in Hank's Balanced Salt Solution containing 1% Hepes (HBSS + 1% Hepes buffer) and centrifuged at 600 g for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ . After discarding the supernatant, the pellet was homogenized in HBSS + 1% Hepes buffer containing Liberase DL (37,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and DNase I (20 U/mL) and incubated for 45 min at  $37^\circ\text{C}$ . The resulting homogenate was centrifuged at 600 g for 5 min at  $4^\circ\text{C}$  and the supernatant discarded. The pellet was homogenized in HBSS + 1% Hepes buffer containing 18 % bovine serum albumin (BSA) and centrifuged at 2000 g for 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . After discarding the supernatant, the pellet was homogenized in HBSS + 1% Hepes buffer containing 1% BSA. The homogenate was passed through a 100  $\mu\text{m}$  mesh cell strainer then

through a 10 µm mesh nylon filter. The fraction retained on the 10 µm mesh nylon filter was collected, suspended in HBSS + 1% Hepes buffer containing 1% BSA and centrifuged at 600 g for 5 min at 4°C. The pellet containing the brain microvessels was washed in HBSS + 1% Hepes buffer and centrifuged again at 600 g for 5 min at 4°C. The supernatant was discarded; the pellets were resuspended in RLT buffer containing β-mercaptoethanol and stored at -80°C.

Total RNA was extracted from the microvessel samples using RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase I to remove genomic DNA. For each sample, 350 ng of extracted RNA were converted to cDNA using SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C.

### ***Abcg4*-knockout mice line establishment**

#### ***Targeting vector construction and generation of knockout mice***

A mouse genomic bacterial artificial chromosome (BAC) library (CitbCJ7, ES cell line/129Sv, Research Genetics, Inc., Huntsville, AL, USA) was screened by using primers designed from the sequences of mouse *Abcg4* cDNA and a positive BAC clone was used as a template to amplify genomic DNA fragments of *Abcg4*. Long-fragment polymerase chain reaction (PCR) was performed using Expanded Long Template PCR system kit (Roche Applied Science, Indianapolis, IA, USA). An approximately 1.7 kb 'long-arm' genomic fragment containing exon 6 to partial exon 7 was inserted in-frame into the coding sequence for enhanced green fluorescent protein (pCRII, Invitrogen) and the exon 6–exon 7-eGFP fusion fragment (5' arm, 'short-arm') was cloned into cloning site A of OSDUPDEL vector (supplied by Dr. Nobuyo Maeda, University of North Carolina) and verified by sequencing. The 'long-arm' genomic fragment, containing partial exon 9 to exon 14 (~ 4.2kb), was cloned into cloning site B; homologous targeting would result in deletion of remaining exon 7, intron 7, exon 8 and intron 8 [Fig. 8A]. A theoretical translation of partial *Abcg4* fused to eGFP results in a ~57kDa fusion protein. A functional protein is not expected; the targeting retains the Walker motifs, with deletion of part of exon 7 and all of exon 8, with in-frame GFP fusion to part of exon 7, with a stop translation codon [Fig 8A]. This disrupts all of the transmembrane domains, and in silico analyses suggested that any hybrid protein that could result from translation would remain cytosolic. Additionally, the targeting construct also contains a Neomycin gene

cassette, bounded by LoxP sites, after the GFP further ensuring disruption of normal downstream ABCG4 expression. The ES cell targeting and micro-injection of positive clones was performed by the transgenic core at the Medical University of South Carolina. ES cells (129/SvEvTac-cell line) were electroporated with the linearized targeting vector DNA and cultured on sub-confluent embryonic fibroblasts. Transfected cell colonies were selected by culturing cells in medium containing 200 µg/mL G418 (Life Technologies, Rockville, MD, USA). Out of 79 colonies screened by PCR, 18 clones were identified containing a homologously targeted 5' arm, of which 11 clones were confirmed by Southern blotting. Positively targeted ES cells were microinjected into C57BL6 blastocysts and transplanted into pseudopregnant recipients. Three chimeric male mice (agouti coat color) were isolated and bred with C57BL/6J mice, only one of which led to germ-line transmission. Heterozygous offspring mice were back-crossed to C57BL/6J mice (n > 16) to produce disrupted line and inter-crossed to generate knockout mice [Fig. 8B].

#### ***Southern blot analysis***

DNAs were digested with *Bgl* I, subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel and transferred to nylon membrane. Southern blot filters were hybridized with a ~800 bp PCR fragment from intron 2 to intron 5 (containing exons 3, 4 and 5), using a non-radioactive detection system (Dig labeling kit, Roche, Indianapolis) [Fig 8B].

#### ***Sequencing of Abcg4 mRNA***

Total RNA was extracted from mouse brain of WT and *Abcg4*-KO mice using RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (500 ng) was reverse transcribed into cDNA in a final volume of 20 µL. The mixture consisted of 500 ng total RNA, 500 µM of each dNTP, 10 mM DTT, 1.5 µM random hexanucleotide primers, 20 U RNase in ribonuclease inhibitor, and 100 U SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). Hexamers were annealed at 25°C for 10 min, products were extended at 42°C for 30 min, and the reaction was terminated by heating to 99 C for 5 min and quick-chilling to 4°C. The cDNA was then amplified by PCR using GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA). Primer pairs for amplification and sequencing of *Abcg4* exons were designed based on *Abcg4* reference sequence (Genbank: NM-138955.3) [Table 1]. The PCR products were purified using NucleoFast® 96 PCR Clean Up kit (Macherey-Nagel, Düren,

Germany) according to the manufacturer's instructions. The *Abcg4* mRNA was sequenced in WT and *Abcg4*-KO mice by Sanger sequencing using the Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). After a filtration by chromatography using Sephadex® G-50 (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), the sequence was analyzed with ChromasPro program (Technelysium, South Brisbane, USA).

Only wild-type *Abcg4* gene was amplified when *Abcg4*-1 and *Abcg4*-2 primers were used, whereas when eGFP-1 and eGFP-2 primers were used, the amplification only works for the mutant *Abcg4* gene. The sequencing of *Abcg4* mRNA in WT and *Abcg4*-KO mice confirmed the absence in the mutant *Abcg4* mRNA of the end of exon 7 and the exon 8 which are replaced by eGFP gene in *Abcg4*-KO mice (data not shown).

### **Genotype: PCR analysis**

Genotyping of mice was performed using PCR on mouse tails cDNA (data not shown) using four primers. The Mo-ABCG4-WT-f (5'-CTGCCCTCCCTTATCAATC-3') and Mo-ABCG4-WT-r (5'-TATCACAAGCCAGCCTTCTCGG-3') primers were used to detect a 423 bp fragment from the WT allele. The Mo-ABCG4-Mut-f (5'-CTGCCCTCCCTTATCAATC-3') and Mo-ABCG4-Mut-r (5'-TTGCTCACCATGGTGGCGACCGGTGG-3') primers were used to detect a 400 bp fragment from the mutant allele.

The PCR was performed using GoTaq® Green Master Mix (Promega). The program consists of a denaturation step at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 30 s), annealing (60°C for 30 s) and extension (72°C for 45 s) steps. The final extension at 72°C for 7 min ends the program.

### **Quantitative RT-PCR**

The mRNA levels of ABC transporter genes (*Abca1*, *Abcb1*, *Abcg1*, *Abcg2* and *Abcg4*) were determined in WT and *Abcg4*-KO mice by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using Power SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) on an ABI Prism 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All the primers used [Table 2] were tested upstream on positive controls using SYBR Green fluorescence detection. The *Abcg4* primers were designed in exons 2 and 3 which belong to the non-mutant sequence of the *Abcg4* gene. The expression levels of all the transcripts were normalized to the expression levels of the housekeeping gene  $\beta$ -actin in the same tissue. The comparative Ct

method with the formula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (where  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{KO} - \Delta Ct_{WT}$ ) was used to calculate the relative expression of each gene.

### **Confocal imaging of mouse cortex cryosections**

Brains of WT or KO mice were fresh-frozen in isopentane at  $-45^{\circ}\text{C}$  and staining was performed on 20  $\mu\text{m}$  thick cryosections. Sections were fixed in methanol (10 min at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) and blocked in PBS, 10% Goat serum, 1% BSA, 0.1% Triton for 1h at RT. They were incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  in a mixture of mouse anti-Pgp (C219 clone, Enzo Life Sciences, Villeurbanne, France) and rabbit anti-ABCG4 (sc-33825, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) antibodies diluted 1/50 and 1/100 in PBS, respectively. Sections were then reacted with Goat anti-rabbit Alexafluor 488 and Goat anti-Mouse IgG1 Alexafluor 555 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) diluted 1/300 for 2h at RT. Nuclei counterstaining was performed by incubation in Topro3 (ThermoFisher Scientific) diluted 1/500 for 15 min at RT. Thorough PBS washing was performed after each incubation step. Sections were mounted in 90% glycerol in PBS and viewed in a Leica TCS SP2 confocal microscope (Leica microsystems SAS, Nanterre, France) equipped with a x40 objective with  $\text{NA}=1.0$ . Images were taken with the same acquisition parameters for all conditions and no detectable signal was observed when primary antibodies were omitted.

### ***In situ* brain perfusion (ISBP) technique**

The ISBP technique was developed to study drug transport processes occurring at the luminal side of the BCECs (66,67). This method can be used to measure transport parameters, including the distribution volume and the  $\text{Cl}_{\text{up}}$  of a target molecule over very short periods (30-120 s). One of the advantages of this technique is the ability to administer inhibitors or to use transporter deficient mice, in order to study the role of transporters at the BBB. If the  $\text{Cl}_{\text{up}}$  increases in the presence of a transporter inhibitor or when a carrier is not expressed, we can conclude that the transporter plays a role in the efflux of the target molecule at the BBB.

### **Surgical procedures and Perfusion**

Mice were anesthetized by intra-peritoneal injection of a mixture of ketamine and xylazine at 140:8 mg/kg. The right common carotid artery was ligated on the heart side and the right external carotid artery was ligated at the level of the bifurcation. A catheter was inserted



into the right common carotid artery. The perfusion liquid was contained in a syringe placed in an infusion pump and connected to the catheter. Before the perfusion, the thorax of the animal was opened, the heart was removed and perfusion started immediately at flow of 2.5 mL/min. The perfusion fluid was Krebs bicarbonate-buffered physiological saline (128 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.2 mM KCl, 2.4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub> and 9 mM D-glucose). The solution was gassed with 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> to bring the pH to 7.40 and warmed to 37°C in water bath. Each mouse was perfused for 60 s with [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> (0.2 μCi/mL) or [<sup>3</sup>H]desmosterol (0.2 μCi/mL). [<sup>14</sup>C]sucrose was used as a vascular marker of the physical integrity of the BBB and co-perfused with the tritiated substrate. The brain uptake of tritiated tracers was also measured in the presence of unlabelled substrates [probucol 10 μM, L-thyroxine 10 μM or desmosterol 20 μM], dissolved in their respective vehicles [DMSO (<0.5% in final perfusion fluid) or H<sub>2</sub>O/NaOH]. The experiment was terminated by decapitating the mouse. The right cerebral hemisphere and aliquots of the perfusion fluid were sampled in tared vials, weighted, digested in 2 mL of Solvable<sup>®</sup> solubilizer (PerkinElmer) at 50°C and mixed with 9 mL of Ultima Gold XR<sup>®</sup> scintillation cocktail (PerkinElmer). Labeled compounds were counted on a Tri-Carb<sup>®</sup> (PerkinElmer) counter with the appropriate dual (<sup>14</sup>C/<sup>3</sup>H) quenching curves and standards to measure disintegration per minute (dpm) in samples.

#### Calculation of the BBB transport parameters

All the calculations were done as described previously (67). The brain vascular volume of each animal ( $V_{\text{vasc}}$ , μL/g) was estimated using the [<sup>14</sup>C]sucrose distribution volume, which does not measurably cross the BBB during short perfusions, by dividing the amount of [<sup>14</sup>C]sucrose (dpm/g) in the right brain hemisphere by the concentration of [<sup>14</sup>C]sucrose in the perfusion fluid (dpm/μL). All the values were under 20 μL/g, indicating that the BBB was not altered during these experiments (66). The brain uptake clearance ( $Cl_{\text{up}}$ , μL/g) is the ratio between the apparent tissue distribution volume ( $V_{\text{brain}}$ , μL/g) of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> or [<sup>3</sup>H]desmosterol and the perfusion time (s). The  $V_{\text{brain}}$  was calculated from the amount of radioactivity in the right brain hemisphere using the following equation:

$$V_{\text{brain}} = X_{\text{brain}} / C_{\text{perf}}$$

where  $X_{\text{brain}}$  (dpm/g) is the calculated amount of tritiated tracer in the right cerebral parenchyma and  $C_{\text{perf}}$  (dpm/μL) is the concentration of tritiated tracer in the perfusion fluid.

$X_{\text{brain}}$  is obtained by this equation:

$$X_{\text{brain}} = X_{\text{tot}} - (V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}})$$

where  $X_{\text{tot}}$  (dpm/g) is the total amount of tritiated tracer measured in the brain tissue sample (vascular and extravascular).

### **Abcg4 dimer structural modeling**

The mouse sequence of Abcg4 (UniProtKB Q8K4E1) was submitted to the MobBase modeling server (68) to create a homology model of an Abcg4 monomer. ModBase selected the structure of ABCG5/ABCG8 (PDB code 5do7A) as the template and produced 5 Abcg4 models including one that spanned target sequence from 82-641 (corresponding to template sequence 66-645). This model was selected and optimized by adding missing hydrogen atoms, tuning side-chains, and energy minimizing using default settings in Yasara Structure ([www.YASARA.org](http://www.YASARA.org)). Model quality and optimization were assessed using MolProbity (36,37). The final Abcg4 homodimer was created by aligning an Abcg4 monomer to both ABCG5 and ABCG8 using the align instruction in PyMOL ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)). The resulting Abcg4 homodimer was used for docking studies and is available at [www.somelink.edu](http://www.somelink.edu).

### ***Docking***

#### ***Sterols***

The optimized Abcg4 homodimer was submitted to the SwissDock docking server (38) as the binding target after removing the intracellular nucleotide binding domains in order to meet server-imposed size constraints. Both desmosterol and cholesterol were allowed to dock freely across the entire dimer as an unbiased approach to identify potential binding sites.

#### ***A $\beta$***

After removing the nucleotide binding domains, the Abcg4 homodimer was submitted to the GRAMM-X Protein-Protein Docking Web Server (39,40) as the receptor and A $\beta$  as the ligand (PDB code 1aap, chain A) and the top ten predictions were returned.

### **Statistical analysis**

Results are expressed as means  $\pm$  SD. Student's unpaired  $t$  test was used to identify significant differences between groups when appropriate. All the tests were two-tailed and statistical significance was set at \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

## **Acknowledgements**

We thank the Animal Platform, CRP2 - UMS 3612 CNRS - US25 Inserm-IRD – Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France. We acknowledge the scientific and technical assistance of the prior Patel laboratory members who helped with creating and early characterization of the *Abcg4* knockout mouse (Dr. Kangmo Lu, Dr. Bhaswati Pandit, Dr. Jinmei Wu, Dr. Curzio Solca and Yanhong Cai). We thank Dr. Nobuyo Maeda for gift of the targeting construct and Dr. Demetri Spyropoulos at the Medical University of South Carolina for the ES cell and chimeric mice work. We thank Van Ha Hoang for her technical assistance in cell culture.

## **Author contributions**

A.D. conducted the majority of the *in vivo* and molecular biology experiments, data analyses and initial drafting of the manuscript, M.W. and S.B.P. conducted the modelling studies of Abcg4 dimer, created *Abcg4*-KO mice and participated in the paper writing, B.S. and S.C. conducted the confocal and molecular biology experiments, provided discussions and advice on the data analysis and contributed to the manuscript writing, S.N. and M.L. contributed to *in vivo* experiments, N.P. contributed to the sequencing experiments, A-L.R. contributed to *in vitro* experiments, X.D. and J.M.S. provided discussions and advices on the data analysis and revision of the manuscript, F.B. conducted experimental design, data analyses, coordinated the project, and conducted the manuscript writing.

## **Competing interests**

The authors declare no competing financial interests.

## **Materials and correspondence**

Correspondence and material requests should be addressed to Fanchon Bourasset and Shailendra B. Patel

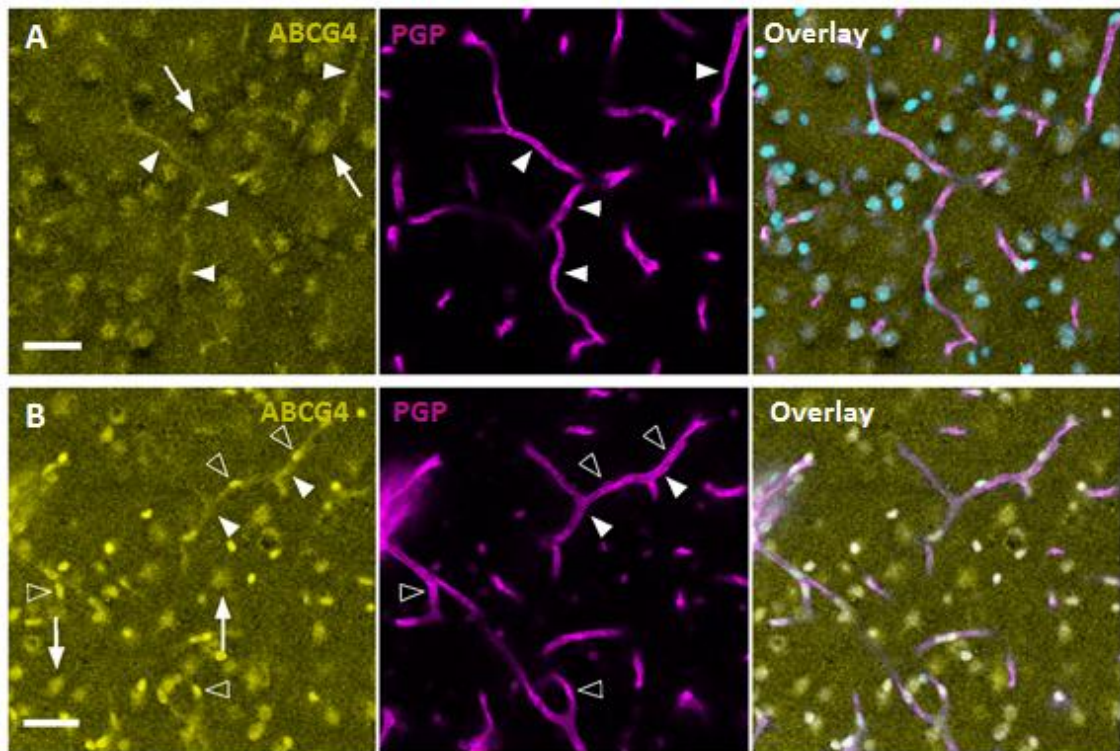
## REFERENCES

1. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010 Jan;37(1):13–25.
2. Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwińska K, Małeckı A. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol Rep.* 2008 Oct;60(5):600–22.
3. Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck M-P, et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 Aug;6(8):650–61.
4. Quaegebeur A, Lange C, Carmeliet P. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron.* 2011 Aug 11;71(3):406–24.
5. Jones PM, George AM. The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research. *Cell Mol Life Sci.* 2004 Mar;61(6):682–99.
6. Theodoulou FL, Kerr ID. ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem Soc Trans.* 2015 Oct;43(5):1033–40.
7. Tachikawa M, Watanabe M, Hori S, Fukaya M, Ohtsuki S, Asashima T, et al. Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult mouse brain. *J Neurochem.* 2005 Oct;95(1):294–304.
8. Mahringer A, Fricker G. ABC transporters at the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2016 May;12(5):499–508.
9. Ohtsuki S, Watanabe Y, Hori S, Suzuki H, Bhongsatiern J, Fujiyoshi M, et al. mRNA expression of the ATP-binding cassette transporter subfamily A (ABCA) in rat and human brain capillary endothelial cells. *Biol Pharm Bull.* 2004 Sep;27(9):1437–40.
10. Do TM, Ouellet M, Calon F, Chimini G, Chacun H, Farinotti R, et al. Direct evidence of abca1-mediated efflux of cholesterol at the mouse blood-brain barrier. *Mol Cell Biochem.* 2011 Nov;357(1–2):397–404.
11. Favari E, Zanotti I, Zimetti F, Ronda N, Bernini F, Rothblat GH. Probucol inhibits ABCA1-mediated cellular lipid efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Dec;24(12):2345–50.
12. Cserepes J, Szentpétery Z, Seres L, Ozvegy-Laczkı C, Langmann T, Schmitz G, et al. Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004 Jul 30;320(3):860–7.
13. Kerr ID, Haider AJ, Gelissen IC. The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty. *Br J Pharmacol.* 2011 Dec;164(7):1767–79.
14. Kusuhara H, Sugiyama Y. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch.* 2007 Feb;453(5):735–44.
15. Hegyi Z, Homolya L. Functional Cooperativity between ABCG4 and ABCG1 Isoforms. *PLoS ONE.* 2016;11(5):e0156516.
16. Ni Z, Bikadi Z, Rosenberg MF, Mao Q. Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr Drug Metab.* 2010 Sep;11(7):603–17.
17. Wang N, Yvan-Charvet L, Lütjohann D, Mulder M, Vanmierlo T, Kim T-W, et al. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *FASEB J.* 2008 Apr;22(4):1073–82.
18. Do TM, Noel-Hudson M-S, Ribes S, Besengez C, Smirnova M, Cisternino S, et al. ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid- $\beta$  peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis.* 2012;30(1):155–66.
19. Vaughan AM, Oram JF. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res.* 2006 Nov;47(11):2433–43.
20. Wang N, Lan D, Chen W, Matsuura F, Tall AR. ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004 Jun 29;101(26):9774–9.
21. Koshiba S, An R, Saito H, Wakabayashi K, Tamura A, Ishikawa T. Human ABC transporters ABCG2 (BCRP) and ABCG4. *Xenobiotica.* 2008 Jul;38(7–8):863–88.

22. Poirier J. Apolipoprotein E and cholesterol metabolism in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Trends Mol Med*. 2003 Mar;9(3):94–101.
23. Savellieff MG, Lee S, Liu Y, Lim MH. Untangling amyloid- $\beta$ , tau, and metals in Alzheimer's disease. *ACS Chem Biol*. 2013 May 17;8(5):856–65.
24. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci*. 2011;34:185–204.
25. Uehara Y, Yamada T, Baba Y, Miura S, Abe S, Kitajima K, et al. ATP-binding cassette transporter G4 is highly expressed in microglia in Alzheimer's brain. *Brain Res*. 2008 Jun 27;1217:239–46.
26. Sano O, Tsujita M, Shimizu Y, Kato R, Kobayashi A, Kioka N, et al. ABCG1 and ABCG4 Suppress  $\gamma$ -Secretase Activity and Amyloid  $\beta$  Production. *PLoS ONE*. 2016;11(5):e0155400.
27. Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem*. 2004 May;89(4):807–11.
28. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 2010 Dec 24;330(6012):1774.
29. Banks WA, Kumar VB, Farr SA, Nakaoka R, Robinson SM, Morley JE. Impairments in brain-to-blood transport of amyloid- $\beta$  and reabsorption of cerebrospinal fluid in an animal model of Alzheimer's disease are reversed by antisense directed against amyloid- $\beta$  protein precursor. *J Alzheimers Dis*. 2011;23(4):599–605.
30. Eisele YS. From soluble  $a\beta$  to progressive  $a\beta$  aggregation: could prion-like templated misfolding play a role? *Brain Pathol*. 2013 May;23(3):333–41.
31. Ramanathan A, Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic BV. Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: the role, regulation and restoration of LRP1. *Front Aging Neurosci*. 2015;7:136.
32. Erickson MA, Hansen K, Banks WA. Inflammation-induced dysfunction of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier: protection by the antioxidant N-acetylcysteine. *Brain Behav Immun*. 2012 Oct;26(7):1085–94.
33. Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Di Spiezio A, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid- $\beta$ (1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest*. 2016 Jan;126(1):123–36.
34. Luthi AJ, Lyssenko NN, Quach D, McMahon KM, Millar JS, Vickers KC, et al. Robust passive and active efflux of cellular cholesterol to a designer functional mimic of high density lipoprotein. *J Lipid Res*. 2015 May;56(5):972–85.
35. Lee J-Y, Kinch LN, Borek DM, Wang J, Wang J, Urbatsch IL, et al. Crystal structure of the human sterol transporter ABCG5/ABCG8. *Nature*. 2016 May 4;533(7604):561–4.
36. Davis IW, Leaver-Fay A, Chen VB, Block JN, Kapral GJ, Wang X, et al. MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res*. 2007 Jul;35(Web Server issue):W375-383.
37. Chen VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010 Jan;66(Pt 1):12–21.
38. Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res*. 2011 Jul;39(Web Server issue):W270-277.
39. Tovchigrechko A, Vakser IA. Development and testing of an automated approach to protein docking. *Proteins*. 2005 Aug 1;60(2):296–301.
40. Tovchigrechko A, Vakser IA. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jul 1;34(Web Server issue):W310-314.
41. Tarr PT, Edwards PA. ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J Lipid Res*. 2008 Jan;49(1):169–82.
42. Matsumoto K, Chiba Y, Fujihara R, Kubo H, Sakamoto H, Ueno M. Immunohistochemical analysis of transporters related to clearance of amyloid- $\beta$  peptides through blood-cerebrospinal fluid barrier in human brain. *Histochem Cell Biol*. 2015 Dec;144(6):597–611.

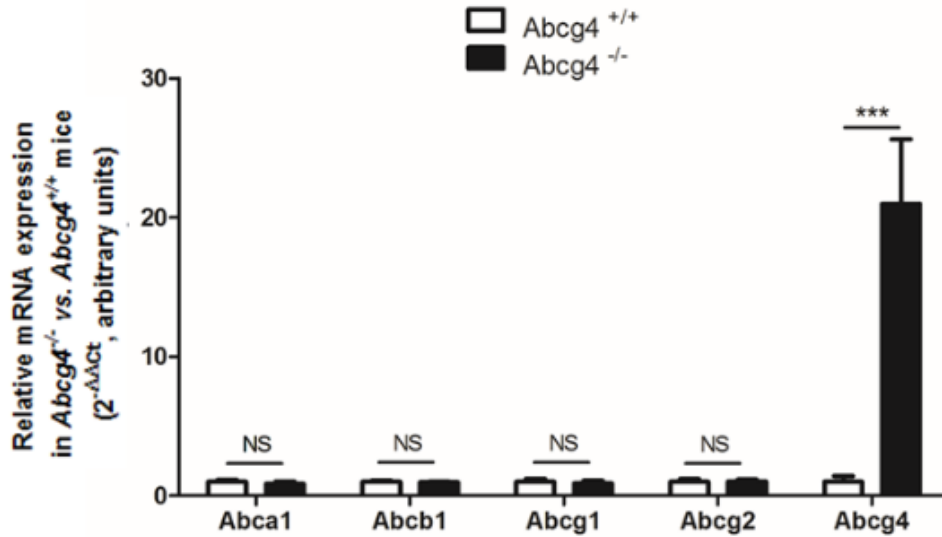
43. Do TM, Dodacki A, Alata W, Calon F, Nicolici S, Scherrmann J-M, et al. Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- $\beta$  Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD). *J Alzheimers Dis*. 2015;49(2):287–300.
44. Cisternino S, Rousselle 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 Jun;20(6):904–9.
45. Beaulieu E, Demeule M, Ghitescu L, Béliveau R. P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem J*. 1997 Sep 1;326 ( Pt 2):539–44.
46. Wang N, Ranalletta M, Matsuura F, Peng F, Tall AR. LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Jun;26(6):1310–6.
47. Engel T, Lorkowski S, Lueken A, Rust S, Schlüter B, Berger G, et al. The human ABCG4 gene is regulated by oxysterols and retinoids in monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 Oct 26;288(2):483–8.
48. Graham A. Mitochondrial regulation of macrophage cholesterol homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2015 Dec;89:982–92.
49. Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F, Scherrmann J-M. Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res*. 2004 May 1;64(9):3296–301.
50. Hoffmann K, Löscher W. Upregulation of brain expression of P-glycoprotein in MRP2-deficient TR(-) rats resembles seizure-induced up-regulation of this drug efflux transporter in normal rats. *Epilepsia*. 2007 Apr;48(4):631–45.
51. Do TM, Bedussi B, Chasseigneaux S, Dodacki A, Yapo C, Chacun H, et al. Oatp1a4 and an L-thyroxine-sensitive transporter mediate the mouse blood-brain barrier transport of amyloid- $\beta$  peptide. *J Alzheimers Dis*. 2013;36(3):555–61.
52. Cherian PT, Koikov LN, Wortman MD, Knittel JJ. Exploring the PI3K alpha and gamma binding sites with 2,6-disubstituted isonicotinic derivatives. *Bioorg Med Chem Lett*. 2009 Apr 15;19(8):2215–9.
53. Pahnke J, Langer O, Krohn M. Alzheimer's and ABC transporters--new opportunities for diagnostics and treatment. *Neurobiol Dis*. 2014 Dec;72 Pt A:54–60.
54. Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ, et al. beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem*. 2001 Feb;76(4):1121–8.
55. Bojanic DD, Tarr PT, Gale GD, Smith DJ, Bok D, Chen B, et al. Differential expression and function of ABCG1 and ABCG4 during development and aging. *J Lipid Res*. 2010 Jan;51(1):169–81.
56. Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue L-F, Beach TG, et al. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and A $\beta$  production. *Neurobiol Dis*. 2008 Mar;29(3):422–37.
57. Maulik M, Westaway D, Jhamandas JH, Kar S. Role of cholesterol in APP metabolism and its significance in Alzheimer's disease pathogenesis. *Mol Neurobiol*. 2013 Feb;47(1):37–63.
58. Wanamaker BL, Swiger KJ, Blumenthal RS, Martin SS. Cholesterol, statins, and dementia: what the cardiologist should know. *Clin Cardiol*. 2015 Apr;38(4):243–50.
59. Morgado I, Garvey M. Lipids in Amyloid- $\beta$  Processing, Aggregation, and Toxicity. *Adv Exp Med Biol*. 2015;855:67–94.
60. Canepa E, Borghi R, Viña J, Traverso N, Gambini J, Domenicotti C, et al. Cholesterol and amyloid- $\beta$ : evidence for a cross-talk between astrocytes and neuronal cells. *J Alzheimers Dis*. 2011;25(4):645–53.
61. Panchal M, Loeper J, Cossec J-C, Perruchini C, Lazar A, Pompon D, et al. Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. *J Lipid Res*. 2010 Mar;51(3):598–605.
62. Sharpe LJ, Wong J, Garner B, Halliday GM, Brown AJ. Is seladin-1 really a selective Alzheimer's disease indicator? *J Alzheimers Dis*. 2012;30(1):35–9.

63. Zerenturk EJ, Sharpe LJ, Ikonen E, Brown AJ. Desmosterol and DHCR24: unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis. *Prog Lipid Res.* 2013 Oct;52(4):666–80.
64. Vanmierlo T, Bloks VW, van Vark-van der Zee LC, Rutten K, Kerksiek A, Friedrichs S, et al. Alterations in brain cholesterol metabolism in the APPSLxPS1mut mouse, a model for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2010;19(1):117–27.
65. Wisniewski T, Newman K, Javitt NB. Alzheimer's disease: brain desmosterol levels. *J Alzheimers Dis.* 2013;33(3):881–8.
66. Takasato Y, Rapoport SI, Smith QR. An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol.* 1984 Sep;247(3 Pt 2):H484-493.
67. Dagenais C, Rousselle C, Pollack GM, Scherrmann JM. Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Feb;20(2):381–6.
68. Pieper U, Webb BM, Dong GQ, Schneidman-Duhovny D, Fan H, Kim SJ, et al. ModBase, a database of annotated comparative protein structure models and associated resources. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D336-346.

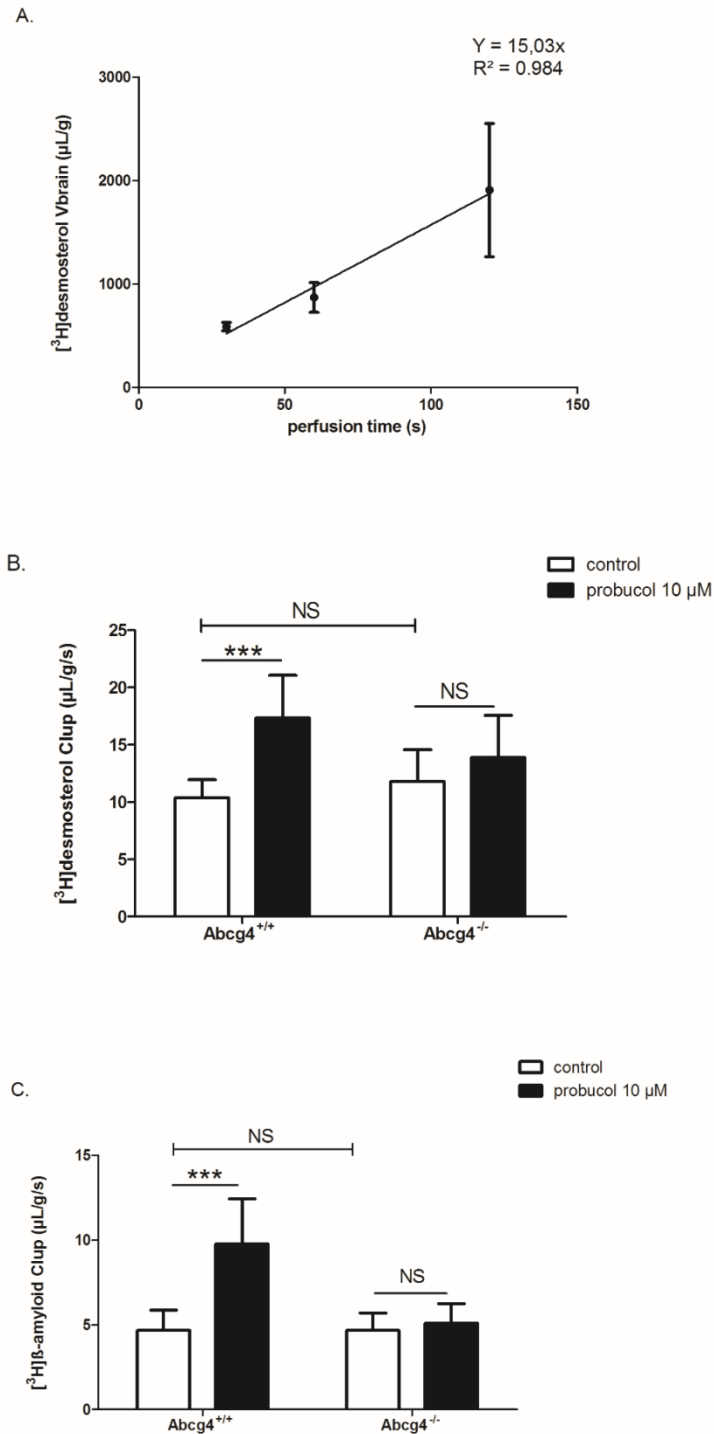


**Figure 1: Immunodetection of *Abcg4* in wild-type (WT) and *Abcg4*-KO mice:** *Abcg4* confocal imaging in the mouse brain cortex. Brain capillaries are identified by endothelial cell-specific Pgp labelling (magenta) and nuclei are counterstained by Topro3 (cyan). In the WT mouse (A) *Abcg4* staining (yellow) is localized to parenchymal cells (arrows) and endothelial cells of the capillaries (full arrowheads). In the *Abcg4*-KO mouse (B), localization of the mutated *Abcg4* is similar but shows an additional signal in the perinuclear region of endothelial cells (open arrowheads). Scale bar: 30  $\mu$ m.

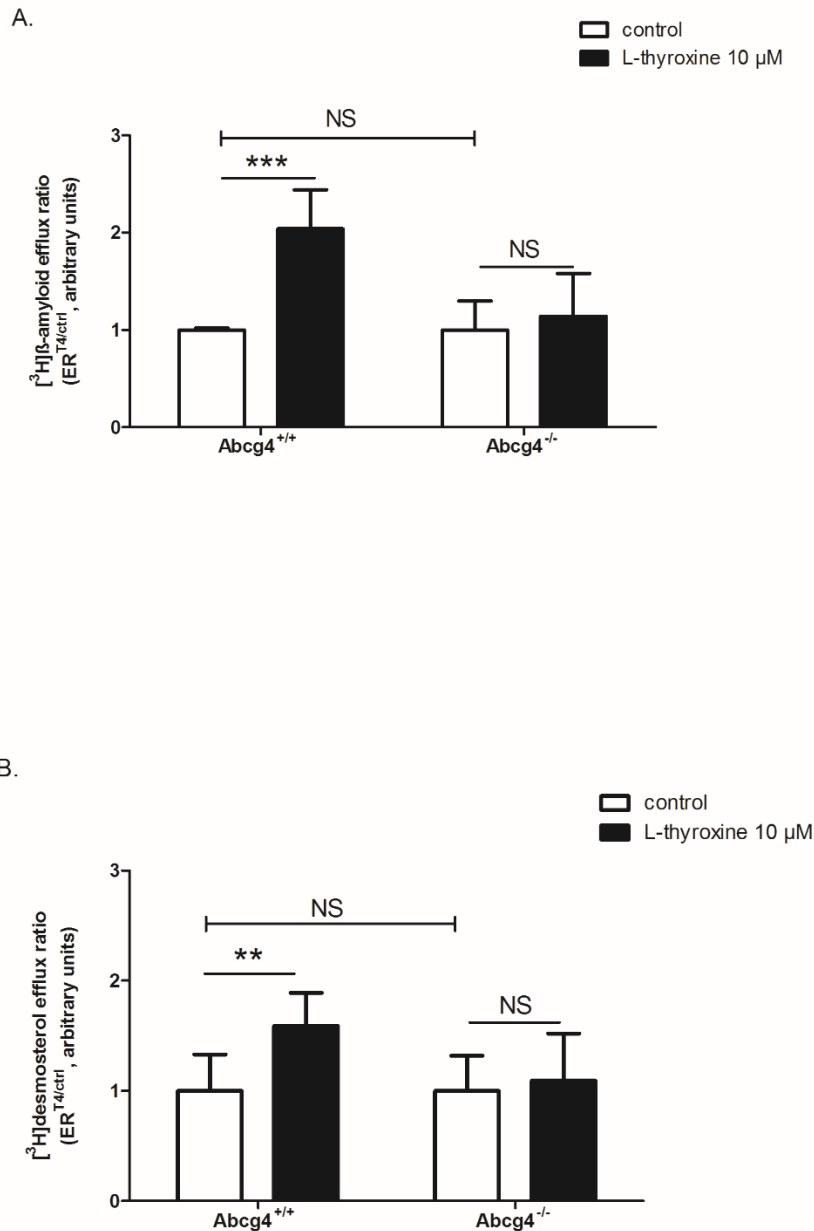




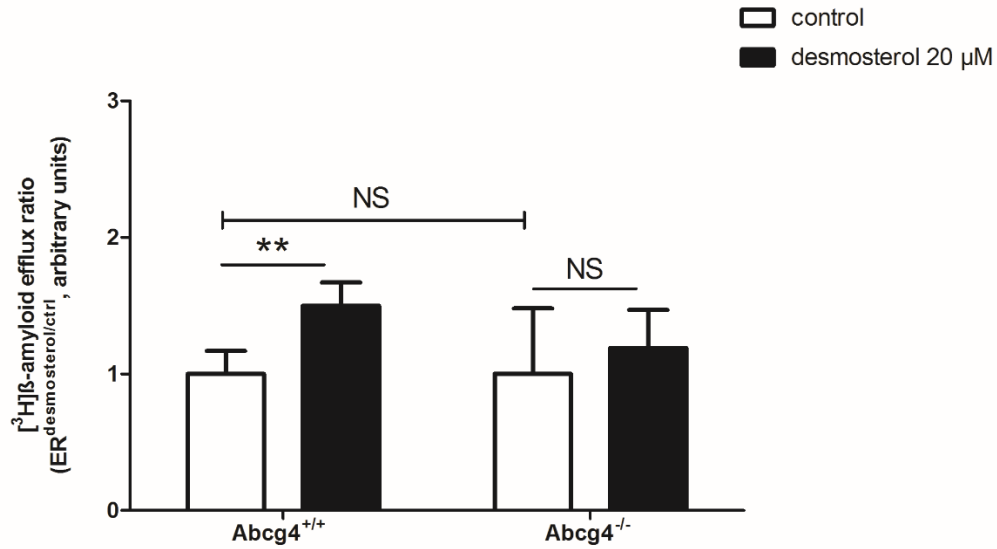
**Figure 2: mRNA quantification of several ABC transporters in wild-type (WT) and *Abcg4*-KO mice BBB:** mRNA levels of each gene were determined by qRT-PCR and normalized to those of *β-actin*. Data presented are comparison between WT and *Abcg4*-KO mice using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{KO} - \Delta Ct_{WT}$ ). Data are means  $\pm$  SD (n= 3 experiments). \*\*\* p<0.001, NS non-significant, Student's unpaired *t* test.



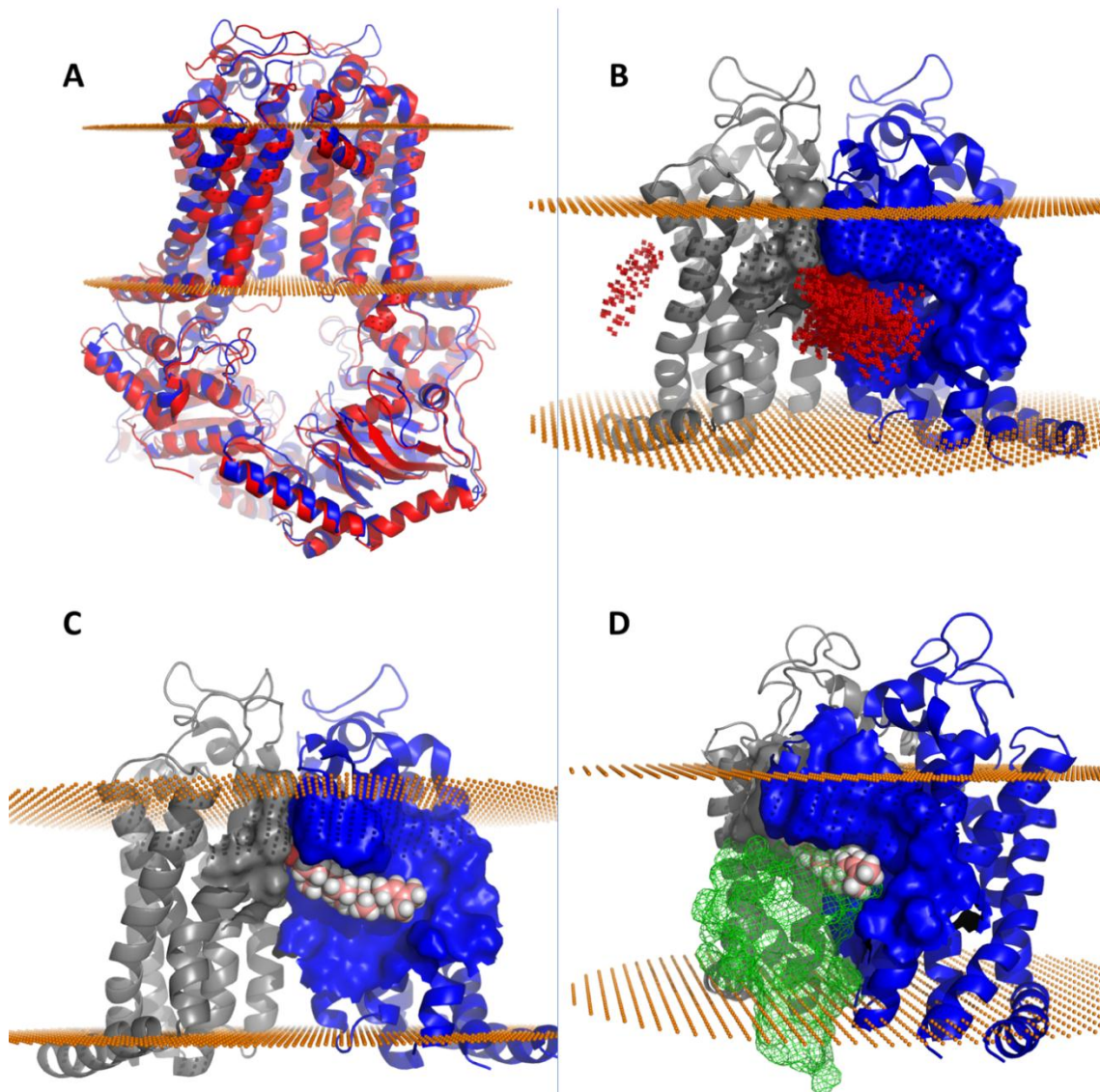
**Figure 3: Abcg4 function at the mouse BBB:** A] Time-course of the brain distribution volume ( $V_{\text{brain}}$ ,  $\mu\text{L/g}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]desmosterol in wild-type mice determined by *in situ* brain perfusion technique. B] Brain uptake clearance ( $\text{Cl}_{\text{up}}$ ,  $\mu\text{L/g/s}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]desmosterol in *Abcg4*<sup>+/+</sup> and *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice, measured by *in situ* brain perfusion technique in the absence (control) or presence of probucol (10  $\mu\text{M}$ ). C] Brain uptake clearance ( $\text{Cl}_{\text{up}}$ ,  $\mu\text{L/g/s}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  in *Abcg4*<sup>+/+</sup> and *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice, measured by *in situ* brain perfusion technique in the absence (control) or presence of probucol (10  $\mu\text{M}$ ). Data are means  $\pm$  SD of 5-9 mice. \*\*\*  $p < 0.001$ , NS non-significant, Student's unpaired *t* test.



**Figure 4: L-thyroxine (T<sub>4</sub>) inhibition of Abcg4-mediated efflux of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> and [<sup>3</sup>H]desmosterol at the BBB level:** A] Efflux ratio of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> obtained by dividing the brain uptake clearance (Cl<sub>up</sub>, μL/g/s) measured in the presence of T<sub>4</sub> over the Cl<sub>up</sub> measured in the absence (control) of T<sub>4</sub> (ER<sup>T4/ctrl</sup>) in *Abcg4*<sup>+/+</sup> and *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice. B] Efflux ratio of [<sup>3</sup>H]desmosterol obtained by dividing the Cl<sub>up</sub> measured in the presence of T<sub>4</sub> mice over the Cl<sub>up</sub> measured in the absence (control) of T<sub>4</sub> (ER<sup>T4/ctrl</sup>) in *Abcg4*<sup>+/+</sup> and *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice. Data are means ± SD of 5-9 mice. \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, NS non-significant, Student's unpaired *t* test.

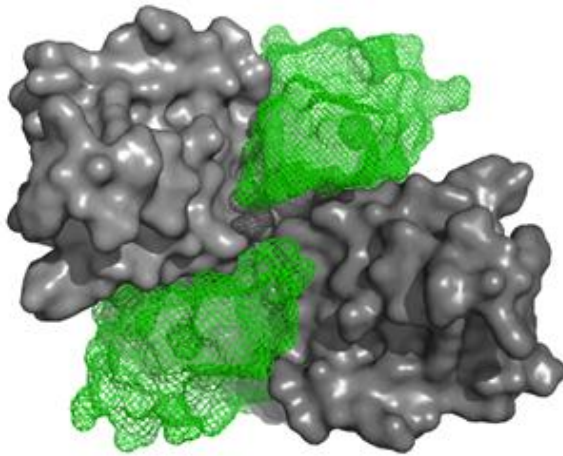


**Figure 5: *In vivo* interaction between [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> and desmosterol at the mouse BBB level:** Efflux ratio of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> obtained by dividing the brain uptake clearance (Cl<sub>up</sub>, μL/g/s) measured in the presence of desmosterol over the Cl<sub>up</sub> measured in the absence (control) of desmosterol (ER<sup>desmosterol/ctrl</sup>) in *Abcg4*<sup>+/+</sup> and *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice. Data are means ± SD of 5-9 mice. \* p<0.05, NS non-significant, Student's unpaired *t* test.

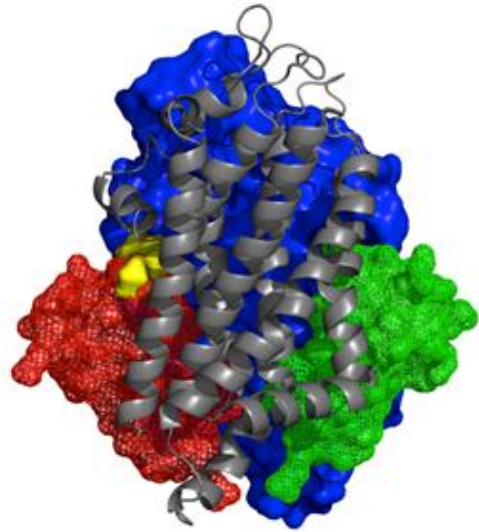


**Figure 6: Computed structural and binding features of the Abcg4 dimer model:** A] Mouse Abcg4 sequence was submitted to the ModBase modeling server which constructed an Abcg4 model (blue) after selecting the x-ray crystal structure of ABCG5/ABCG8 (red cartoon) as the template in an unbiased search. B] Docking of desmosterol across the entire transmembrane surface identified two putative desmosterol binding sites (red dots represent the placement of desmosterol after each docking run). The overwhelming majority of final binding modes for desmosterol on Abcg4 were located in the homologous sterol binding cleft found in ABCG5/ABCG8 suggesting conserved sterol binding domain is found in both dimers. C] Best predicted binding mode of desmosterol (pink and white spheres) in the cleft formed by Abcg4 dimers (gray and blue). D] Gray monomer rotated 90° away from the viewer along the axis of symmetry reveals competitive binding between desmosterol and Aβ (green mesh).

A.

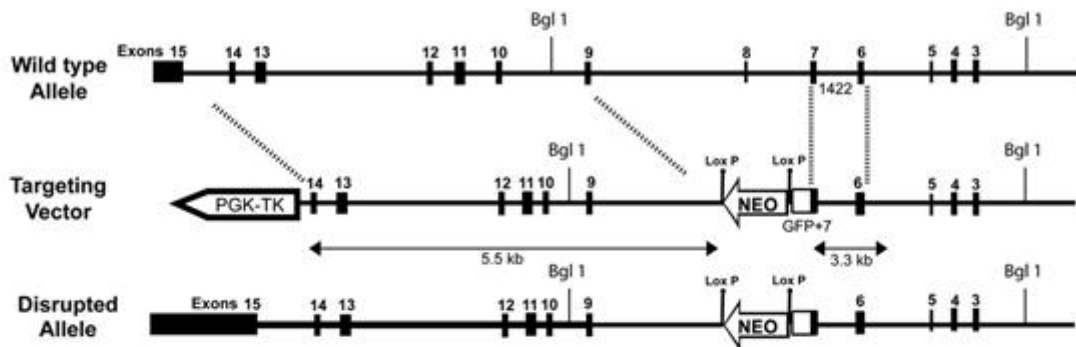


B.

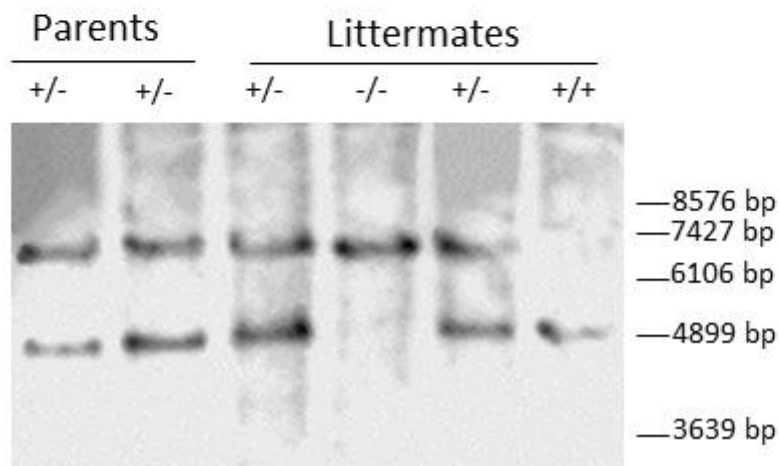


**Figure 7: Dual A $\beta$  binding sites in Abcg4:** A] The Abcg4 dimer is comprised of two monomers (gray surface) that form two nearly identical binding sites for A $\beta$  (green mesh). This view of the membrane-spanning domain from the intracellular aspect shows to A $\beta$  molecules (green mesh) occupying the binding clefts. B] The membrane-spanning domain viewed from the side shows the competitive binding mode of desmosterol (yellow surface) with A $\beta$  (red mesh) while another A $\beta$  molecule is present in the opposite binding cleft (green mesh). This configuration explains the observed preference for A $\beta$  (two sites) and inhibitory effect of sterols on A $\beta$  efflux.

## A *Abcg4* KO targeting



## B



**Figure 8: *Abcg4*-knockout mice line establishment:** Panel A depicts a cartoon of the *Abcg4* knockout targeting vector used for homologous recombination. The gene structure is not drawn to scale. Targeting was engineered to result in expression of a fusion protein encoding partial *Abcg4* fused to eGFP prior to the transmembrane domains. The neomycin gene cassette is indicated by Neo. The homologous targeting removes a significant portion of coding sequences in exon 7 and all of exon 8. The Bgl I sites are as shown. Panel B shows the validation of the homologous recombination by Southern blotting. DNA was digested using Bgl I and detected using a genomic fragment spanning exons 3-5 shown in panel A. The targeted fragment (6.4kb) is larger than the wildtype fragment (4.5kb). The molecular weight marker positions were estimated from the ethidium-stained gel.

**Table 1: Sequence of primers used for *Abcg4* mRNA sequencing.**

Name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplified exon
Abcg4-1	ACAGCCCTGGGACTGATGTC	TCTTCTCGGCCATGGTGCAA	6 to 9
Abcg4-2	TACCACAACCCCGCTGACTTC	GGCAACTAAGGCGGTGGCTA	8 to 13
eGFP-1	CAACAACCCGCCTGTCATGT	TGGCGGACTTGAAGAAGTCGT	6 to eGFP
eGFP-2	ACGACTTCTTCAAGTCCGCCA	TCGTCCATGCCGAGAGTGAT	eGFP

**Table 2: Sequence of primers used for qRT-PCR.**

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Length (bp)
<i>Abca1</i>	AGCTGGGAAGTCAACAACCTTTCA	GCCCATGTTCTGGTGTACTTCAT	120
<i>Abcb1</i>	AAGCGACTCCGATACATGGTTT	AGTGCTCCGGTGGTGTTTTTAGG	85
<i>Abcg1</i>	GCTGCCTCACCTCACTGTT	CTCTCGTCTGCCTTCATCCTTC	81
<i>Abcg2</i>	TGGCTGTCCTGGCTTCAGTAC	AGTGCTGTTGTCCGTTACATTGA	116
<i>Abcg4</i>	CGCTCTGCTGTGGACATCG	CTCGGCGACAGAACTTACCAG	119



## **Article 2**

### **“Expression and function of Abca2 in the mouse blood-brain barrier: involvement in the efflux of amyloid- $\beta$ peptide”**

Agnès Dodacki, Lucien Tchara, Shailendra B. Patel, Camille Taccola, Sophie Nicolic, Murielle Locchus, Jean-Michel Scherrmann, Marie-Claude Menet and Fanchon Bourasset.

#### **❖ Introduction**

Le transporteur ABCA2 est le second membre de la sous-famille A des protéines ABC (ATP-binding cassette), qui regroupe des transporteurs de lipides, dont ABCA1. ABCA2 est principalement exprimé dans le cerveau où il est impliqué dans le transport de lipides et également dans la myélinisation. Ce transporteur semble avoir pour substrat une molécule anticancéreuse, l'estramustine ainsi que le 17- $\beta$ -estradiol (E2). A la barrière hémato-encéphalique (BHE), il est le troisième transporteur ABC le plus exprimé, après ABCB1 et ABCG2, dans des microvaisseaux cérébraux isolés humains. Cependant, sa fonction à la BHE n'est pas encore connue. Nous avons suggéré qu'ABCA2 pourrait être impliqué dans l'efflux cérébral du peptide  $\beta$ -amyloïde (A $\beta$ ) à la BHE.

#### **❖ Objectifs**

Nos objectifs ont été d'une part de quantifier Abca2 et d'autre part de déterminer son implication dans l'efflux du peptide A $\beta$  à la BHE chez la Souris.

#### **❖ Méthodes**

L'expression d'Abca2 sur des microvaisseaux cérébraux isolés de souris sauvages a été étudiée par RT-qPCR et par protéomique quantitative absolue ciblée. L'implication d'Abca2 dans l'efflux du peptide A $\beta$  à la BHE a été étudiée en mesurant la clairance d'entrée cérébrale ( $Cl_{up}$ ,  $\mu\text{L/g/s}$ ) du peptide [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  par la technique de perfusion cérébrale *in situ*

(PCIS), en présence ou en absence d'E2 chez des souris sauvages ou déficientes en *Abcb1* et *Abcg2* (*Abcb1/Abcg2*<sup>-/-</sup>), *Abcg4* (*Abcg4*<sup>-/-</sup>) ou *Abca2* (*Abca2*<sup>-/-</sup>).

### ❖ **Résultats**

Nous avons montré qu'*Abca2* était exprimé à la BHE chez la souris. En utilisant la technique de PCIS, nous avons mis en évidence que E2 augmentait significativement la  $Cl_{up}$  du peptide [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub>, chez les souris sauvages, mais aussi chez les souris déficientes en *Abcb1/Abcg2* ou *Abcg4*. Aucun effet n'a été observé chez les souris déficientes en *Abca2*, suggérant qu'*Abca2* serait fonctionnel à la BHE chez la souris et aurait pour substrat le peptide Aβ et pour inhibiteur l'E2.

### ❖ **Conclusion**

Notre étude a permis de mettre en évidence, pour la première fois, qu'*Abca2* est exprimé et fonctionnel à la BHE chez la Souris. Nous avons montré que le peptide Aβ et l'E2 étaient respectivement substrat et inhibiteur d'*Abca2*. Ces résultats permettent de compléter la cartographie des transporteurs ABC présents et fonctionnels à la BHE et renforcent l'hypothèse de l'existence d'une collaboration entre différents transporteurs ABC pour assurer une clairance cérébrale efficace du peptide Aβ à travers la BHE. Cependant, la part jouée par chacun de ces transporteurs dans l'efflux cérébral d'Aβ reste à déterminer. Enfin, ABCA2 étant beaucoup plus fortement exprimé chez l'Homme que chez la Souris, nos résultats suggèrent un rôle important d'ABCA2 à la BHE humaine.

## **Expression and function of Abca2 in the mouse blood-brain barrier: involvement in the efflux of amyloid- $\beta$ peptide**

Agnès Dodacki<sup>1,2,3</sup>, Lucien Tchara<sup>1,2,3</sup>, Shailendra B. Patel<sup>4</sup>, Camille Taccola<sup>1,2,3</sup>, Sophie Nicolic<sup>1,2,3</sup>, Murielle Lochus<sup>1,2,3</sup>, Xavier Declèves<sup>1,2,3</sup>, Jean-Michel Scherrmann<sup>1,2,3</sup>, Marie-Claude Menet<sup>1,2,3</sup> and Fanchon Bourasset<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Variabilité de Réponse aux Psychotropes, INSERM, U1144, Paris, France

<sup>2</sup> Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, UMR-S 1144, Paris, France

<sup>3</sup> Université Paris Diderot, UMR-S 1144, Paris, France

<sup>4</sup> Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, University of Cincinnati, Cincinnati, OH, USA

### **Corresponding authors :**

\* To whom correspondence should be addressed:

Fanchon Bourasset, PharmD, PhD., Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

Tel: +33 1 53 73 98 59

E-mail: fanchon.bourasset@parisdescartes.fr

**ABBREVIATIONS:** A $\beta$ : amyloid- $\beta$  peptide, ABC: ATP-binding cassette, AD: Alzheimer's disease, APP: amyloid precursor gene, BBB: blood-brain barrier, BCEC: brain capillary endothelial cell, BCRP: breast cancer resistance protein, BSA: bovine serum albumin, Cl<sub>up</sub>: brain uptake clearance, Ct: cycle threshold, E2: 17- $\beta$ -estradiol, ISBP: *in situ* brain perfusion technique, KO: knockout, L-PGDS: lipocalin type prostaglandin D-synthetase L, P-gp: P-glycoprotein, qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction, SNP: single nucleotide polymorphisms, WT: wild-type

**ABSTRACT:**

ABCA2 is the second member of the A sub-family of the ATP-binding cassette (ABC) proteins family. It is expressed in the brain, and in particular in oligodendrocytes and lysosomes. Its BBB expression has been revealed in human brain microvessels as well as in human endothelial cells (hCMEC/D3). Like other ABCA transporters, ABCA2 is involved in brain lipids transport and in myelination process. Estramustine and 17- $\beta$ -estradiol (E2) are two potential substrates of ABCA2. However little is known about its function at the BBB level. We hypothesized that Abca2 could be involved in the BBB efflux of amyloid-beta peptide (A $\beta$ ). We first determined, by quantitative targeted absolute proteomics, the expression of Abca2, Abcb1 and Abcg2 protein in the brain microvessels isolated from wild-type C57Bl/6 mice. We show that the concentration of Abcb1, Abcg2 and Abca2 were equal to  $22.3 \pm 2.45$ ,  $4.6 \pm 0.39$  and  $0.45 \pm 0.05$  fmol/ $\mu$ g protein, respectively. Using the *in situ* brain perfusion technique, we showed that E2 significantly increased the brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ,  $\mu$ l/g/s) of [ $^3$ H]A $\beta_{1-40}$  in wild-type (x 5.2), *Abcb1/Abcg2*- (x 6.9) and *Abcg4*-deficient mice (x 5.2), but not in *Abca2*-deficient mice. These data suggest that E2 can inhibit the *Abca2*-mediated brain efflux of [ $^3$ H]-A $\beta_{1-40}$ . In conclusion, we evidenced, for the first time, the expression and function of *Abca2* in the mouse BBB, in which it is involved in the efflux of A $\beta$ .

**KEYWORDS:** ABCA2, amyloid- $\beta$  peptide, blood-brain barrier, 17- $\beta$ -estradiol, *in situ* brain perfusion technique

## INTRODUCTION

The ATP-binding cassette (ABC) transporters belong to a large superfamily of transmembrane proteins, which use the energy of ATP hydrolysis to ensure their function (1). These proteins are divided into 7 sub-families (A to G) according to their structural homology (2–4). The A sub-family includes lipid transporters, such as ABCA1 which mediates the cellular efflux of cholesterol to apolipoproteins (5–7). ABCA2 has been reported to be involved in multidrug resistance phenotype in several cancer cell lines (8–10). Moreover ABCA2 participates in the homeostasis and intracellular metabolism of lipids (9,11,12). ABCA2 is mostly expressed in central and peripheral nervous systems, in particular in oligodendrocytes and Schwann cells, assigning ABCA2 a role in myelination process (13–16). Moreover, ABCA2 protein was detected in cultured and isolated human brain capillary endothelial cells (BCECs) (17,18). The latter constitute, with basal membrane, pericytes and astrocyte end-feet, the blood-brain barrier (BBB), which is the major interface separating the brain from the blood (19,20). Both, the presence of tight junctions between BCECs and ABC transporters on BCECs strongly restrict the permeability of the BBB (21,22). P-glycoprotein (P-gp, ABCB1) and the breast cancer resistant protein (BCRP, ABCG2) are the most abundant ABC transporters expressed at the BBB. ABCA2 was the third ABC transporter quantitatively expressed in isolated human brain microvessels, behind ABCB1 (P-glycoprotein, P-gp) and ABCG2 (Breast cancer Resistance Protein, BCRP), whereas it was the most abundant ABC transporter expressed in cultured human endothelial cell line hCMEC/D3 (18). The functions of ABCB1 and ABCG2, but not ABCA2, have been deeply studied in the BBB and it is now established that these two proteins ensure the efflux of their substrates from the brain to the blood (23,24). ABCB1 and ABCG2 share a lot of common substrates and cooperation between these two carriers has been described in several studies (25). ABCA2 being the third ABC transporter expressed at the BBB level and being involved, like ABCB1 and ABCG2, in multidrug resistance phenotype (10,26), we hypothesized that ABCA2 could play an important role in the human BBB by effluxing its substrates from the brain to the blood. But to date, the efflux function of ABCA2 in the BBB has not been studied and the substrates of ABCA2 are not well identified. Several works have reported an increase of ABCA2 expression in cancer cell lines treated with anticancer drugs such as estramustine, mitoxantrone or imatinib, suggesting these drugs as potential substrates of ABCA2 (8,27–29). ABCA2 might also participate in the efflux of sterols, like does ABCA1, and of 17- $\beta$ -Estradiol (E2) (9–11,29).

These data strongly suggest that ABCA2 could have both, endogenous and exogenous substrates.

ABCA2 has been linked with the pathophysiology of Alzheimer's disease (AD) by evidencing single nucleotide polymorphisms (SNPs) of ABCA2 (30,31). Moreover it has been recently established that the overexpression of ABCA2 regulates transcription of the amyloid precursor protein gene (*APP*) (32). AD is partly due to a brain accumulation of the amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) which mainly results from a disturbance of its cerebral clearance (33–37). We and others have shown that *Abcb1*, *Abcg2* and *Abcg4* were involved in the BBB clearance of  $A\beta$  (38–40). ABCG4 was originally known to be a sterol transporter, and even if sterols and  $A\beta$  are structurally different, we have shown that  $A\beta$  could bind the ABCG4 sterol pocket (40). In addition, our *in vitro* data obtained in HEK-*Abcg4* transfected cells showed that *Abcg4* was most efficient to efflux  $A\beta$  than cholesterol (41), maybe because it could bind two  $A\beta$  molecules vs. only one molecule of sterol (40). The structure of ABCA2 shows the presence of a L-domain that corresponds to the signature of lipocalins, suggesting ABCA2 to bind with ligands of lipocalins, such as retinoids, steroids, sterols and, more generally, with small hydrophobic compounds (10,42). Interestingly, it has been evidenced that a lipocalin protein (lipocalin type prostaglandin D-synthase (L-PGDS)) was a chaperone protein for  $A\beta$ , able to transport  $A\beta$  in brain extracellular space and in cerebrospinal fluid, thus preventing  $A\beta$  aggregation (43–45). Moreover,  $A\beta$  bonded L-PGDS with high affinity (43). Similarly, it has been shown that E2 can bind with lipocalin-1 (46). This latter observation suggests that E2 could also bind the lipocalin domain of ABCA2, which might explain the ABCA2/ E2 interaction previously described (15,47). Taken together, these data led us to hypothesize that  $A\beta$  and E2 could compete for the lipocalin binding domain of ABCA2.

We aimed at measuring the gene and protein expression of *Abca2* in C57Bl/6 mice and studying whether *Abca2* might be an  $A\beta$  efflux transporter at the mouse BBB level.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals**

*In vivo* experiments were performed with 8-12 week-old mice. Wild-type C57BL/6 and FVB/N mice were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). The *Abcg4*-deficient (*Abcg4*<sup>-/-</sup>) mice were from a C57BL/6 background and were originally obtained from Dr. S. Patel (Medical college of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA) (40). The *Abcb1/Abcg2*-deficient

(*Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup>) mice were from a FVB/N genetic background and were originally obtained from the Dr. A. H. Schinkel laboratory (Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, The Netherlands). *Abca2*<sup>-/-</sup> mice were from Jackson Laboratories (B6.129-*Abca2*<sup>tm1Kdt</sup>/J) and were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain Nuelles, France). All mice were maintained and used in the animal house of the Faculty of Pharmacy of Paris (Animal Platform, CRP2 - UMS 3612 CNRS - US25 Inserm-IRD – Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France). The mice had free access to standard laboratory food and water and were kept on a 12 hours light-dark cycle at 22 ± 3°C. All studies involving animals and their care were performed according to the National Research Council's guide and complied with the Ethical rules of the European directive (210/63/EU) for experimentation with laboratory animals. All experimental protocols were approved by the ethics review committee of Paris Descartes University (approval n° 12-181/12-2012) the Animal Care and Use Committees of the Medical University of South Carolina, Charleston, SC, and the Medical College of Wisconsin and the IACUC for the Clement J. Zablocki VAMC, Milwaukee, WI.

## Reagents

BCA Protein Assay Kit, HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) and HEPES buffer were purchased from Thermo Scientific (Illkirch, France). The following reagents were acquired from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France): NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Tris-HCl, sucrose, Guanidine-HCl, dithiothreitol (DTT), iodoacetamide (IAA), bovine serum albumin (BSA), dextran (molecular weight 70.000) and urea. The Protease Inhibitor Cocktail Complete Mini<sup>®</sup> was provided by Roche (Bâle, Switzerland). Sequencing grade Modified Trypsin, Mass Spectrometry grade rLys-C and ProteaseMAX surfactant were acquired from Promega (Charbonnières-les-Bains, France). RIPA buffer was prepared with analytical grade reagents from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France): 150 mmol.L<sup>-1</sup> NaCl, 50 mmol.L<sup>-1</sup> Tris (pH 8.0), 1% (V/V) Triton X-100, 0.5% (W/V) sodium deoxycholate and 0.1% (V/V) SDS in water. Standard peptides for protein quantification were either purchased from Pepscan (Lelystad, The Netherlands) or synthesized in home in solid phase, using Fmoc chemistry. [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> (20 Ci/mmol) was purchased from Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany), [<sup>14</sup>C]sucrose (435 mCi/mmol), liquid scintillation cocktails Ultima Gold XR<sup>®</sup> and Solvable<sup>®</sup> were purchased from PerkinElmer

Life Sciences (Courtaboeuf, France). E2 was obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). All the other chemicals were commercial products of reagent grade.

### **Isolation of mice brain cortical microvessels**

Microvessels were isolated from mice brain cortex as previously described (48,49), maintaining samples at 4°C during the whole procedure. Non staved mice were anesthetized with the cocktail Ketamine/Xylazine (140/8 mg/kg) before being sacrificed decapitation. Brain cortexes were dissected, then transferred to a Becker containing buffer 1 (HBSS supplemented with 10% (V/V) HEPES), minced using scalpels and homogenized using a Potter–Thomas homogenizer (Kontes Glass, Vineland, NJ, USA). Samples were centrifuged in buffer 1 containing 17.5 % (W/V) dextran (64–76 kDa, buffer 2) and filtered through two successive nylon meshes (100 µm and 20 µm). The vessels retained in the 20 µm mesh were recovered in buffer 1 containing 1% (W/V) BSA (buffer 3) and washed twice with buffer 1 (BSA-free). Proteins were extracted with RIPA buffer, aided by ultrasounds homogenization using a BioRuptor (Diagenode, Seraing (Ougrée), Belgium) in high mode for 5 minutes. The lysate was centrifuged 15 minutes at 10 000 g and the supernatant was recovered. Each sample was constituted by a pool of brain microvessels from at least 10 mice, with a sex distribution of 1/3 males and 2/3 females.

### **Protein Digestion**

Protein samples were digested as previously reported (49). Briefly, denatured and alkylated proteins were precipitated using a methanol-chloroform-water system, resuspended using urea and Protease-Max detergent in Tris-HCl buffer (pH 8.5) and digested in tandem using Lys-C and Trypsin endoproteases. Stable isotope labeled (SIL) peptides were added after digestion for absolute quantification. Samples were dried using a centrifugal vacuum concentrator (Maxi-Dry Lyo, Heto Lab Equipment, Denmark), stored at -80°C and solubilized just before analysis in a mixture of 10% acetonitrile, 90% water plus 0.1% formic acid.

### **Absolute quantification of Abcb1, Abcg2 and Abca2**

The quantification was performed using the AQUA approach (50). The selected peptides for Abcb1 (IATEAIENFR), Abcg2 (SSLLDVLAAR) and Abca2 (LLFGPLPDLGK) had already been reported by Kamiie et al. (51). Proteotypic peptides were synthesized in light and heavy (SIL)



forms as standards. A dilution curve including the light peptides covering a range from 0.125 to 125 fmol  $\mu\text{L}^{-1}$  and the heavy peptides in constant concentration (15 fmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ) was analyzed in triplicate. The QuaSAR plugin (52) for Skyline was used to obtain the LOD and LOQ as well as the linear regression equation for each transition using the light-to-heavy peak area ratio. Peptide amounts were calculated as the mean of the concentration of 3 or 4 transitions obtained using the linear equation and transformed to fmol per  $\mu\text{g}$  of total protein in the sample.

### **Targeted LC-MS/MS analyses**

The targeted LC-MS/MS analyses were performed on an ACQUITY UPLC H-Class<sup>®</sup> System on line with a Waters Xevo<sup>®</sup> TQ-S mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). Peptides were injected into an ACQUITY UPLC BEH<sup>®</sup> C18 column (Peptide BEH<sup>®</sup> C18 Column, 300Å, 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 mm X 100 mm; Guyancourt, France) and eluted over a 24 minutes gradient where the mobile phase consisted in a mixture of water and acetonitrile (formic acid 0.1% (V/V)) with a flow rate of 0.3 mL.min<sup>-1</sup>. Eluted molecules underwent positive electrospray ionization with ion spray capillary voltage at 2.80 kV, drying gas flow-rate at 1000 L/h and under a temperature of 650°C. Analysis was performed in MRM mode using three to four transitions per peptide. Samples were injected randomly.

### **Brain microvessel enzymatic isolation, mRNA extraction and reverse transcription**

Mouse brains were collected and the olfactory bulbs, cerebellum, thalamus, white matter, hippocampus, striatum, meninges and large superficial blood vessels were removed. For each sample, six cortices were pooled and immersed in Hank's Balanced Salt Solution containing 1% Hepes (HBSS + 1% Hepes buffer) and centrifuged at 600 g for 5 min at 4°C. After discarding the supernatant, the pellet was homogenized in HBSS + 1% Hepes buffer containing Liberase DL (37,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and DNase I (20 U/mL) and incubated for 45 min at 37°C. The resulting homogenate was centrifuged at 600 g for 5 min at 4°C and the supernatant discarded. The pellet was homogenized in HBSS + 1% Hepes buffer containing 18 % bovine serum albumin (BSA) and centrifuged at 2000 g for 15 min at 4°C. After discarding the supernatant, the pellet was homogenized in HBSS + 1% Hepes buffer containing 1% BSA. The homogenate was passed through a 100  $\mu\text{m}$  mesh cell strainer then through a 10  $\mu\text{m}$  mesh nylon filter. The fraction retained on the 10  $\mu\text{m}$  mesh nylon filter was collected, suspended in HBSS + 1% Hepes buffer containing 1% BSA and centrifuged at 600 g

for 5 min at 4°C. The pellet containing the brain microvessels was washed in HBSS + 1% HEPES buffer and centrifuged again at 600 g for 5 min at 4°C. The supernatant was discarded; the pellets were resuspended in RLT buffer containing  $\beta$ -mercaptoethanol and stored at -80°C.

Total RNA was extracted from the microvessel samples using RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase I to remove genomic DNA. For each sample, 350 ng of extracted RNA were converted to cDNA using SuperScript® II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and stored at -80°C.

### Quantitative RT-PCR

The mRNA levels of ABC transporter genes (*Abca2*, *Abcb1* and *Abcg2*) were determined in WT mice by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) using Power SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) on an ABI Prism 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems). All the primers used [Table 1] were tested upstream on positive controls using SYBR Green fluorescence detection. The expression levels of all the transcripts were normalized to the expression levels of the housekeeping gene  $\beta$ -actin in the same tissue. The comparative Ct method with the formula  $2^{-\Delta Ct}$  (where  $\Delta Ct = Ct_{\text{gene}} - Ct_{\beta\text{-actin}}$ ) was used to calculate the relative expression of each gene.

**Table 1: Sequence of primers used for qRT-PCR.**

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Length (bp)
<i>Abca2</i>	ACCAGCAACCCCAAATCCT	ACCTGGGCGTAGTGTGTAACG	112
<i>Abcb1</i>	AAGCGACTCCGATACATGGTTT	AGTGCTCCGGTGGTGTITTTTAGG	85
<i>Abcg2</i>	TGGCTGTCCTGGCTTCAGTAC	AGTGCTGTTGTCCGTTACATTGA	116

### *In situ* brain perfusion technique

The *in situ* brain perfusion technique (ISBP) was developed to study drug transport processes occurring at the luminal side of the BCECs(53,54). This method can be used to measure transport parameters, including the distribution volume and the brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ) of a target molecule over very short periods (30-120 s). One of the advantages of this technique is the ability to administer inhibitors or to use transporter deficient mice, in order

to study the role of transporters at the BBB. If the  $Cl_{up}$  increases in the presence of a transporter inhibitor or when a carrier is not expressed, we can conclude that the transporter plays a role in the efflux of the target molecule at the BBB.

#### Surgical procedures and Perfusion

Mice were anesthetized by intra-peritoneal injection of a mixture of ketamine and xylazine at 140:8 mg/kg. The right common carotid artery was ligated on the heart side and the right external carotid artery was ligated at the level of the bifurcation. A catheter was inserted into the right common carotid artery. The perfusion liquid was contained in a syringe placed in an infusion pump and connected to the catheter. Before the perfusion, the thorax of the animal was opened, the heart was removed and perfusion started immediately at flow of 2.5 mL/min. The perfusion fluid was Krebs bicarbonate-buffered physiological saline (128 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.2 mM KCl, 2.4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub> and 9 mM D-glucose). The solution was gassed with 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> to bring the pH to 7.40 and warmed to 37°C in water bath. Each mouse was perfused for 60 s with [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> (0.2 μCi/mL). [<sup>14</sup>C]sucrose was used as a vascular marker of the physical integrity of the BBB and co-perfused with the tritiated substrate. The brain uptake of tritiated tracers was also measured in the presence of unlabelled substrate, βestradiol 100 μM, dissolved in DMSO (<0.5% in final perfusion fluid). The experiment was terminated by decapitating the mouse. The right cerebral hemisphere and aliquots of the perfusion fluid were sampled in tared vials, weighted, digested in 2 mL of Solvable<sup>®</sup> solubilizer (PerkinElmer) at 50°C and mixed with 9 mL of Ultima Gold XR<sup>®</sup> scintillation cocktail (PerkinElmer). Labeled compounds were counted on a Tri-Carb<sup>®</sup> (PerkinElmer) counter with the appropriate dual (<sup>14</sup>C/<sup>3</sup>H) quenching curves and standards to measure disintegration per minute (dpm) in samples.

#### Calculation of the BBB transport parameters

All the calculations were done as described previously(54). The brain vascular volume of each animal ( $V_{vasc}$ , μL/g) was estimated using the [<sup>14</sup>C]sucrose distribution volume, which does not measurably cross the BBB during short perfusions, by dividing the amount of [<sup>14</sup>C]sucrose (dpm/g) in the right brain hemisphere by the concentration of [<sup>14</sup>C]sucrose in the perfusion fluid (dpm/μL). All the values were under 20 μL/g, indicating that the BBB was not altered during these experiments. The brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ , μL/g) is the ratio between the apparent tissue distribution volume ( $V_{brain}$ , μL/g) of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> and the perfusion

time (s). The  $V_{\text{brain}}$  was calculated from the amount of radioactivity in the right brain hemisphere using the following equation:

$$V_{\text{brain}} = X_{\text{brain}} / C_{\text{perf}}$$

where  $X_{\text{brain}}$  (dpm/g) is the calculated amount of tritiated tracer in the right cerebral parenchyma and  $C_{\text{perf}}$  (dpm/ $\mu\text{L}$ ) is the concentration of tritiated tracer in the perfusion fluid.

$X_{\text{brain}}$  is obtained by this equation:

$$X_{\text{brain}} = X_{\text{tot}} - (V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}})$$

where  $X_{\text{tot}}$  (dpm/g) is the total amount of tritiated tracer measured in the brain tissue sample (vascular and extravascular).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using R software<sup>®</sup>. Results are expressed as means  $\pm$  SD. The Student's  $t$  test was used to compare samples, when appropriate. Differences were considered to be statistically significant when  $*p < 0.05$  or  $\Delta p < 0.05$ .

## RESULTS

### mRNA and protein expression of *Abca2*, *Abcb1* and *Abcg2* in WT mouse brain microvessels

We measured by qRT-PCR the relative mRNA amount of *Abca2*, *Abcb1* and *Abcg2* in the brain microvessels of WT mice. As shown in Table 1, *Abca2* was detected in our samples but at a much lower concentration than *Abcb1* and *Abcg2*.

The protein expression level of *Abcb1*, *Abcg2* and *Abca2* were evaluated by quantitative targeted absolute proteomics in brain microvessels which were isolated from WT mouse brain. We observed the same expression profile than that for transcripts. Among those three transporters, *Abcb1* was the most abundant transporter in the brain microvessels ( $22,30 \pm 2,45$  fmol/ $\mu\text{g}$  protein), followed by *Abcg2* ( $4,60 \pm 0,39$  fmol/ $\mu\text{g}$  protein) and *Abca2* ( $0,45 \pm 0,05$  fmol/ $\mu\text{g}$  protein) [Table 2].

### Effect of E2 in the brain uptake clearance of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> in WT (C57Bl/6 and FVB), *Abcb1/Abcg2*<sup>-</sup>, *Abcg4*<sup>-</sup> and *Abca2*-KO mice

We first measured the  $Cl_{\text{up}}$  of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> in the presence or absence of E2 in WT (FVB) and *Abcb1/Abcg2*-KO mice. The addition of E2 led to a significant 3.2- and 6.9-fold increase of the [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub>  $Cl_{\text{up}}$  in WT and *Abcb1/Abcg2*-KO mice, respectively [Fig. 1A], showing that the

E2-sensitive transporter was neither *Abcb1* nor *Abcg2*. Moreover, the  $Cl_{up}$  of  $A\beta$  obtained in the presence of E2 was significantly 1.9-fold higher in *Abcb1/Abcg2*-KO mice compared with WT (FVB) [Fig 1A]. As *Abcg4* is an  $A\beta$  transporter (41) and as E2 was suggested to interact with *Abca2*, we tested whether this E2-mediated inhibition was dependent from *Abcg4* and/or *Abca2*. Thus, we measured the  $Cl_{up}$  of [ $^3H$ ] $A\beta_{1-40}$  in the presence or absence of E2 in WT (C57BL/6), *Abcg4*-KO and *Abca2*-KO mice. Adding E2 to the perfusion buffer significantly increased the  $Cl_{up}$  of [ $^3H$ ]- $A\beta_{1-40}$  in WT (C57Bl/6) mice and *Abcg4*-KO mice (5.2-fold in both cases) but not in *Abca2*-KO mice [Fig. 1B]. These results evidence that *Abca2* is involved in the efflux of [ $^3H$ ] $A\beta_{1-40}$  at the mouse BBB level.

## DISCUSSION

ABCA2 was first detected in human brain microvessels and in human endothelial cells hCMEC/D3, in which it was quantitatively the third and the first ABC transporter expressed, respectively (17,18). In human brain microvessels, ABCA2 was 2- and 3-fold less expressed than ABCB1 and ABCG2, respectively (17). These data stressed the potential role that ABCA2 might have in the human BBB. However, the BBB function of ABCA2 was unknown and, to our knowledge, *Abca2* amounts were found to be under the limit of detection in ddY (Deutschland, Denken, and Yoken) and FVB mice (47,55), suggesting a weak or no expression of *Abca2* in mouse BBB and thus, a strong interspecies difference. Though, *Abca2* mRNA was evidenced in rat and human BBB cell lines (56) as well as in brain microvessels isolated from human, rat, mouse (CD-1), pig and cow (57). These discrepancies might have several explanations, including lack of mRNA translation, mouse strain differences, different specificity of the proteomic method used to quantify *Abca2* or different microvessels sample qualities. Our data clearly demonstrate that *Abca2* mRNA and protein were both detected in isolated C57Bl/6 mouse brain microvessels. The amount of *Abca2* in brain microvessels of C57Bl/6 mice was approximately 5-fold lower than that reported in human (17). In addition, the relative amount of ABCA2 vs. ABCB1 and ABCG2 were also lower in mice than in human: the ratio ABCG2/ABCA2 was at around 3 in human and 10 in mice, whereas the ratio ABCB1/ABCA2 was at around 2 in human and 50 in mice. These discrepancies might be due to the higher relative expression of ABCG2 compared to ABCB1 in human compared to mice (55). Nevertheless, our data demonstrate that C57Bl/6 mice express *Abca2* in their isolated brain microvessels, and thus could be relevant animal model to study the BBB

function of *Abca2*. We evaluated the efflux function of *Abca2* at the BBB level by using the ISBP technique which allows for studying the initial transport mechanisms occurring at the luminal side of the BCECs (53,54,58). Our data reveal that the co-perfusion of E2 with [<sup>3</sup>H]-A $\beta$ <sub>1-40</sub> leads to a significant increase of its  $Cl_{up}$  in WT (C57Bl/6 and FVB), *Abcb1/Abcg2*- and *Abcg4*-KO mice but not in *Abca2*-KO mice, indicating that E2 has specifically inhibited the *Abca2*-mediated efflux of A $\beta$  through the BBB. Thus our data evidence, for the first time, an efflux function of *Abca2* at the luminal side of the mouse BCECs by effluxing A $\beta$  from the brain to the blood. In addition, our data reveal a direct interaction between E2 and A $\beta$ , in agreement with our hypothesis of competition between E2 and A $\beta$  at the *Abca2* lipocalin binding site level. E2 is an estrogen produced from cholesterol metabolism. Strong correlations between cholesterol and A $\beta$  have been described but the exact mechanisms of this relationship are still not well understood (59–61). We have recently shown that desmosterol, a precursor of cholesterol could inhibit the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> mediated by *Abcg4* (40). Taken together, these data support the hypothesis of a direct ABC transporters-mediated interaction between cholesterol precursors and/or metabolites with A $\beta$ , at the BBB level.

Moreover, our results demonstrate that the contribution of *Abca2* in the mouse BBB efflux of A $\beta$  seems to be higher than those of other ABC transporters also involved in this BBB efflux, *i.e.* *Abcb1*, *Abcg2* and *Abcg4* (37,38). Indeed, the *Abca2* efflux ratio calculated by dividing the  $Cl_{up}$  obtained with E2 over the  $Cl_{up}$  obtained without E2 ( $Cl_{up}^{E2} / Cl_{up}^{ctrl}$ ) was equal to 5.2 in C57Bl/6 WT mice, whereas those of *Abcg2* and *Abcg4*, were 1.8 (in FVB mice) and 2.3 (in C57Bl/6 mice), respectively (40,41). These data show that *Abca2* might be a major efflux transporter of A $\beta$  in the mouse BBB. However, further studies are needed to confirm the part of each transporter in the mouse BBB of A $\beta$ . Knowing that ABCA2 is 5-fold more expressed in human microvessels than in C57Bl/6 mice, these data highlight the potential importance of this transporter in the human BBB efflux of A $\beta$  and more generally, in the efflux processes at the human BBB.

Taken in a whole, these data suggest the existence of cooperation between several ABC transporters to ensure a proper brain-to-blood efflux of A $\beta$  through the BBB, in mouse. Such cooperation has already been described for *Abcb1* and *Abcg2* in order to ensure the efflux of their common substrate, even if one of these transporters was lacking (25,62–64). Agarwal et al. showed that, in the case of dual substrate of both *Abcb1* and *Abcg2*, the transporter

that play the major role in its BBB efflux is not systematically the most abundant one but the transporter for which the substrate has the higher affinity (25), suggesting that the affinity of A $\beta$  for Abca2 could be higher than that for other ABC transporters. In addition, Agarwal et al. showed that the chemically and/or genetically inhibition of the major transporter can reveal the involvement of the other one (25). In our work, we found that the cooperation between Abcb1, Abcg2, Abcg4 and Abca2 led in identical [ $^3$ H]A $\beta_{1-40}$  Cl<sub>up</sub> in WT (FVB) and *Abcb1/Abcg2*-KO mice as well as in WT (C57Bl/6) and *Abcg4*-KO mice. This result means that the lack of one or two transporters was compensated by the other ones, resulting in similar uptake clearances of A $\beta$ . Interestingly, our data show that the Cl<sub>up</sub> of A $\beta$  obtained in the presence of E2 was significantly 1.9-fold higher in *Abcb1/Abcg2*-KO mice than in WT (FVB). Two hypotheses might explain this result. The first would be that the E2-mediated inhibition of Abca2 has allowed for evidencing the lack of Abcb1/Abcg2-mediated efflux of A $\beta$  in *Abcb1/Abcg2*-KO mice. Thus, the ~7-fold enhanced Cl<sub>up</sub> of [ $^3$ H]-A $\beta_{1-40}$  obtained with E2 in these mice might correspond to the additional lack of efflux mediated by Abca2 (5.2) and Abcb1/Abcg2 (1.9). The second hypothesis would be that the E2-sensitive transporter might be overexpressed in *Abcb1/Abcg2*-KO mice compared to WT mice. We already showed such compensations in *Abcb1/Abcg2*-KO mice that overexpressed Abcg4 (41). Further studies are needed to elucidate this question.

In conclusion, we evidenced, for the first time that Abca2 is expressed in the mouse brain microvessels. This result allows completing the cartography of functional ABC transporters expressed in the mouse brain microvessels. We evidenced that Abca2 was an efficient efflux transporter at the mouse BBB level and we identified A $\beta$  as substrate and E2 as inhibitor of Abca2. Then, our results strongly support the hypothesis that several ABC transporters cooperate each other in the brain-to-blood efflux of A $\beta$  through the BBB. ABCA2 being more expressed in human than in mice microvessels, our data highlight the potential role of Abca2 in the BBB transport processes as well as in AD and encourage further studies to identify new substrates/inhibitors as well as Abca2 regulation pathways which could become new targets in AD.

### **Acknowledgements**

We thank the Animal Platform, CRP2 - UMS 3612 CNRS - US25 Inserm-IRD – Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France.

## REFERENCES

1. Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol.* 7 juin 2016;23(6):487-93.
2. Tachikawa M, Watanabe M, Hori S, Fukaya M, Ohtsuki S, Asashima T, et al. Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult mouse brain. *J Neurochem.* oct 2005;95(1):294-304.
3. Matsuo M. ATP-binding cassette proteins involved in glucose and lipid homeostasis. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010;74(5):899-907.
4. Theodoulou FL, Kerr ID. ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem Soc Trans.* oct 2015;43(5):1033-40.
5. Kaminski WE, Piehler A, Wenzel JJ. ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim Biophys Acta.* mai 2006;1762(5):510-24.
6. Piehler AP, Ozcürümez M, Kaminski WE. A-Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration. *Front Psychiatry.* 2012;3:17.
7. Davis W. The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) regulates esterification of plasma membrane cholesterol by modulation of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta.* janv 2014;1841(1):168-79.
8. Laing NM, Belinsky MG, Kruh GD, Bell DW, Boyd JT, Barone L, et al. Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 1 avr 1998;58(7):1332-7.
9. Davis W, Boyd JT, Ile KE, Tew KD. Human ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) positively regulates low-density lipoprotein receptor expression and negatively regulates cholesterol esterification in Chinese hamster ovary cells. *Biochim Biophys Acta.* 5 juill 2004;1683(1-3):89-100.
10. Mack JT, Brown CB, Tew KD. ABCA2 as a therapeutic target in cancer and nervous system disorders. *Expert Opin Ther Targets.* avr 2008;12(4):491-504.
11. Kaminski WE, Piehler A, Püllmann K, Porsch-Ozcürümez M, Duong C, Bared GM, et al. Complete coding sequence, promoter region, and genomic structure of the human ABCA2 gene and evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 16 févr 2001;281(1):249-58.
12. Sakai H, Tanaka Y, Tanaka M, Ban N, Yamada K, Matsumura Y, et al. ABCA2 deficiency results in abnormal sphingolipid metabolism in mouse brain. *J Biol Chem.* 6 juill 2007;282(27):19692-9.
13. Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics.* 1 mai 1994;21(1):150-9.
14. Kim WS, Guillemain GJ, Glaros EN, Lim CK, Garner B. Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *Neuroreport.* 26 juin 2006;17(9):891-6.
15. Saito T, Yamada K, Wang Y, Tanaka Y, Ohtomo K, Ishikawa K, et al. Expression of ABCA2 protein in both non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells in the rodent peripheral nerve. *Neurosci Lett.* 27 févr 2007;414(1):35-40.
16. Mack JT, Beljanski V, Soulika AM, Townsend DM, Brown CB, Davis W, et al. « Skittish » Abca2 knockout mice display tremor, hyperactivity, and abnormal myelin ultrastructure in the central nervous system. *Mol Cell Biol.* janv 2007;27(1):44-53.
17. 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.
18. 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.
19. Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inherit Metab Dis.* mai 2013;36(3):437-49.



20. Blanchette M, Daneman R. Formation and maintenance of the BBB. *Mech Dev.* nov 2015;138 Pt 1:8-16.
21. Cecchelli R, Berezowski V, Lundquist S, Culot M, Renftel M, Dehouck M-P, et al. Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* août 2007;6(8):650-61.
22. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* janv 2010;37(1):13-25.
23. Strazielle N, Ghersi-Egea J-F. Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain. *Front Neurosci.* 2015;9:21.
24. Mahringer A, Fricker G. ABC transporters at the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* mai 2016;12(5):499-508.
25. Agarwal S, Elmquist WF. Insight into the cooperation of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) at the blood-brain barrier: a case study examining sorafenib efflux clearance. *Mol Pharm.* 5 mars 2012;9(3):678-84.
26. Ile KE, Davis W, Boyd JT, Soulika AM, Tew KD. Identification of a novel first exon of the human ABCA2 transporter gene encoding a unique N-terminus. *Biochim Biophys Acta.* 16 avr 2004;1678(1):22-32.
27. Boonstra R, Timmer-Bosscha H, van Echten-Arends J, van der Kolk DM, van den Berg A, de Jong B, et al. Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation. *Br J Cancer.* 14 juin 2004;90(12):2411-7.
28. Efferth T, Gillet J-P, Sauerbrey A, Zintl F, Bertholet V, de Longueville F, et al. Expression profiling of ATP-binding cassette transporters in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol Cancer Ther.* août 2006;5(8):1986-94.
29. Mack JT, Townsend DM, Beljanski V, Tew KD. The ABCA2 transporter: intracellular roles in trafficking and metabolism of LDL-derived cholesterol and sterol-related compounds. *Curr Drug Metab.* janv 2007;8(1):47-57.
30. Macé S, Cousin E, Ricard S, Génin E, Spanakis E, Lafargue-Soubigou C, et al. ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* févr 2005;18(1):119-25.
31. Wollmer MA, Kapaki E, Hersberger M, Muntwyler J, Brunner F, Tsolaki M, et al. Ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 5 juill 2006;141B(5):534-6.
32. Davis W. The ATP-Binding Cassette Transporter-2 (ABCA2) Overexpression Modulates Sphingosine Levels and Transcription of the Amyloid Precursor Protein (APP) Gene. *Curr Alzheimer Res.* 2015;12(9):847-59.
33. Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem.* mai 2004;89(4):807-11.
34. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science.* 24 déc 2010;330(6012):1774.
35. Banks WA, Kumar VB, Farr SA, Nakaoka R, Robinson SM, Morley JE. Impairments in brain-to-blood transport of amyloid- $\beta$  and reabsorption of cerebrospinal fluid in an animal model of Alzheimer's disease are reversed by antisense directed against amyloid- $\beta$  protein precursor. *J Alzheimers Dis.* 2011;23(4):599-605.
36. Eisele YS. From soluble  $a\beta$  to progressive  $a\beta$  aggregation: could prion-like templated misfolding play a role? *Brain Pathol.* mai 2013;23(3):333-41.
37. Ramanathan A, Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic BV. Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: the role, regulation and restoration of LRP1. *Front Aging Neurosci.* 2015;7:136.
38. Abuznait AH, Kaddoumi A. Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci.* 21 nov 2012;3(11):820-31.
39. Pahnke J, Langer O, Krohn M. Alzheimer's and ABC transporters--new opportunities for diagnostics and treatment. *Neurobiol Dis.* déc 2014;72 Pt A:54-60.

40. Dodacki A, Wortman M, Saubaméa B, Chasseigneaux S, Nicolic S, Lochus M, et al. Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: role in Alzheimer's disease. in submission. 2016;
41. Do TM, Bourasset F. ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid- $\beta$  peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis.* 2012;30(1):155-66.
42. Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, Merched A, Visvikis S, Siest G, et al. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J Neurochem.* oct 1998;71(4):1643-50.
43. Kumasaka T, Aritake K, Ago H, Irikura D, Tsurumura T, Yamamoto M, et al. Structural basis of the catalytic mechanism operating in open-closed conformers of lipocalin type prostaglandin D synthase. *J Biol Chem.* 14 août 2009;284(33):22344-52.
44. Kanekiyo T, Ban T, Aritake K, Huang Z-L, Qu W-M, Okazaki I, et al. Lipocalin-type prostaglandin D synthase/beta-trace is a major amyloid beta-chaperone in human cerebrospinal fluid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 10 avr 2007;104(15):6412-7.
45. Hansson SF, Andréasson U, Wall M, Skoog I, Andreasen N, Wallin A, et al. Reduced levels of amyloid-beta-binding proteins in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis.* 2009;16(2):389-97.
46. Crow JM, Nelson JD, Remington SG. Human lipocalin-1 association with 3H-testosterone and 3H-estradiol. *Curr Eye Res.* déc 2009;34(12):1042-9.
47. 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.* juin 2012;40(6):1164-9.
48. Yousif S, Marie-Claire C, Roux F, Scherrmann J-M, Declèves X. Expression of drug transporters at the blood-brain barrier using an optimized isolated rat brain microvessel strategy. *Brain research.* 23 févr 2007;1134(1):1-11.
49. Chaves C, Gómez-Zepeda D, Auvity S, Menet M-C, Crété D, Labat L, et al. Effect of Subchronic Intravenous Morphine Infusion and Naloxone-Precipitated Morphine Withdrawal on P-gp and Bcrp at the Rat Blood-Brain Barrier. *J Pharm Sci.* janv 2016;105(1):350-8.
50. Kirkpatrick DS, Gerber SA, Gygi SP. The absolute quantification strategy: a general procedure for the quantification of proteins and post-translational modifications. *Methods.* mars 2005;35(3):265-73.
51. 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.
52. Mani DR, Abbatiello SE, Carr SA. Statistical characterization of multiple-reaction monitoring mass spectrometry (MRM-MS) assays for quantitative proteomics. *BMC Bioinformatics.* 2012;13 Suppl 16:S9.
53. Takasato Y, Rapoport SI, Smith QR. An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol.* sept 1984;247(3 Pt 2):H484-493.
54. Dagenais C, Rousselle C, Pollack GM, Scherrmann JM. Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* févr 2000;20(2):381-6.
55. 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.* avr 2011;117(2):333-45.
56. Ohtsuki S, Watanabe Y, Hori S, Suzuki H, Bhongsatiern J, Fujiyoshi M, et al. mRNA expression of the ATP-binding cassette transporter subfamily A (ABCA) in rat and human brain capillary endothelial cells. *Biol Pharm Bull.* sept 2004;27(9):1437-40.

57. 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.* juin 2009;59(6):404-13.
58. 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.* juin 2003;20(6):904-9.
59. Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue L-F, Beach TG, et al. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and Abeta production. *Neurobiol Dis.* mars 2008;29(3):422-37.
60. Panchal M, Loeper J, Cossec J-C, Perruchini C, Lazar A, Pompon D, et al. Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. *J Lipid Res.* mars 2010;51(3):598-605.
61. Canepa E, Borghi R, Viña J, Traverso N, Gambini J, Domenicotti C, et al. Cholesterol and amyloid- $\beta$ : evidence for a cross-talk between astrocytes and neuronal cells. *J Alzheimers Dis.* 2011;25(4):645-53.
62. de Vries NA, Zhao J, Kroon E, Buckle T, Beijnen JH, van Tellingen O. P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan. *Clin Cancer Res.* 1 nov 2007;13(21):6440-9.
63. Polli JW, Olson KL, Chism JP, John-Williams LS, Yeager RL, Woodard SM, et al. An unexpected synergist role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the central nervous system penetration of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib (N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino)methyl}-2-furyl]-4-quinazolinamine; GW572016). *Drug Metab Dispos.* févr 2009;37(2):439-42.
64. Kodaira H, Kusuhara H, Ushiki J, Fuse E, Sugiyama Y. Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther.* juin 2010;333(3):788-96.

## FIGURE AND TABLE LEGENDS

**Table 1: mRNA expression of ABC transporters in isolated mouse brain microvessel samples.**

Brain microvessels of wild-type mice were isolated as described in **Material and Methods**. The mRNA amounts were quantified by qRT-PCR. Data are the relative mRNA expression of each gene calculated as a percentage of the relative mRNA expression of *Abcb1* ( $\pm$  SD of n = 2 samples/gene)

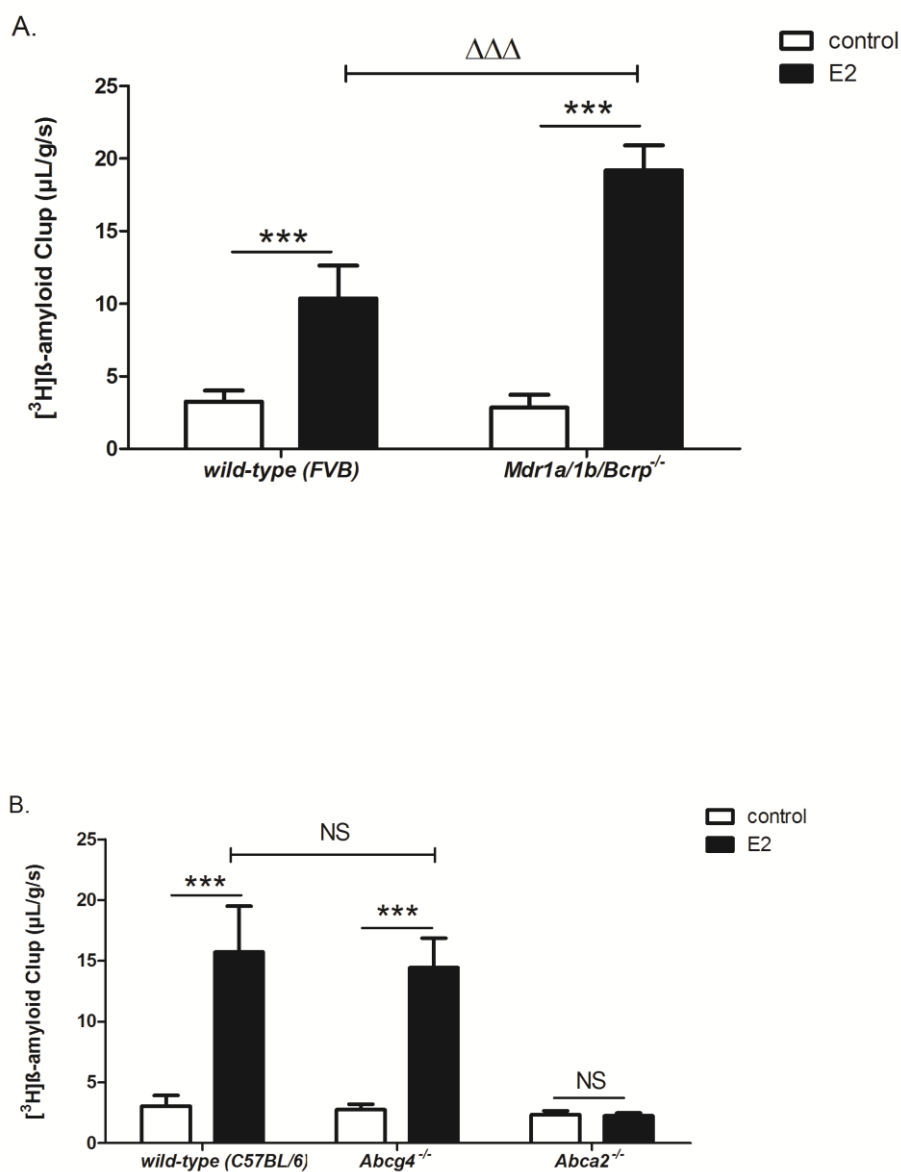
Gene	% of the relative mRNA expression of <i>Abcb1</i>	SD
<i>Abca2</i>	5,96 %	0.73
<i>Abcb1</i>	70,46 %	12.15
<i>Abcg2</i>	100 %	12.96

**Table 2: Protein expression of Abcb1, Abcg2 and Abca2 in isolated mouse brain microvessels**

Brain microvessels of wild-type mice were isolated as described in **Material and Methods**. The protein expression amounts were measured using the AQUA approach. Data are means  $\pm$ SD of the concentration of 3 or 4 transitions per peptide.

protein	mean (fmol/ $\mu$ g of total protein)	SD
Abca2	0.45	0.05
Abcb1	22.3	2.45
Abcg2	4.6	0.39

**Figure 1:** A] Brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ,  $\mu\text{L/g/s}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  in wild-type (FVB) (n= 4 mice in control and  $\beta$ estradiol (E2) groups) and *Mdr1a/1b/Bcrp*<sup>-/-</sup> mice (n= 4 and 5 mice in control and E2 groups, respectively), measured by ISBP technique in the absence (control) or presence of E2 (100  $\mu\text{M}$ ). Data are means  $\pm$  SD. B] Brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ,  $\mu\text{L/g/s}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  in wild-type (C57Bl/6) (n= 11 and n= 12 mice in control and E2 group, respectively), *Abcg4*<sup>-/-</sup> (n= 6 in control and E2 groups) and *Abca2*<sup>-/-</sup> mice (n= 3 in control and E2 groups), measured by ISBP technique in the absence (control) or presence of E2 (100  $\mu\text{M}$ ). Data are means  $\pm$  SD. \*\*\* p<0.001,  $\Delta\Delta\Delta$  p<0.001, NS non-significant.



## 2<sup>ème</sup> objectif : Etude de l'implication d'Abcg4 et Abca2 dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$

### **Article 3**

#### **“Cooperation between Abcb1, Abcg2, Abcg4 and Abca2 in the blood-brain barrier efflux of amyloid- $\beta$ peptide”**

Agnès Dodacki, Tuan-Minh Do, Shailendra B. Patel, Camille Taccola, Sophie Nolicic, Murielle Locchus, Robert Farinotti, Jean-Michel Scherrmann et Fanchon Bourasset

#### **❖ Introduction**

La maladie d'Alzheimer (MA) est l'une des maladies neurodégénératives les plus fréquentes chez les personnes âgées. Cette pathologie est principalement caractérisée par des enchevêtrements neurofibrillaires et des plaques séniles. Ces dernières résultent de l'accumulation et l'agrégation pathologiques de peptides  $\beta$ -amyloïdes (A $\beta$ ) dans le cerveau. Ce phénomène serait principalement dû à un défaut de clairance cérébrale du peptide A $\beta$ , en particulier au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'élimination du peptide A $\beta$  du cerveau *via* la BHE est un processus qui semble mettre en jeu le récepteur LRP1 (low-density lipoprotein receptor related protein 1) et plusieurs transporteurs ATP-binding cassette (ABC). Les mécanismes exacts de cette clairance ne sont pas encore bien compris mais elle pourrait être initiée par l'internalisation du peptide A $\beta$  médiée par LRP1 du côté abluminal des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (CECCs), puis les transporteurs ABC prendraient le relai du côté luminal pour assurer l'efflux du peptide A $\beta$  vers le sang et empêcher que ce peptide ne pénètre à nouveau dans le cerveau. ABCB1 a été le premier transporteur ABC identifié comme étant impliqué dans ce processus. Cependant, son rôle reste à ce jour controversé. D'autre part, l'implication de trois autres protéines ABC, Abcg2, Abcg4 et Abca2, dans l'efflux cérébral d'A $\beta$  a été mise en évidence, notamment par notre

laboratoire. Cependant, la contribution de chacun de ces quatre transporteurs dans l'efflux total du peptide A $\beta$  à la BHE n'est à ce jour pas connue.

### ❖ **Objectifs**

Ainsi, les objectifs de ce travail étaient tout d'abord de confirmer le rôle d'Abcb1 dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  à travers la BHE chez la Souris, puis de déterminer la part de chacun des quatre transporteurs (Abcb1, Abcg2, Abcg4 et Abca2) dans ce transport.

### ❖ **Méthodes**

Pour répondre à ces objectifs, nous avons mesuré la clairance d'entrée cérébrale ( $Cl_{up}$ ,  $\mu\text{L/g/s}$ ) du peptide [ $^3\text{H}$ ]A $\beta$  par la technique de perfusion cérébrale *in situ* (PCIS) chez des souris sauvages ou déficientes en *Abcb1* (*Abcb1*<sup>-/-</sup>), *Abcb1* et *Abcg2* (*Abcb1/Abcg2*<sup>-/-</sup>), *Abcg4* (*Abcg4*<sup>-/-</sup>) ou *Abca2* (*Abca2*<sup>-/-</sup>), en présence ou en absence d'inhibiteurs potentiels de ces transporteurs (GF120918, probucol ou estramustine).

### ❖ **Résultats**

Nous avons confirmé l'implication d'Abcb1 dans l'efflux du peptide [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  à travers la BHE, qui représente 9% de l'efflux total, suggérant que son rôle n'est que mineur. Nous avons mis en évidence que les contributions individuelles d'Abcb1, d'Abcg2, d'Abcg4 et d'Abca2 sont additionnelles et lorsque ces quatre transporteurs sont simultanément inhibés, la  $Cl_{up}$  du peptide [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  augmente significativement d'un facteur 9. Ainsi, nous avons montré que les participations individuelles d'Abcb1, d'Abcg2, d'Abcg4 et d'Abca2 correspondent respectivement à 9%, 13%, 24% et 54% de l'efflux total du peptide [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  à la BHE.



### ❖ **Conclusion**

Ces résultats ont permis de mettre en évidence une coopération entre Abcb1, Abcg2, Abcg4 et Abca2 dans l'élimination du peptide A $\beta$  hors du cerveau. Abcg4 et Abca2 assurent à eux deux 80% de l'efflux total du peptide [ $^3$ H]A $\beta$ <sub>1-40</sub>, tandis que la contribution d'Abcb1 et d'Abcg2 ne représente que 20%. Ainsi, notre travail met en évidence l'importance des transporteurs Abcg4 et Abca2 dans cet efflux, faisant de ces protéines de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans la MA.

## Cooperation between Abcb1, Abcg2, Abcg4 and Abca2 in the blood-brain barrier efflux of amyloid- $\beta$ peptide

Agnès Dodacki<sup>1,2,3</sup>, Tuan-Minh Do<sup>4</sup>, Shailendra B. Patel<sup>5</sup>, Camille Taccola<sup>1,2,3</sup>, Sophie Nicolic<sup>1,2,3</sup>, Murielle Lochus<sup>1,2,3</sup>, Robert Farinotti<sup>4</sup>, Jean-Michel Scherrmann<sup>1,2,3</sup> and Fanchon Bourasset<sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Variabilité de Réponse aux Psychotropes, INSERM, U1144, Paris, France

<sup>2</sup> Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, UMR-S 1144, Paris, France

<sup>3</sup> Université Paris Diderot, UMR-S 1144, Paris, France

<sup>4</sup> Pharmacokinetics and Clinical Pharmacy laboratory, Université Paris Sud-11, France

<sup>5</sup> Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, University of Cincinnati, Cincinnati, OH, USA

### Corresponding author:

\* To whom correspondence should be addressed:

Fanchon Bourasset, PharmD, PhD., Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France.

Tel: +33 1 53 73 98 59.

E-mail: fanchon.bourasset@parisdescartes.fr

**ABBREVIATIONS:** A $\beta$ : amyloid- $\beta$  peptide, ABC: ATP-binding cassette, AD: Alzheimer's disease, BBB: blood-brain barrier, BCEC: brain capillary endothelial cell, BCRP: breast cancer resistance protein, Cl<sub>up</sub>: brain uptake clearance, ER: efflux ratio, ISBP: *in situ* brain perfusion technique, KO: knockout, LRP1: low-density lipoprotein receptor related protein 1, P-gp: P-glycoprotein, WT: wild-type

## ABSTRACT

Alzheimer's disease is partly characterized by a brain accumulation of amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ), which could mainly result from a disturbance of its cerebral clearance. This brain clearance might involve several actors, including the low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) as well as several ATP-binding cassette (ABC) transporters. To better understand this cooperation and to determine which transporter(s) played a major role in this efflux, we determined the individual and simultaneous contribution of Abcb1, Abcg2, Abcg4 and Abca2 in the mouse  $A\beta$  efflux process. By combining chemically and genetically inhibition of one or several transporters, we measured, by using the *in situ* brain perfusion technique, the efflux ratio corresponding to the involvement of each transporter separately or of all transporters together. We first evidenced that individual contributions of each transporter in the  $A\beta$  efflux process were additional and that the total  $A\beta$  efflux inhibition led to a significant 9-fold increase of the  $[^3H]A\beta_{1-40}$   $Cl_{up}$  ( $\mu L/g/s$ ). Thus, the percentage involvement of Abcb1, Abcg2, Abcg4 and Abca2 in the  $A\beta$  efflux process at the mouse BBB level were found equal to 9 %, 13 %, 24 %, and 54 %, respectively. These data confirm the cooperation between 4 transporters at the mouse BBB level to efflux  $A\beta$  out of the brain and evidence that Abca2 and Abcg4 mediate at around 80% of the total efflux of  $A\beta$  through the BBB, whereas the contribution of both Abcb1 and Abcg2 were solely equal to 20 %. Thus our data highlight the importance to deeply study the involvement of ABCA2 and ABCG4 in AD pathophysiology and reveal ABCA2 and ABCG4 as new drug targets in AD.

**KEYWORDS:** ABC transporters, amyloid- $\beta$  peptide, blood-brain barrier, cooperation, Alzheimer's disease

## INTRODUCTION

The blood-brain barrier (BBB) is the major interface separating the brain from the blood. It is mostly formed by the brain capillary endothelial cells (BCECs), which are connected together by tight junctions limiting the paracellular passive diffusion (1,2). Endogenous and exogenous drugs transport through the BBB can be facilitated or limited by influx and efflux transporters, respectively, as well as by receptors mediating transcytosis processes (3). Alzheimer's disease is one of the most frequent neurodegenerative diseases in the elderly. This pathology is characterized by neurofibrillary tangles and senile plaques which consist in the brain accumulation and aggregation of amyloid- $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) (4). The  $A\beta$  transport through the BBB involves several partners including receptors and transporters mediating its blood-brain influx or its brain-blood efflux (5–8). It has been shown that the brain accumulation of  $A\beta$  was mainly due to a disturbance of its brain clearance (8,9), which could result either from a decrease of its brain efflux processes and/or from an increase of its brain influx processes. We recently showed in a mouse model of AD (3xTg-AD) that several BBB efflux transporters of cholesterol and/or  $A\beta$  were up-regulated to maintain the brain clearance of  $A\beta$  (10). Thus, the modulation of these transporters might become a new therapeutic target in AD. Therefore, it is urgent to precisely identify these BBB proteins and to understand their relationship to efflux  $A\beta$  from brain to blood. The main hypothesis claims the cooperation between the low-density lipoprotein receptor related protein 1 (LRP1) and ABC transporters which are respectively expressed in the abluminal and luminal side of the BCECs (5,6). The exact relationship between LRP1 and ABC transporters is not fully understood, but LRP1 might allow the transcytosis of  $A\beta$  through BCEC whereas ABC transporters might allow the expulsion of  $A\beta$  from BCEC and/or limit the re-entry of  $A\beta$  from blood to brain (6,11–13). To date, several ABC proteins have been identified to participate in the BBB efflux of  $A\beta$ . ABCB1 (P-glycoprotein, P-gp) was the first ABC protein described as a potential  $A\beta$  efflux transporter (11,14–17). This was first evidenced in Abcb1 enriched vesicles (14), but further *in vitro* studies showed slight or no effect of Abcb1 in this BBB efflux of  $A\beta$ , depending of the species (bovine/human/mice) and/or inhibitors used (verapamil/valsopodar) (18–20). *In vivo* experiments using the brain efflux index (BEI) method in mouse and rats also showed controversial results (15,21,22). Indeed, the brain  $A\beta$  clearance measured in rat was the same in control and pre-treated rats with two Abcb1 inhibitors (quinidine and verapamil), whereas the brain efflux of  $A\beta$  was 2-fold reduced in

*Abcb1*-KO mice (FVB strain) and in C57Bl/6 mice receiving valsopodar (16,19,22). In human, an inverse correlation has been reported between brain A $\beta$  and *Abcb1* levels in elderly people (23) and a decrease of the *Abcb1* expression and activity was shown in brains of AD patients(24,25). Finally, the level of *Abcb1* expression in brain microvessels was dependent on the cerebral area studied as well as the A $\beta$  cerebral accumulation (26). Taking in a whole, these data show that the involvement of *Abcb1* in the brain A $\beta$  efflux is still in debate and that discrepancy might result from many factors like the species, the stage of the pathology, the methods and particularly the *Abcb1* inhibitors used. Another explanation would be that the role of *Abcb1* might be minor comparing to other transporters also identified as A $\beta$  carriers through the BBB. Indeed, we and others have shown that *Abcg2* (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP), *Abcg4* and, more recently, *Abca2* were also involved in this brain A $\beta$  efflux process (12,27–29). But the exact part of each ABC transporter in the total efflux of A $\beta$  through the BBB remains unknown. The aim of our study was to confirm the role of *Abcb1* in the A $\beta$  efflux through the mouse BBB and to determine the part of each transporter (*Abcb1*, *Abcg2*, *Abcg4* and *Abca2*) in this A $\beta$  efflux process.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

*In vivo* experiments were performed with 8-12 week-old mice. Wild-type C57BL/6 mice were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). CF-1 mice (WT and *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice) were bred in-house from progenitors genotyped for *Mdr1a* (*Abcb1a*) that were initially obtained from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). The *Abcg4*-deficient (*Abcg4*<sup>-/-</sup>) mice were from a C57BL/6 background and were originally obtained from Dr. S. Patel (Medical college of Wisconsin, Milwaukee, WI, USA). The *Abca2*<sup>-/-</sup> mice were from Jackson Laboratories (B6.129-*Abca2*<sup>tm1Kdt</sup>/J) and were purchased from Charles River Laboratories (Saint Germain Nuelles, France). Mice were maintained and used in the animal house of the Faculty of Pharmacy of Paris (Animal Platform, CRP2 - UMS 3612 CNRS - US25 Inserm-IRD – Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France). The mice had free access to standard laboratory food and water and were kept on a 12 hours light-dark cycle at 22 ± 3°C. All studies involving animals and their care were performed according to the National Research Council's guide and complied with the Ethical rules of the European directive (210/63/EU) for experimentation with laboratory animals. All experimental

protocols were approved by the ethics review committee of Paris Descartes University (approval n° 12-181/12-2012) the Animal Care and Use Committees of the Medical University of South Carolina, Charleston, SC, and the Medical College of Wisconsin and the IACUC for the Clement J. Zablocki VAMC, Milwaukee, WI.

## **Reagents**

[<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> (20 Ci/mmol) was purchased from Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany), [<sup>14</sup>C]sucrose (435 mCi/mmol), liquid scintillation cocktails Ultima Gold XR<sup>®</sup> and Solvable<sup>®</sup> were purchased from PerkinElmer Life Sciences (Courtaboeuf, France). GF12019 was kindly provided by GlaxoSmithKline (Collegeville, PA, US). Estramustine and probucol were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). All the other chemicals were commercial products of reagent grade.

## ***In situ* brain perfusion technique**

The *in situ* brain perfusion technique (ISBP) was developed to study drug transport processes occurring at the luminal side of the BCECs<sup>37,38</sup>. This method can be used to measure transport parameters, including the distribution volume and the brain uptake clearance (Cl<sub>up</sub>) of a target molecule over very short periods (30-120 s). One of the advantages of this technique is the ability to administer inhibitors or to use transporter deficient mice, in order to study the role of transporters at the BBB. If the Cl<sub>up</sub> increases in the presence of a transporter inhibitor or when a carrier is not expressed, we can conclude that the transporter plays a role in the efflux of the target molecule at the BBB.

## **Surgical procedures and Perfusion**

Mice were anesthetized by intra-peritoneal injection of a mixture of ketamine and xylazine at 140:8 mg/kg. The right common carotid artery was ligated on the heart side and the right external carotid artery was ligated at the level of the bifurcation. A catheter was inserted into the right common carotid artery. The perfusion liquid was contained in a syringe placed in an infusion pump and connected to the catheter. Before the perfusion, the thorax of the animal was opened, the heart was removed and perfusion started immediately at flow of 2.5 mL/min. The perfusion fluid was Krebs bicarbonate-buffered physiological saline (128 mM NaCl, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 4.2 mM KCl, 2.4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM MgCl<sub>2</sub> and 9 mM D-glucose). The solution was gassed with 95% O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub> to bring the pH to 7.40 and warmed

to 37°C in water bath. Each mouse was perfused for 60 s with [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> (0.2 μCi/mL). [<sup>14</sup>C]sucrose was used as a vascular marker of the physical integrity of the BBB and co-perfused with the tritiated substrate. The brain uptake of tritiated tracers was also measured in the presence of unlabelled substrates [probuco 10 μM, GF120918 10 μM, estramustine 100 μM], dissolved in their respective vehicles [DMSO (<0.5% in final perfusion fluid) or H<sub>2</sub>O]. The experiment was terminated by decapitating the mouse. The right cerebral hemisphere and aliquots of the perfusion fluid were sampled in tared vials, weighted, digested in 2 mL of Solvable<sup>®</sup> solubilizer (PerkinElmer) at 50°C and mixed with 9 mL of Ultima Gold XR<sup>®</sup> scintillation cocktail (PerkinElmer). Labeled compounds were counted on a Tri-Carb<sup>®</sup> (PerkinElmer) counter with the appropriate dual (<sup>14</sup>C/<sup>3</sup>H) quenching curves and standards to measure disintegration per minute (dpm) in samples.

#### Calculation of the BBB transport parameters

All the calculations were done as described previously<sup>38</sup>. The brain vascular volume of each animal ( $V_{\text{vasc}}$ , μL/g) was estimated using the [<sup>14</sup>C]sucrose distribution volume, which does not measurably cross the BBB during short perfusions, by dividing the amount of [<sup>14</sup>C]sucrose (dpm/g) in the right brain hemisphere by the concentration of [<sup>14</sup>C]sucrose in the perfusion fluid (dpm/μL). All the values were under 20 μL/g, indicating that the BBB was not altered during these experiments. The brain uptake clearance ( $Cl_{\text{up}}$ , μL/g) is the ratio between the apparent tissue distribution volume ( $V_{\text{brain}}$ , μL/g) of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> and the perfusion time (s). The  $V_{\text{brain}}$  was calculated from the amount of radioactivity in the right brain hemisphere using the following equation:

$$V_{\text{brain}} = X_{\text{brain}} / C_{\text{perf}}$$

where  $X_{\text{brain}}$  (dpm/g) is the calculated amount of tritiated tracer in the right cerebral parenchyma and  $C_{\text{perf}}$  (dpm/μL) is the concentration of tritiated tracer in the perfusion fluid.

$X_{\text{brain}}$  is obtained by this equation:

$$X_{\text{brain}} = X_{\text{tot}} - (V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}})$$

where  $X_{\text{tot}}$  (dpm/g) is the total amount of tritiated tracer measured in the brain tissue sample (vascular and extravascular).

## Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  SD. The Student's *t* test was used to compare samples, when appropriate. Differences were considered to be statistically significant when \* $p < 0.05$  or  $\Delta p < 0.05$ .

## RESULTS

### Relative contribution of Abcb1 and Abcg2 in the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$ measured in CF-1 mice

The respective contributions of Abcb1 and Abcg2 in the BBB efflux of A $\beta$  were evaluated by measuring the brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ) of [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$ , in CF-1 WT and *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice, in the presence or absence of GF120918, a known inhibitor of both, ABCB1 and ABCG2 transporters (32,33) [Fig. 1]. The [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$   $Cl_{up}$  obtained in CF-1 WT mice were not significantly different from those of *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice. Adding GF120918 to the perfusion buffer increased the  $Cl_{up}$  of [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$  in CF-1 WT mice (3.3-fold), meaning that Abcb1 and/or Abcg2 were involved in the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$ . The effect of GF120918 was 1.4-fold decreased, but not abolished, in *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice compared to WT mice, meaning -1) that Abcb1 was involved in the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$  with an efflux ratio ( $ER^{Abcb1}$ ), measured as the ratio between the [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$   $Cl_{up}$  obtained in the presence of GF120918 in WT over *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice, was equal to 1.4, and -2) that another transporter inhibited by GF120918, *i.e.* Abcg2, was also involved in the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$ . The  $ER^{Abcg2}$ , measured as the ratio between the [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$   $Cl_{up}$  obtained in the presence or not of GF120918 in *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice was equal to 2.0.

Taken together, these results demonstrate that Abcb1 and Abcg2 were involved in the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$  and that their effects were additional [Fig. 4A]. The part of Abcb1 in the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$  is equal to 41 % of the total efflux by Abcb1 and Abcg2 together [table 1].

### Relative contribution of Abcg4, Abcb1, and Abcg2 in the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$ measured in CF-1 mice

The  $Cl_{up}$  of [<sup>3</sup>H]A $\beta_{1-40}$  was measured in the presence or absence of probucol in CF-1 WT and *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice. Adding probucol to the perfusion buffer significantly increased the  $Cl_{up}$  of [<sup>3</sup>H]-A $\beta_{1-40}$  in both groups (3.6-fold and 3.8-fold, respectively) [Fig. 2], meaning that probucol



has inhibited a probucol-sensitive transporter different from Abcb1. Since probucol has been shown to be a potent inhibitor of Abcg4 (12) and since A $\beta$  has been shown to be a substrate of Abcg4 (12,28), this result showed that probucol has inhibited Abcg4 in CF-1 mice BBB. The efflux ratio of Abcg4, measured as the ratio between the [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> Cl<sub>up</sub> obtained in CF-1 WT mice, with and without probucol was equal to 3,6. Then, the part of Abcg4 in the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> is almost equal to that of Abcb1 and Abcg2 together ( $ER^{Abcg4} / ER^{Abcb1+Abcg2} = 1.1$ ) [Fig. 4A and table 1].

### **Relative contribution of Abcg4, Abcb1, Abcg2 and Abca2 in the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> measured in C57Bl/6 WT, *Abcg4*-KO mice and *Abca2*-KO mice**

The Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> was measured in the presence or absence of GF120918, estramustine or the combination of GF120918 and estramustine in WT, *Abcg4*<sup>-/-</sup> or *Abca2*<sup>-/-</sup> mice [Fig. 3]. Adding GF120918 to the perfusion buffer significantly increased the efflux ratio of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> in WT and *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice (2.2- and 2.0-fold, respectively), meaning that GF120918 has inhibited P-gp and/or Abcg2 in WT and *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice. The addition of estramustine in the buffer led to a significant 4.5-fold increase of the [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> efflux ratio in WT mice. This effect was decreased but not abolished in *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice, meaning that estramustine has inhibited Abcg4 and another transporter, sensitive to estramustine. The part of Abcg4 in the [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> efflux in this experiment, is the ratio between the Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> obtained in the presence of estramustine in WT over *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice; this ratio is equal to 2.3. Finally, the co-perfusion of estramustine alone in *Abca2*<sup>-/-</sup> mice or of estramustine plus GF120918 in WT or *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice, led to a significant 9.0 and 9.6- and 9.3-fold increase of the [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> efflux ratio, respectively. This result confirms the multiple transporters cooperation in the mouse BBB to efflux [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> out of the brain. The maximum Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> is obtained when all the transporters were inhibited.

Like in CF-1 mice, the percentage of Abcg4 involvement in the BBB efflux of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> is 1.1-fold higher than that of Abcb1 and Abcg2 together. The contribution parts of Abcb1+Abcg2, Abcg4 and Abca2 are equal to 22, 24 and 54 %, respectively [table 1].

## **DISCUSSION**

Amyloid- $\beta$  peptide is a multi-ABC transporter substrate (5,11,12,17,28,29). Thus, evidencing the net individual contribution of each transporter is difficult because of the

cooperation/compensation by other transporters. For instance, it has been shown, by the brain efflux index (BEI) method, that the clearance out of the brain of sorafenib, a dual substrate of both Abcb1 and Abcg2, was the same in WT and in *Mdr1a/b*<sup>-/-</sup> mice but was 2- and 2.5-fold inhibited in *Abcg2*- and *Abcb1/Abcg2*-deficient mice, respectively, meaning that both Abcb1 and Abcg2 were involved in the BBB efflux of sorafenib but that the part of Abcb1 was minor than that of Abcg2, and that its effect could be seen only when Abcg2 was genetically inhibited (34). Similarly, we demonstrated previously that the brain uptake clearance of A $\beta$  was the same in WT and in *Abcb1/Abcg2*<sup>-/-</sup> as well as in *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice although these transporters were involved in the brain clearance of A $\beta$  (12,28). Evidencing Abcg2 and Abcg4 involvement in this efflux process was possible by combining genetic and chemical inhibitions of one or several transporters. Our current data show that the Cl<sub>up</sub> of A $\beta$  was the same in WT and *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice. But we also show that the addition of GF120918 led to a 3.3- and 2-fold increase of the Cl<sub>up</sub> in WT and *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice, respectively, meaning that the net contribution of Abcg2 alone was equal to 2. The part of Abcb1 in this efflux was the ratio between the Cl<sub>up</sub> obtained with GF120918 in WT over *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice, and was found equal to 1.4. Moreover, our data show that the effect of Abcb1 and Abcg2 in the BBB efflux of A $\beta$  were additional [Fig. 4B]. This first result confirms the involvement of Abcb1 in the mouse BBB efflux of A $\beta$  and show, for the first time, that the part of Abcb1 in this efflux process is lesser than that of Abcg2.

We previously evidenced that Abcg4 and Abca2 were involved in the A $\beta$  efflux through the mouse BBB and reported efflux ratio equal to 2.2 and 5.2, respectively (28,29). Here, we re-evaluated the contributions of Abca2 and Abcg4 in the BBB efflux of A $\beta$  by using estramustine, an anticancer drug described as a substrate of ABCA2 and an inhibitor of ABCB1 (35–37). Our data clearly demonstrate that estramustine inhibited the mouse brain to blood efflux of A $\beta$  with an efflux ratio equal to 4.5 (ER<sup>estramustine/WT</sup>). Our data also demonstrated that estramustine can inhibit Abcg4 since the efflux ratio is decreased in the presence of estramustine in *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice (ER<sup>estramustine-WT/estramustine-Abcg4<sup>-/-</sup></sup> = 2.3). This is the first report demonstrating that estramustine can inhibit Abcg4, confirming that estramustine is not a specific inhibitor of Abca2 and can interact, at least, with three ABC transporters: Abcb1, Abca2 and Abcg4. Thus, it is difficult to conclude if the ER<sup>estramustine/WT</sup> we found equal to 4.5 was due to the inhibition of Abca2, Abcb1, Abcg4 or a combination of the three transporters. This would in particular depend on the affinity of estramustine for each

transporter. Adding GF120918 and estramustine in the perfusion buffer increased the A $\beta$  efflux ratio obtained with vehicles alone in WT mice by 9.6-fold. This value corresponds to the addition of individual efflux ratio calculated for Abcb1/Abcg2, Abcg4 and Abca2 [Fig. 4B], meaning that the co-perfusion of estramustine plus GF120918 allows for the inhibition of all the transporters involved in the BBB efflux of A $\beta$ . As expected, this full inhibition was also found in *Abca2*<sup>-/-</sup> and *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice co-perfused with estramustine or estramustine plus GF120918 respectively, *i.e.* when all the transporters were chemically and/or genetically inhibited. This suggests that estramustine might also inhibit Abcg2. Moreover, in *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice, the addition of estramustine plus GF120918 led to a 4.7-fold increase of the A $\beta$  efflux ratio obtained with GF120918 alone, suggesting that, as Abcg4 was lacking and Abcb1 and Abcg2 were inhibited by GF120918, estramustine could only inhibit the Abca2-mediated efflux of A $\beta$ . Hence, the ER<sup>estramustine+GF120918/GF120918</sup> obtained in *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice is at around 5, thus very close from that of Abca2, previously found at 5.2 (29). Moreover, the efflux ratio obtained in *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice co-perfused with estramustine or GF120918 alone were similar, suggesting that estramustine has preferentially inhibited Abcb1 and Abcg2 (ER<sup>estramustine/ctrl</sup> = ER<sup>GF120918/ctrl</sup>) rather than Abca2. This supports the hypothesis of Abcg2 inhibition by estramustine and suggests that the affinity of GF120918 for Abcb1 and Abcg2 might be higher than that of estramustine. Thus, the addition of GF120918 with estramustine in *Abcg4*<sup>-/-</sup> mice might have displaced estramustine from Abcb1/Abcg2, making estramustine available for Abca2 inhibition. Consequently, our data also suggests that the affinity of estramustine is higher for Abcb1 and Abcg2 than for Abca2. In these conditions, the estramustine effect observed in WT mice (ER<sup>estramustine/ctrl</sup> = 4.5) might be mainly attributed to the additional effect of Abcg4 and Abcb1/Abcg2 (ER<sup>Abcb1+Abcg2</sup> + ER<sup>Abcg4</sup> = 2.1 + 2.3 = 4.4), whereas estramustine could inhibit Abca2 only when Abcg4 and Abcb1/Abcg2 were chemically/genetically inhibited.

Knowing the individual contribution of each transporter, we aimed at determining their relative contributions in the BBB efflux of A $\beta$ . But we obtained Abcb1 and Abca2 data in two different strains of mice, since the net contribution of Abcb1 could only be evidenced in *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice (CF-1) whereas that of Abca2 could only be evidenced in *Abca2*<sup>-/-</sup> mice (C57Bl/6). Quosa et al. recently showed that the brain efflux of A $\beta$  as well as brain Abcb1 amounts were the same in four strains of mice including C57Bl/6 and FVB mice (38). Our data showed that the absolute values of efflux ratio measured for Abcb1 and Abcg2 together

and for Abcg4 were not the same in CF-1 and C57Bl/6 mice. However, the relative contribution of Abcg4 comparing to that of Abcb1/Abcg2 was the same in the two strains of mice and was almost equal to unity (x1.1). This finding allowed us to suggest that the percentage involvement of Abcb1 in the total Abcb1/Abcg2-mediated efflux of A $\beta$  was the same in CF-1 and C57Bl/6 mice and was 41 % [Table 1]. Supporting our findings, a similar value can be calculated from data published by Zhang et al. in which the initial brain concentration of A $\beta_{1-40}$  was enhanced by 133 % and 124.2 % in *Abcg2*<sup>-/-</sup> and *Abcb1*<sup>-/-</sup> mice (FVB strains), respectively (39). Hence, the part of Abcb1 in the total Abcb1/Abcg2-mediated efflux of A $\beta$  can be calculated as 42 %, thus very close to our value. Taken together, these results show that the relative part of Abcb1 and Abcg2 in the brain efflux of A $\beta$  is the same in CF-1, C57Bl/6 and FVB mice. Thus, we further compared the relative involvement of Abcb1, Abcg2, Abcg4 and Abca2 in the BBB efflux of A $\beta$  in C57Bl/6 mice. We used the efflux ratio values obtained when all the transporters have been genetically or chemically inhibited. In these conditions, the A $\beta$  efflux from brain to blood seems to be abolished and we considered this condition as the 100% efflux inhibition. The parts of Abcb1, Abcg2, Abcg4 and Abca2 in the total A $\beta$  efflux mechanisms involved in the BBB were 9 %, 13 %, 24 % and 54 %, respectively [table 1]. Thus, our data clearly demonstrate, for the first time, that the role of Abcb1 is minor in the total mouse BBB efflux of A $\beta$  but that together, Abcb1- and Abcg2-mediated efflux account for 22 % of the total A $\beta$  clearance through the BBB. This might explain divergent data reported in the literature about the role of Abcb1 in the BBB efflux of A $\beta$  (16,17). On the opposite side, Abca2 is the transporter that clears by itself more than 50 % of A $\beta$  from the brain to the blood, although its mouse BCECs protein amount is 50- and 10-fold lesser than that of Abcb1 and Abcg2, respectively (29). In addition, about 80% of A $\beta$  is cleared by both Abca2 and Abcg4 at the mouse BBB level. Thus, our data highlights the importance of these two ABC transporters in the BBB efflux of A $\beta$ , and, more generally, in the regulation of endogenous molecules trafficking through the BBB. Their BBB functions deserve to be more deeply studied in rodents and human, in physiological as well as in pathological conditions.

In conclusion, our data provide for the first time evidences for cooperation between 4 ABC transporters to clear A $\beta$  from the brain which contributions vary from 9 to 50%. This cooperation ensures the clearance of A $\beta$  even in the absence or disruption of one/several transporter(s) because of compensations by others. We evidenced ABCA2 as the major

transporter involved in mouse BBB efflux of A $\beta$ . ABCA2 being highly expressed at the human BBB (40,41), its involvement in A $\beta$  efflux is likely to be also efficient in human BBB. Thus, stimulating the function of ABCA2 and/or ABCG4 might allow increasing the A $\beta$  efflux from the brain to the blood and could represent interesting new targets in AD treatment.

## Acknowledgements

We thank the animal Platform, CRP2 - UMS 3612 CNRS - US25 Inserm-IRD – Faculté de Pharmacie de Paris, Université Paris Descartes, Paris, France

## REFERENCES

1. Quaegebeur A, Lange C, Carmeliet P. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron*. 11 août 2011;71(3):406-24.
2. Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis*. mai 2013;36(3):437-49.
3. Abbott NJ, Patabendige AAK, Dolman DEM, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis*. janv 2010;37(1):13-25.
4. Savelieff MG, Lee S, Liu Y, Lim MH. Untangling amyloid- $\beta$ , tau, and metals in Alzheimer's disease. *ACS Chem Biol*. 17 mai 2013;8(5):856-65.
5. Zlokovic BV. Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem*. mai 2004;89(4):807-11.
6. Erickson MA, Hansen K, Banks WA. Inflammation-induced dysfunction of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier: protection by the antioxidant N-acetylcysteine. *Brain Behav Immun*. oct 2012;26(7):1085-94.
7. Sagare AP, Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular defects and faulty amyloid- $\beta$  vascular clearance in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD*. 2013;33 Suppl 1:S87-100.
8. Ramanathan A, Nelson AR, Sagare AP, Zlokovic BV. Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: the role, regulation and restoration of LRP1. *Front Aging Neurosci*. 2015;7:136.
9. Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, et al. Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science*. 24 déc 2010;330(6012):1774.
10. Do TM, Dodacki A, Alata W, Calon F, Nicolici S, Scherrmann J-M, et al. Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- $\beta$  Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD). *J Alzheimers Dis JAD*. 2015;49(2):287-300.
11. Mahringer A, Fricker G. ABC transporters at the blood-brain barrier. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. mai 2016;12(5):499-508.
12. Do TM, Noel-Hudson M-S, Ribes S, Besengez C, Smirnova M, Cisternino S, et al. ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid- $\beta$  peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis JAD*. 2012;30(1):155-66.
13. Storck SE, Meister S, Nahrath J, Meißner JN, Schubert N, Di Spiezio A, et al. Endothelial LRP1 transports amyloid- $\beta$ (1-42) across the blood-brain barrier. *J Clin Invest*. janv 2016;126(1):123-36.
14. Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ, et al. beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem*. févr 2001;76(4):1121-8.
15. Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, et al. P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest*. nov 2005;115(11):3285-90.

16. Abuznait AH, Kaddoumi A. Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci*. 21 nov 2012;3(11):820-31.
17. Pahnke J, Langer O, Krohn M. Alzheimer's and ABC transporters--new opportunities for diagnostics and treatment. *Neurobiol Dis*. déc 2014;72 Pt A:54-60.
18. Candela P, Gosselet F, Saint-Pol J, Sevin E, Boucau M-C, Boulanger E, et al. Apical-to-basolateral transport of amyloid- $\beta$  peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *J Alzheimers Dis*. 2010;22(3):849-59.
19. Qosa H, Abuasal BS, Romero IA, Weksler B, Couraud P-O, Keller JN, et al. Differences in amyloid- $\beta$  clearance across mouse and human blood-brain barrier models: kinetic analysis and mechanistic modeling. *Neuropharmacology*. avr 2014;79:668-78.
20. Bello I, Salerno M. Evidence against a role of P-glycoprotein in the clearance of the Alzheimer's disease A $\beta$ 1-42 peptides. *Cell Stress Chaperones*. mai 2015;20(3):421-30.
21. Qosa H, LeVine H, Keller JN, Kaddoumi A. Mixed oligomers and monomeric amyloid- $\beta$  disrupts endothelial cells integrity and reduces monomeric amyloid- $\beta$  transport across hCMEC/D3 cell line as an in vitro blood-brain barrier model. *Biochim Biophys Acta*. sept 2014;1842(9):1806-15.
22. Ito S, Ohtsuki S, Terasaki T. Functional characterization of the brain-to-blood efflux clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the rat blood-brain barrier. *Neurosci Res*. nov 2006;56(3):246-52.
23. Vogelgesang S, Cascorbi I, Schroeder E, Pahnke J, Kroemer HK, Siegmund W, et al. Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics*. oct 2002;12(7):535-41.
24. Deo AK, Borson S, Link JM, Domino K, Eary JF, Ke B, et al. Activity of P-Glycoprotein, a  $\beta$ -Amyloid Transporter at the Blood-Brain Barrier, Is Compromised in Patients with Mild Alzheimer Disease. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*. juill 2014;55(7):1106-11.
25. Chiu C, Miller MC, Monahan R, Osgood DP, Stopa EG, Silverberg GD. P-glycoprotein expression and amyloid accumulation in human aging and Alzheimer's disease: preliminary observations. *Neurobiol Aging*. sept 2015;36(9):2475-82.
26. Kannan P, Schain M, Kretzschmar WW, Weidner L, Mitsios N, Gulyás B, et al. An automated method measures variability in P-glycoprotein and ABCG2 densities across brain regions and brain matter. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 3 août 2016;
27. Xiong H, Callaghan D, Jones A, Bai J, Rasquinha I, Smith C, et al. ABCG2 is upregulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for A $\beta$ (1-40) peptides. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 29 avr 2009;29(17):5463-75.
28. Dodacki A, Wortman M, Saubaméa B, Chasseigneaux S, Nicolic S, Lochus M, et al. Expression and function of Abcg4 in the mouse blood-brain barrier: role in Alzheimer's disease. 2016; in submission.
29. Dodacki A, Tchara L, Nicolic S, Lochus M, Menet M-C, Declèves X, et al. Expression and function of Abca2 in the mouse blood-brain barrier: involvement in the efflux of amyloid- $\beta$  peptide. 2016; in preparation.
30. Takasato Y, Rapoport SI, Smith QR. An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am J Physiol*. sept 1984;247(3 Pt 2):H484-493.
31. Dagenais C, Rousselle C, Pollack GM, Scherrmann JM. Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. févr 2000;20(2):381-6.
32. Kathawala RJ, Gupta P, Ashby CR, Chen Z-S. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother*. janv 2015;18:1-17.
33. Thomas H, Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control J Moffitt Cancer Cent*. avr 2003;10(2):159-65.

34. Agarwal S, Elmquist WF. Insight into the cooperation of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) at the blood-brain barrier: a case study examining sorafenib efflux clearance. *Mol Pharm.* 5 mars 2012;9(3):678-84.
35. Laing NM, Belinsky MG, Kruh GD, Bell DW, Boyd JT, Barone L, et al. Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 1 avr 1998;58(7):1332-7.
36. Mack JT, Townsend DM, Beljanski V, Tew KD. The ABCA2 transporter: intracellular roles in trafficking and metabolism of LDL-derived cholesterol and sterol-related compounds. *Curr Drug Metab.* janv 2007;8(1):47-57.
37. Yang CP, Shen HJ, Horwitz SB. Modulation of the function of P-glycoprotein by estramustine. *J Natl Cancer Inst.* 4 mai 1994;86(9):723-5.
38. Qosa H, Kaddoumi A. Effect of mouse strain as a background for Alzheimer's disease models on the clearance of amyloid- $\beta$ . *J Syst Integr Neurosci.* avr 2016;2(2):135-40.
39. Zhang W, Xiong H, Callaghan D, Liu H, Jones A, Pei K, et al. Blood-brain barrier transport of amyloid beta peptides in efflux pump knock-out animals evaluated by in vivo optical imaging. *Fluids Barriers CNS.* 2013;10(1):13.
40. 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.
41. 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.

## FIGURE LEGENDS

**Figure 1 :** Brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ,  $\mu\text{L/g/s}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  in *Mdr1a*<sup>+/+</sup> and *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice, measured by ISBP technique in the absence (control) or presence of GF120918 (elacridar, 10  $\mu\text{M}$ ). Data are means  $\pm$  SD of 6-10 mice. \*\*\*  $p < 0.001$  when compared to control group,  $\Delta$   $p < 0.05$  when comparing *Mdr1a*<sup>+/+</sup> and *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice.

**Figure 2:** Brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ,  $\mu\text{L/g/s}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  in *Mdr1a*<sup>+/+</sup> and *Mdr1a*<sup>-/-</sup> mice, measured by ISBP technique in the absence (control) or presence of probucol (10  $\mu\text{M}$ ). Data are means  $\pm$  SD of 6-10 mice. \*\*\*  $p < 0.001$ .

**Figure 3:** Efflux ratio of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  obtained by dividing the  $Cl_{up}$  measured in the presence of GF120918 (10  $\mu\text{M}$ ), estramustine (100  $\mu\text{M}$ ) or estramustine + GF120918 (100/10  $\mu\text{M}$ ) over the  $Cl_{up}$  obtained without inhibitors (Ctrl), in WT, *Abcg4*<sup>-/-</sup> or *Abca2*<sup>-/-</sup> mice. Data are means  $\pm$  SD of 3-6 mice. \*\*\*  $p < 0.001$  when compared to control group, in each strain of mice.  $\Delta\Delta\Delta$   $p < 0.001$  when comparing WT, *Abcg4*<sup>-/-</sup> and *Abca2*<sup>-/-</sup> mice.

**Figure 4:** Relative effect of each transporter expressed as the [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  efflux ratio measured in CF-1 mice (panel A) and C57Bl/6 mice (panel B) by ISBP technique. ISBP data were from figures 1-3 and from data published from our laboratory (28).



FIGURE 1

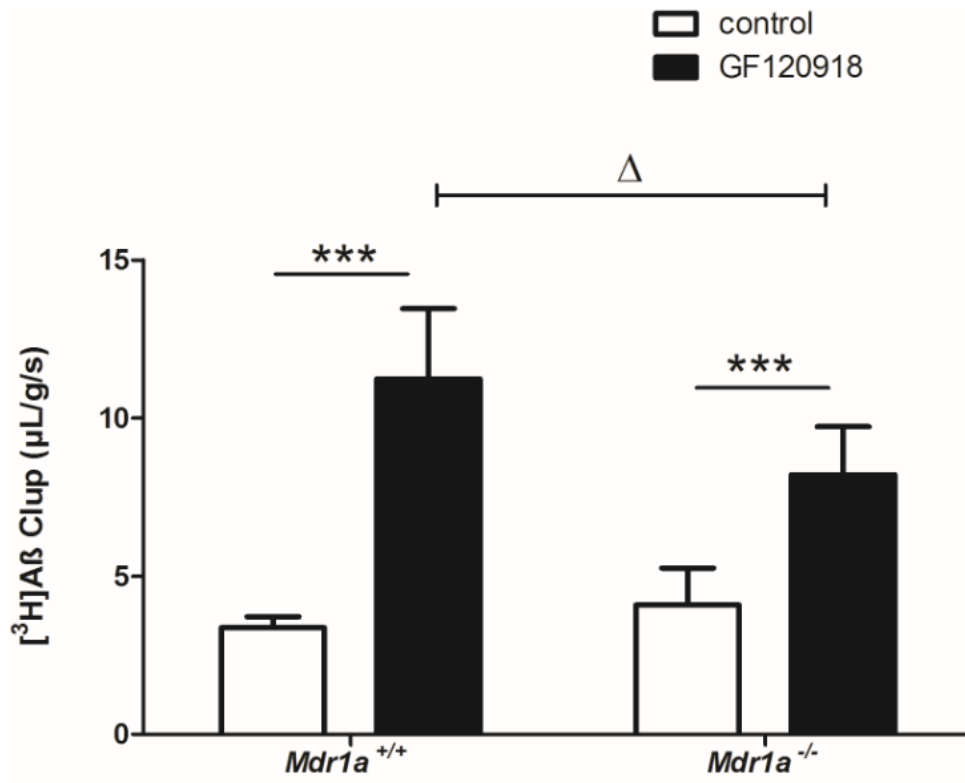


FIGURE 2

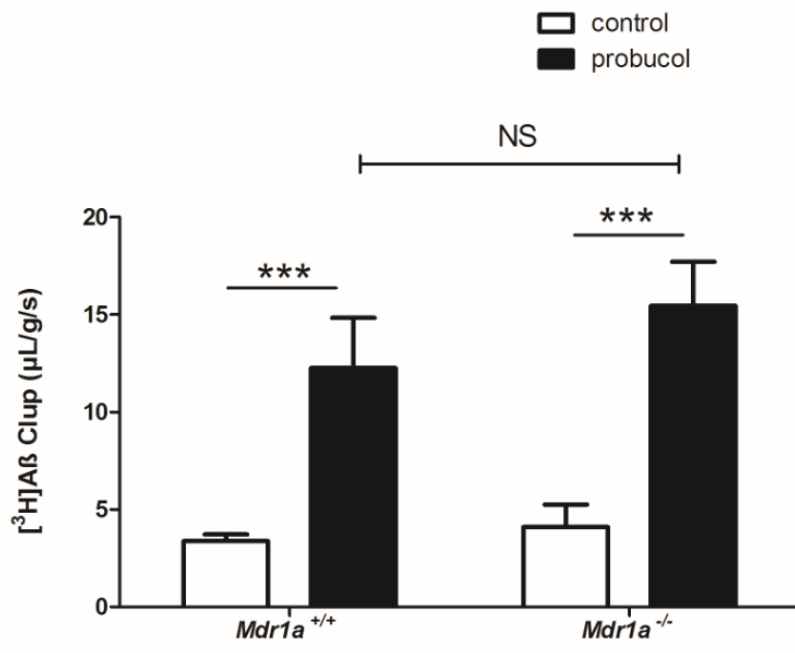


FIGURE 3

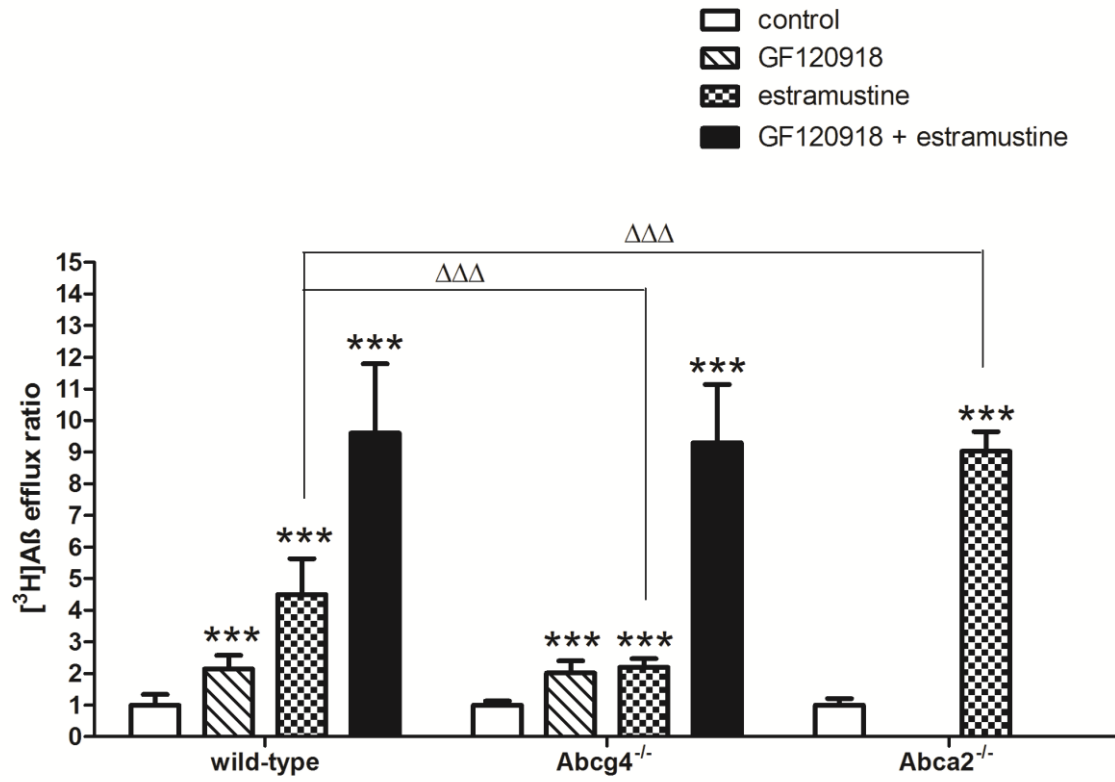
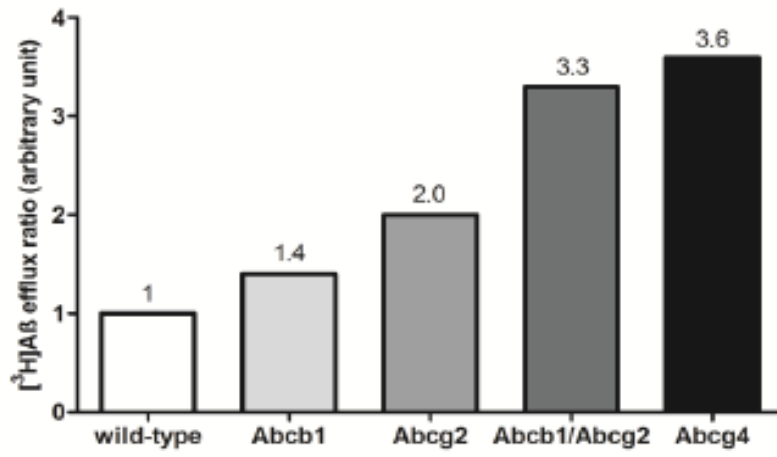
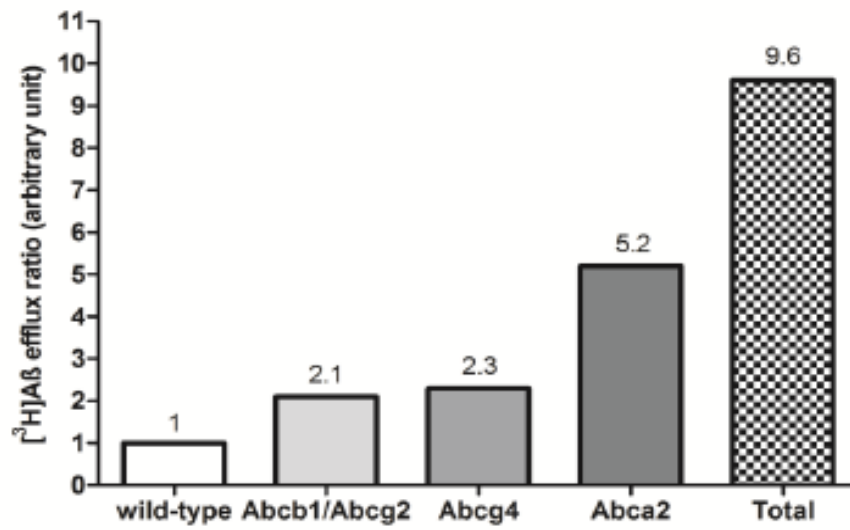


FIGURE 4

A.



B.



**Table 1:** Relative involvement of Abcb1, Abcg2, Abcg4 and Abca2 in the total efflux of [<sup>3</sup>H]Aβ<sub>1-40</sub> in CF-1 and C57Bl/6 mice. Data are expressed as a percentage of the total efflux by P-gp and Abcg2 in CF-1 mice or by Abcb1 + Abcg2 + Abcg4 + Abca2 in C57Bl/6 mice. The relative part of Abcg4 *versus* Abcb1 + Abcg2 was estimated by dividing the ER<sup>Abcg4</sup> over ER<sup>Abcb1+Abcg2</sup>.

CF-1		C57Bl/6	
Abcb1	41 %		
Abcg2	59 %		
<b>Total (Abcb1 + Abcg2)</b>	<b>100 %</b>		
<b>Abcg4 / (Abcb1+Abcg2)</b>	<b>1.1</b>	<b>Abcg4 / (Abcb1+Abcg2)</b>	<b>1.1</b>
		Abcb1 + Abcg2	22 %
		Abcg4	24 %
		Abca2	54 %
		<b>Total</b>	<b>100%</b>

---

# DISCUSSION GENERALE

---

## ***1. Caractérisation des transporteurs Abcg4 et Abca2 à la BHE : implication dans le transport de molécules endogènes.***

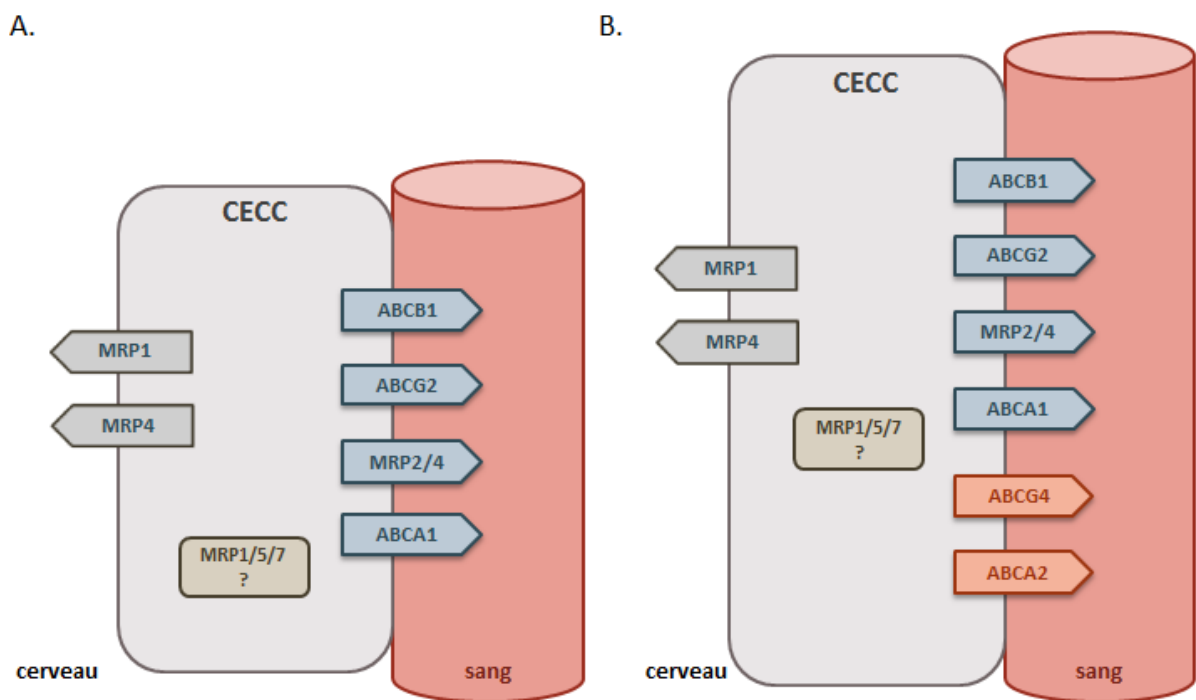
Actuellement, les principaux transporteurs ABC décrits dans la littérature comme étant exprimés et fonctionnels au niveau de la BHE sont ABCB1, ABCG2, et certaines protéines ABCC (MRPs); les substrats décrits pour ces transporteurs sont essentiellement des xénobiotiques (pour revue voir (Mahringer and Fricker, 2016)). Cependant, des études réalisées avant mon arrivée au laboratoire ont montré qu'Abca1 était exprimé et fonctionnel au niveau de la BHE, chez la Souris, permettant l'efflux cérébral de son substrat, le cholestérol (Do et al., 2011). Cette étude pose la question du rôle joué par les transporteurs de lipides au niveau de la BHE. Leur présence et leur fonction pourraient participer à l'homéostasie cérébrale des lipides et/ou à la physiopathologie de maladies neurodégénératives impliquant les lipides telles la maladie de Parkinson, la MA ou la maladie de Huntington (Di Paolo and Kim, 2011; Martín et al., 2014; Doria et al., 2016). Nos travaux démontrent qu'Abca1 n'est pas le seul transporteur de lipides présent au niveau de la BHE, et que deux autres transporteurs, Abcg4 et Abca2 sont également exprimés et fonctionnels au niveau de la membrane luminale des CECCs [Articles 1 et 2]. Nous avons identifié le cholestérol, le desmostérol et le peptide A $\beta$  comme substrats d'Abcg4 et le probucol, la L-thyroxine et l'estramustine comme inhibiteurs d'Abcg4 [Articles 1 et 3]. Ainsi, Abcg4 est, après Abca1, le deuxième transporteur de lipides fonctionnel identifié à la BHE murine. Ces deux transporteurs partagent un inhibiteur commun qui est le probucol (Favari et al., 2004; Do et al., 2012). Toutefois, ils semblent avoir des spécificités de substrats. Ainsi, contrairement à Abca1, Abcg4 peut prendre en charge le peptide A $\beta$  (Do et al., 2012) [Article 1]. A l'inverse, des études *in vivo* réalisées chez les souris *Abca1*<sup>-/-</sup> suggèrent que, contrairement à Abca1, le cholestérol ne serait que peu ou pas transporté par Abcg4. En effet, en l'absence d'Abca1 et malgré une surexpression d'Abcg4 chez ces souris, l'efflux du cholestérol est diminué et n'est plus inhibé par le probucol (Do et al., 2011). Cette faible contribution d'Abcg4 dans l'efflux cellulaire du cholestérol a également été montrée *in vitro* sur des cellules transfectées par *Abcg4* (Do et al., 2012). Enfin, nos études de modélisation

moléculaire suggèrent une plus grande affinité du desmostérol pour Abcg4 que le cholestérol [Article 1]. Ces résultats pris dans leur ensemble laissent penser que l'efflux du cholestérol et du desmostérol au niveau de la BHE chez la Souris serait respectivement assuré par Abca1 et Abcg4.

Nous avons pu également mettre en évidence qu'Abca2 est exprimé à la BHE, chez la Souris, avec une concentration protéique cependant plus faible que celles d'Abcb1 et d'Abcg2 [Article 2]. D'un point de vue fonctionnel, nos travaux indiquent que ce transporteur est fonctionnel à la BHE murine et que le peptide A $\beta$  en serait un substrat. Nos données démontrent aussi que le 17- $\beta$ -estradiol (E2) et l'estramustine en seraient des inhibiteurs [Articles 2 et 3]. Dans la littérature, E2 a été suggéré comme pouvant aussi être substrat d'ABCA2 (Mack et al., 2007a). Ce dernier a la particularité de posséder un motif signature des lipocalines, le motif L, au niveau duquel peuvent se fixer de petites molécules hydrophobes, tels des rétinoïdes, des stéroïdes ou encore des stérols (Terrisse et al., 1998; Mack et al., 2008). Il a également été montré que le peptide A $\beta$  et E2 avaient la capacité de se fixer à des lipocalines (Crow et al., 2009; Kumasaka et al., 2009). De plus, nos études de modélisation moléculaire ont montré que le peptide A $\beta$  pouvait se fixer dans la poche de liaison aux stérols d'Abcg4 [Article 1], suggérant une interaction possible du peptide A $\beta$  avec les sites de liaisons aux stérols. Ces observations nous amènent à penser qu'une compétition de liaison entre le peptide A $\beta$  et E2 pourrait être mise en place au niveau du motif L d'Abca2. Considérées dans leur ensemble, ces données font d'Abca2 un nouveau transporteur de lipides fonctionnel identifié à la BHE, chez la Souris. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'Abca2 n'avait pas d'effet sur les quantités et le transport du cholestérol circulant (Mack et al., 2008; Davis, 2011), ce qui suggère qu'à la BHE, l'efflux du cholestérol n'impliquerait pas Abca2. Par ailleurs, nous avons également mis en évidence qu'Abca2 ne transportait pas seulement des lipides à la BHE de la Souris, mais également une autre molécule endogène, le peptide A $\beta$  [Article 2]. Nous avons vu qu'Abca2 semble assurer 54% de l'efflux total du peptide A $\beta$  à travers la BHE [Article 3], suggérant une forte affinité entre Abca2 et le peptide A $\beta$ . Cependant, ABCA2 semble être plus exprimé dans les microvaisseaux chez l'Homme que chez la Souris (Shawahna et al., 2011; Uchida et al., 2011) [Article 2]. L'ensemble de ces données suggère donc que chez l'Homme, ABCA2 pourrait avoir un rôle majeur dans l'efflux

cérébral de molécules, dont le peptide A $\beta$ , montrant ainsi l'importance de poursuivre la caractérisation de ce transporteur à la BHE.

Notre premier travail a ainsi permis de compléter la cartographie des protéines ABC présentes et fonctionnelles au niveau de la BHE chez la Souris, en caractérisant deux transporteurs, Abcg4 et Abca2 [Figure 18]. Nos données mettent en évidence l'implication de ces deux protéines dans le transport de molécules endogènes à travers la BHE, montrant, de ce fait, l'importance de continuer à explorer leur fonctionnalité à la BHE dans des conditions physiologiques et aussi pathologiques chez la Souris mais également chez d'autres espèces, dont l'Homme.



**Figure 18 : Cartographie des transporteurs ABC exprimés à la BHE :** A] Schéma représentatif des transporteurs ABC exprimés à la BHE qui sont décrits dans la littérature (Mahringer and Fricker, 2016; Do et al., 2011). B] Schéma représentatif des transporteurs ABC exprimés à la BHE complété grâce à notre travail de doctorat. (CECC = cellule endothéliale des capillaires cérébraux).



## **2. Les acteurs de l'efflux cérébral du peptide A $\beta$ à travers la barrière hémato-encéphalique**

La première protéine identifiée comme participant à l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  à la BHE a été le récepteur LRP1 (Shibata et al., 2000). Son interaction avec ce peptide avait déjà été décrite *in vitro* dans les cellules musculaires lisses, les neurones ou les fibroblastes, au niveau desquels LRP1 permettait l'internalisation du peptide A $\beta$  (Narita et al., 1997; Urmoneit et al., 1997; Qiu et al., 1999). Une diminution de l'expression de LRP1 liée à l'âge a été montrée dans les capillaires cérébraux, chez les Rongeurs, les Primates et l'Homme. De plus, chez les patients atteints de la MA, cette diminution semblait être associée à une augmentation de l'accumulation cérébrale du peptide A $\beta$ , faisant de LRP1 un acteur important dans l'élimination du peptide A $\beta$  à travers la BHE (Zlokovic et al., 2010). Sa localisation cellulaire exacte à la BHE n'est pas encore certaine, mais LRP1 serait majoritairement exprimé du côté abluminal des CECCs, où il initierait la clairance cérébrale du peptide A $\beta$  en l'internalisant dans les CECCs (Ramanathan et al., 2015; Zhao et al., 2015). Cependant, l'expression de LRP1 au niveau des CECCs ainsi que son implication dans cet efflux ont été remises en cause par différentes études (Ito et al., 2006, 2010). Par exemple, dans un modèle cellulaire de BHE, il a été montré que LRP1 serait faiblement exprimé dans les CECCs, mais majoritairement dans les péricytes où il participerait à l'endocytose du peptide A $\beta$  (Candela et al., 2015). Néanmoins, une nouvelle lignée de souris a récemment été développée, dans laquelle l'expression de LRP1 a été éteinte spécifiquement dans les CECCs (Storck et al., 2016). Chez ces souris, une diminution de l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  a été mise en évidence, renforçant l'hypothèse du rôle de LRP1 dans l'initiation de l'efflux du peptide A $\beta$  à travers les CECCs.

Une fois dans les CECCs, le peptide A $\beta$  serait pris en charge par des transporteurs d'efflux localisés à la membrane luminale des CECCs, qui vont assurer l'élimination du peptide A $\beta$  de la BHE vers la circulation sanguine. A ce jour, les processus reliant l'internalisation du peptide A $\beta$  par LRP1 du côté abluminal des CECCs et l'efflux du peptide A $\beta$  vers le sang médié par les transporteurs ABC du côté luminal des CECCs sont encore inconnus. Néanmoins, dans les conditions physiologiques, le peptide A $\beta$  cérébral est soit dégradé par des enzymes, soit éliminé du cerveau *via*, notamment, la BHE. Une fois dans le sang, le peptide A $\beta$  serait pris en charge par la sLRP1 qui l'acheminerait vers le foie et le rein pour y

être dégradé. Cependant, la présence à la membrane luminale des CECCs de protéines participant à l'influx cérébral du peptide A $\beta$ , dont RAGE, suggère que ce peptide pourrait retraverser la BHE pour rejoindre le cerveau. Il a été montré que RAGE était surexprimé chez les patients atteints de la MA ainsi que dans des modèles de souris « Alzheimer » (Donahue et al., 2006; Jeynes and Provias, 2008; Do et al., 2015), ce qui pourrait en partie expliquer l'accumulation cérébrale du peptide A $\beta$  lors de la MA. Dans ce travail de doctorat, nous avons utilisé la technique de perfusion cérébrale *in situ* (PCIS) pour nos études *in vivo* sur le transport à la BHE. Son utilisation permet d'évaluer les mécanismes d'échanges au niveau de la membrane luminale des CECCs pour une molécule perfusée, donc provenant de la circulation artificielle et non du cerveau. Ainsi, lorsque nous avons étudié le transport du peptide A $\beta$  par la technique PCIS, nous avons regardé le devenir du peptide A $\beta$  circulant et non cérébral. Au vu de nos résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que les transporteurs ABC pourraient protéger le cerveau en assurant l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  circulant, afin de l'empêcher de pénétrer à nouveau dans le parenchyme cérébral. Les résultats obtenus par Do et al. appuient cette hypothèse, en montrant qu'en réponse à une augmentation de RAGE, l'expression d'Abcg4, d'Abca1, d'Abcb1 et d'Abcg2 était également augmentée afin de compenser l'augmentation de l'influx du peptide A $\beta$  (Do et al., 2015).

Dans la littérature, les principaux transporteurs ABC décrits comme assurant l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  vers le sang sont ABCB1 et ABCG2 (Pahnke et al., 2014). ABCB1 a été le premier transporteur ABC identifié et étudié pour son rôle dans le transport du peptide A $\beta$  (Lam et al., 2001). Il a longtemps été décrit comme étant le principal transporteur ABC impliqué dans cet efflux, malgré la publication de résultats contradictoires (Pahnke et al., 2014). De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* ont permis de démontrer qu'ABCB1 participait bien à la clairance cérébrale du peptide A $\beta$  et qu'il empêchait également que ce peptide ne rejoigne à nouveau le cerveau (Abuznait and Kaddoumi, 2012; Qosa et al., 2015). Il a notamment été montré que l'expression et l'activité d'ABCB1 étaient diminuées dans les capillaires cérébraux associés à des dépôts de peptides A $\beta$ , chez des personnes âgées non-démentes ou atteintes de la MA ou encore dans des modèles murins de la MA (Vogelgesang et al., 2002; Hartz et al., 2010; Mehta et al., 2013; Deo et al., 2014; Provias and Jeynes, 2014). Pourtant, d'autres études n'ont pas observé d'effet d'ABCB1 sur l'efflux cérébral du peptide A $\beta$ . En effet, des études réalisées sur des cellules surexprimant ABCB1, n'ont montré

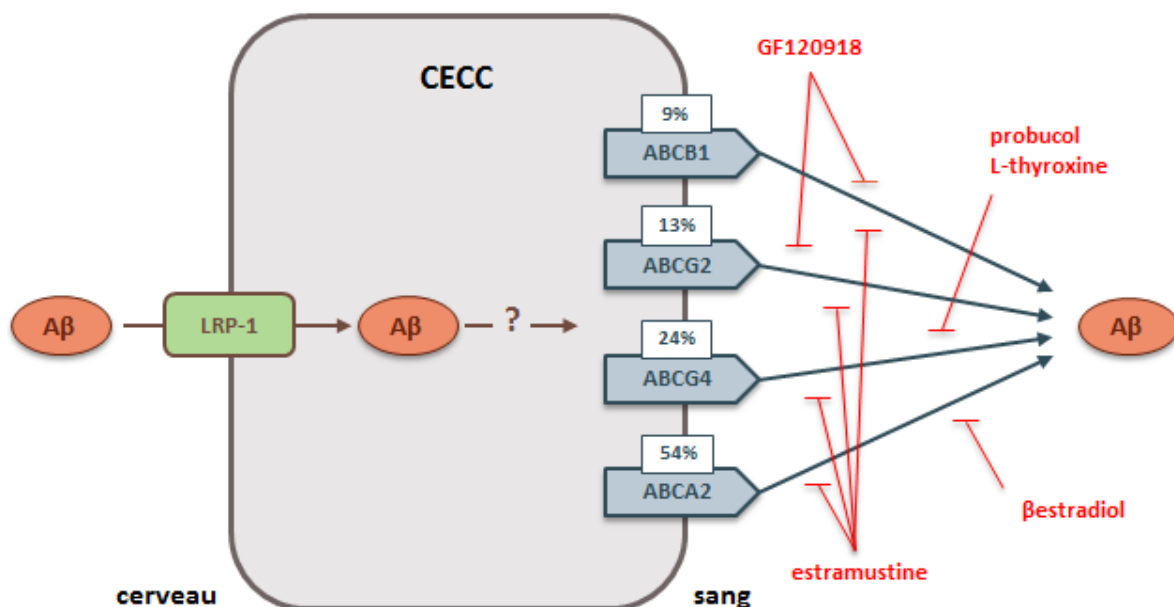
aucun effet sur le transport du peptide A $\beta$ , ni augmentation de l'activité ATPasique au niveau membranaire en présence de peptides A $\beta$  (Nazer et al., 2008; Bello and Salerno, 2015). Chez le rat, l'administration de deux inhibiteurs d'Abcb1, la quinidine et le vérapamil, n'a eu aucune incidence sur l'élimination cérébrale du peptide A $\beta$  (Ito et al., 2006). Nos travaux montrent qu'Abcb1 est bien impliqué dans l'efflux du peptide A $\beta$  mais qu'il n'en est cependant pas le transporteur majoritaire. En effet, l'implication d'Abcb1 dans ce transport ne représente que 9% de l'efflux total du peptide A $\beta$  à travers la BHE chez la souris [Article 3]. Cette faible contribution d'Abcb1 à l'efflux total du peptide A $\beta$  à travers la BHE pourrait en partie expliquer les résultats contradictoires obtenus dans les différentes études déjà menées.

ABCB1 et ABCG2 partageant un grand nombre de substrats (Kodaira et al., 2010), il a été suggéré qu'ABCG2 pourrait, au même titre qu'ABCB1, participer à l'efflux du peptide A $\beta$  au niveau de la BHE. Différents travaux ont confirmé que le peptide A $\beta$  était bien un substrat d'ABCG2 à la BHE (pour revue voir Abuznait and Kaddoumi, 2012). Shen et al. ont montré, chez des souris n'exprimant plus *Abcg2*, une accumulation cérébrale de peptides A $\beta$ , suggérant qu'Abcg2 participait à la limitation de l'entrée de ce peptide du sang vers le cerveau, *via* la BHE (Shen et al., 2010). Des études réalisées dans notre laboratoire ont mis en évidence l'implication d'Abcg2 dans l'efflux du peptide A $\beta$  chez la Souris et sur des cellules transfectées par *Abcg2* (Do et al., 2012). De plus, des modifications d'expression d'ABCG2 ont été observées dans la MA (Pahnke et al., 2014). Ainsi, une surexpression d'ABCG2 a été montrée dans les capillaires cérébraux de patients atteints de la MA ayant développé une CAA (Xiong et al., 2009). Dans cette pathologie, le peptide A $\beta$  s'accumule dans la paroi des vaisseaux cérébraux (Schrag and Kirshner, 2016). Il a été proposé que la surexpression d'ABCG2 pourrait correspondre à la mise en place d'un mécanisme de compensation de la diminution d'ABCB1 dans les vaisseaux cérébraux proches des zones où s'accumulent les peptides A $\beta$  (Abuznait and Kaddoumi, 2012). Cependant, l'implication d'ABCG2 dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  est aussi controversée (Wolf et al., 2012; Pahnke et al., 2014; Qosa et al., 2015). Par exemple, aucune différence d'expression d'ABCG2 n'a été constatée *in vitro* dans des cellules en présence de peptides A $\beta$  ou chez des patients atteints de la MA comparés à des personnes saines (Wijesuriya et al., 2010; Kania et al., 2011). Il a été également montré que dans un modèle murin de la MA (APP/PS1)

déficient en *Abcg2*, l'accumulation de peptides A $\beta$  n'était pas augmentée par rapport aux souris contrôles (Krohn et al., 2011). Ce dernier résultat pourrait cependant s'expliquer par l'existence d'une coopération entre plusieurs transporteurs au niveau de la BHE pour effluer le peptide A $\beta$ . Une telle collaboration a été décrite à plusieurs reprises entre ABCB1 et ABCG2 pour d'autres substrats que le peptide A $\beta$ ; elle permettrait d'assurer l'efflux de ces substrats même en l'absence de l'un ou l'autre de ces deux transporteurs (de Vries et al., 2007; Polli et al., 2009; Kodaira et al., 2010; Agarwal and Elmquist, 2012). Nos travaux mettent en évidence l'existence d'une telle coopération pour le peptide A $\beta$ . Ainsi, la mesure de la clairance d'entrée cérébrale du peptide A $\beta$  est la même chez les souris WT et les souris déficientes en *Abcb1*, *Abcb1/Abcg2* ou encore *Abcg4* [Articles 1, 2 et 3] montrant que l'absence d'un transporteur ne suffit pas pour modifier le niveau d'efflux cérébral du peptide A $\beta$ . En revanche, lorsque tous les transporteurs sont simultanément éteints par des combinaisons d'extinction chimique et génétique, la clairance d'entrée cérébrale du peptide A $\beta$  est multipliée par neuf [Article 3]. Nos travaux mettent ainsi en évidence la difficulté de conclure sur l'implication d'un transporteur dans le transport d'un substrat à travers la BHE, lorsque ce substrat est commun à plusieurs transporteurs. Il peut être nécessaire d'inhiber le transporteur majoritaire pour mettre en évidence le ou les autres transporteurs (Agarwal and Elmquist, 2012; Chapy et al., 2015). Les travaux d'Agarwal et al. suggèrent, de plus, que la contribution de chacun des transporteurs impliqués dans l'efflux d'un même substrat ne dépend pas uniquement du niveau d'expression des transporteurs, mais aussi de l'affinité du substrat pour chacun des transporteurs ; le transporteur jouant le plus grand rôle dans l'efflux du substrat est alors celui pour lequel l'affinité du substrat est la meilleure (Agarwal et al., 2011; Wang et al., 2012). En accord avec ces observations, nos travaux suggèrent que l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  est à 80% assuré par *Abcg4* et *Abca2*, transporteurs dont les niveaux d'expression au niveau de la BHE chez la Souris sont bien plus faibles que ceux d'*Abcb1* et d'*Abcg2* (Ohtsuki et al., 2004; Shawahna et al., 2011) [Articles 1, 2 et 3]. Nos résultats suggèrent donc une meilleure affinité du peptide A $\beta$  pour *Abcg4* et *Abca2* que pour *Abcb1* et *Abcg2*.

En conclusion, nos travaux ont identifié deux nouveaux acteurs impliqués dans le transport cérébral du peptide A $\beta$  à travers la BHE : *Abcg4* et *Abca2*. Ces résultats mettent en évidence que le transport du peptide A $\beta$  à travers la BHE est un processus complexe impliquant au

moins quatre transporteurs ABC dont les contributions individuelles sont additionnelles [Article 3 et Figure 19]. Ainsi, les contributions respectives d'Abcb1, Abcg2, Abcg4 et Abca2 dans l'efflux du peptide A $\beta$  à travers la BHE chez la Souris sont de 9%, 13%, 24% et 54%. Ces résultats mettent donc en évidence des rôles minoritaires pour Abcb1 et Abcg2 dans l'efflux du peptide A $\beta$  à travers la BHE chez la souris par rapport à Abcg4 et Abca2, qui, à eux deux, sont responsables d'environ 80% de l'efflux cérébral d'A $\beta$  [Article 3 et Figure 19]. Cependant, dans la littérature, l'implication d'un autre transporteur ABC, Abcc1 (ou MRP1) a été suggéré dans la clairance cérébrale du peptide A $\beta$  à la BHE (Krohn et al., 2015). Une étude a montré que dans un modèle de souris « Alzheimer » (APP/PS1) déficient en *Abcc1*, l'absence de ce transporteur était liée à une augmentation de la quantité cérébrale du peptide A $\beta$ , sans modification de la production de ce peptide. De plus, la présence de thiéthylpérazine, un activateur d'Abcc1, était associée à une diminution de peptides A $\beta$  chez ces souris (Krohn et al., 2011). Cependant, la présence d'Abcc1 à la BHE chez la souris reste encore controversée (Abuznait and Kaddoumi, 2012), suggérant que le rôle possible de ce transporteur dans l'efflux du peptide A $\beta$  pourrait se faire à une autre interface cérébrale, comme la barrière hémato-liquidienne.



**Figure 19 : Schéma représentant les différents acteurs impliqués dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  à travers la BHE.** Les traits rouges correspondent aux effets inhibiteurs identifiés de l'efflux du peptide A $\beta$  médié par un ou plusieurs transporteurs ABC à la BHE. Les pourcentages correspondent à la contribution de chacun des transporteurs ABC dans l'efflux total du peptide A $\beta$ . (CECC = cellule endothéliale des capillaires cérébraux)

### **3. L-thyroxine et 17- $\beta$ -estradiol : des facteurs de risque potentiels pour le développement de la maladie d'Alzheimer ?**

Nos travaux nous ont permis d'identifier de nouveaux inhibiteurs de l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  et également d'identifier le ou les transporteurs ciblés par l'inhibition. La T<sub>4</sub> est une hormone thyroïdienne qui participe à la régulation du métabolisme énergétique de l'organisme. Dans la littérature, des liens controversés ont été suggérés entre cette molécule endogène et la MA. Un effet protecteur de la T<sub>4</sub> vis-à-vis de la MA a été décrit dans différentes études (Belakavadi et al., 2011). Fu et coll. ont montré qu'un traitement à base de T<sub>4</sub> protégeait contre un déficit cognitif et améliorait la mémoire dans un modèle murin de la MA (Fu et al., 2010). A l'inverse, une hypothyroïdie ou encore une hyperthyroïdie semblent être des facteurs de risque potentiels dans la physiopathologie de la MA (Kalmijn et al., 2000; Tan et al., 2008; Johansson et al., 2013; Yong-Hong et al., 2013). Notre équipe avait montré que la T<sub>4</sub> augmentait la Cl<sub>up</sub> du peptide [<sup>3</sup>H]-A $\beta$ <sub>1-40</sub> en inhibant un ou plusieurs acteurs de son efflux (Do et al., 2013). Nous avons montré, chez la Souris, que la T<sub>4</sub> inhibait l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  médié par Abcg4 au niveau de la BHE. Si un tel effet peut être retrouvé chez l'Homme, ces observations nous amènent à penser qu'une hyperthyroïdie et/ou un traitement chronique par des hormones thyroïdiennes pourraient participer à l'accumulation cérébrale du peptide A $\beta$  en inhibant son efflux cérébral, et par conséquent, représenter un facteur de risque potentiel dans la MA. Cette hypothèse est en accord avec plusieurs études dans lesquelles une augmentation des concentrations plasmatiques de T<sub>4</sub> est décrite comme pouvant potentiellement participer à la physiopathologie de la MA. En effet, il a été constaté qu'une augmentation de la concentration de T<sub>4</sub> était en corrélation avec un nombre augmenté de plaques amyloïdes et de NFTs (de Jong et al., 2009). De plus, une étude réalisée chez des personnes atteintes de la MA a montré une diminution de la thyroïdostimuline, suggérant que l'hyperthyroïdie subclinique serait un facteur de risque de la MA (Agarwal et al., 2013). Des études complémentaires sont nécessaires afin de mieux comprendre l'interaction entre la MA, la T<sub>4</sub> et Abcg4, notamment au niveau de la BHE.

L'E2 est un œstrogène issu du métabolisme du cholestérol qui possède un rôle majeur dans le maintien des caractères sexuels chez la femme. Cette hormone est décrite comme ayant des effets neuroprotecteurs notamment en diminuant la production du peptide A $\beta$  ou en

protégeant contre l'apoptose et le stress oxydant (Amtul et al., 2010). D'un point de vue épidémiologique, la MA touche plus fréquemment les femmes que les hommes (Grimm et al., 2012; Irvine et al., 2012). Il a été suggéré que cette différence entre les deux sexes serait due à une diminution liée à l'âge des quantités d'œstrogènes chez la femme, faisant de ces hormones un facteur de risque dans le développement de la MA (Vest and Pike, 2013). Un rôle bénéfique des thérapies hormonales substitutives (THS) a été suggéré dans la prévention ou le traitement de la MA. Cependant, des conclusions contradictoires ont été rapportées dans les différentes études : alors que certains résultats montraient un rôle bénéfique des THS, d'autres n'observaient aucun effet (Barron and Pike, 2012; Pines, 2016). Ces disparités seraient dues à l'âge de début et à la durée des THS qui ne seraient pas les mêmes dans les différentes études. Whitmer et al. ont montré que chez la femme âgée d'environ 50 ans, la THS peut avoir un effet protecteur dans les déficits cognitifs, alors que chez la femme âgée de plus de 80 ans environ, la THS peut au contraire augmenter le risque de démence (Whitmer et al., 2011). Il est important de spécifier que pour ces différentes études, les cohortes utilisées étaient constituées de femmes saines et non de femmes atteintes de la MA. Nous avons montré un effet inhibiteur d'E2 administré par perfusion sur l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  à la BHE chez la Souris sauvage. Nos résultats suggèrent que chez les patients âgés atteints de la MA, la prise d'hormones stéroïdiennes pourrait être impliquée dans l'accumulation cérébrale du peptide A $\beta$  en inhibant son efflux cérébral. Des expériences complémentaires consistant à évaluer l'effet d'E2 sur le transport du peptide A $\beta$  à travers la BHE chez des modèles de souris MA permettraient de confirmer ces résultats. Il paraît néanmoins important de poursuivre l'étude de l'implication des hormones stéroïdiennes et/ou THS dans la MA.

---

## CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

---

Notre travail nous a permis de caractériser à la BHE chez la Souris, deux transporteurs de lipides, qui sont *Abcg4* et *Abca2*, montrant ainsi qu'*Abca1* n'est pas l'unique transporteur de lipides présent à la BHE. Nous avons montré qu'*Abcg4* est fonctionnel à la membrane luminale des CECCs. Toutefois, des études complémentaires utilisant notamment l'imagerie confocale et/ou des souris *Abca2*<sup>-/-</sup> sont nécessaires pour confirmer la localisation d'*Abca2* à la BHE. Nous avons mis en évidence qu'*Abcg4* et *Abca2* étaient tous deux impliqués dans l'efflux de molécules endogènes à travers la BHE, tels les lipides, ce qui pourrait leur conférer un rôle dans l'homéostasie cérébrale de lipides. Grâce à notre travail, nous avons pu identifier des substrats et inhibiteurs pour *Abcg4* et *Abca2*. Nous avons montré qu'à la BHE, *Abcg4* assurait l'efflux du desmostérol et du peptide A $\beta$ , et que le probucol, la T<sub>4</sub> et l'estramustine pouvaient inhiber sa fonction. De plus, le peptide A $\beta$ , l'E2 et l'estramustine sont tous les trois substrats et/ou inhibiteurs d'*Abca2*. Par ailleurs, nous avons pu identifier *Abcg4* et *Abca2* comme deux nouveaux acteurs impliqués dans l'efflux cérébral du peptide A $\beta$  à travers la BHE, montrant ainsi qu'à la BHE, le transport du peptide A $\beta$  est un processus complexe, qui implique au moins *Abcb1*, *Abcg2*, *Abcg4* et *Abca2*. De plus, nous avons vu qu'à la BHE, *Abcg4* et *Abca2* assurent à eux deux environ 80% de l'efflux total du peptide A $\beta$ . Cette donnée montre d'une part que les rôles d'*Abcb1* et d'*Abcg2* ne sont que minoritaires et d'autre part l'importance d'*Abcg4* et d'*Abca2* dans l'élimination du peptide A $\beta$  au niveau de la BHE. Au vu de nos résultats, nous avons posé l'hypothèse que ces deux transporteurs pourraient limiter l'accumulation cérébrale du peptide A $\beta$  en l'empêchant de retraverser la BHE pour rejoindre le cerveau. Ce qui fait d'*Abcg4* et d'*Abca2* de potentielles cibles thérapeutiques intéressantes dans la MA. Cette hypothèse pourrait être testée *in vivo*, chez des souris « Alzheimer » en étudiant notamment l'effet d'une modulation d'*Abcg4* et/ou d'*Abca2* sur l'accumulation cérébrale de peptides A $\beta$  chez ces souris, pour déterminer si une inhibition précoce d'*Abcg4* et/ou d'*Abca2* aggraverait la MA ou au contraire si une stimulation de ces deux transporteurs entrainerait une régression de la pathologie. De plus, parmi les substrats et/ou inhibiteurs d'*Abcg4* et d'*Abca2* qui interagissent avec le peptide A $\beta$ , certains sont en lien étroit avec le cholestérol. En effet, le desmostérol et l'E2 sont respectivement précurseur et métabolite du cholestérol. Cela renforce les liens existants



entre le cholestérol et la MA en apportant une nouvelle hypothèse, celle d'interactions entre les précurseurs ou les dérivés du cholestérol et le peptide A $\beta$  au niveau de leur transport à travers la BHE. Il paraît donc nécessaire de continuer d'explorer ces interactions afin de mieux comprendre le lien entre l'homéostasie du cholestérol et le développement de la MA.

D'autre part, nos différentes études ont toutes été réalisées dans des conditions physiologiques chez la Souris. Il serait intéressant d'évaluer le transport du peptide A $\beta$  dans des conditions pathologiques de la MA, notamment en présence ou non des différents inhibiteurs identifiés pour l'efflux du peptide A $\beta$  à la BHE ; cette étude peut être réalisée en utilisant des modèles murins de la MA. Nos données incitent également à explorer l'impact des transporteurs impliqués dans l'efflux du peptide A $\beta$  chez l'Homme. Une quantification protéomique de ces transporteurs est envisagée dans les cerveaux de patients atteints de la MA comparés à des personnes saines, grâce à une collaboration avec la startup Brain Plotting (N. Perrière, Institut du Cerveau et de la Moëlle Epinière, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, Paris), qui a accès à une banque de cerveaux. De plus, nous avons montré un lien entre la MA et la T<sub>4</sub> par son inhibition de l'efflux du peptide A $\beta$  médié par Abcg4 à la BHE, chez la Souris, ce qui pourrait correspondre à l'un des mécanismes impliquant l'hyperthyroïdie et/ou un traitement chronique par des hormones thyroïdiennes dans la physiopathologie de la MA. Cette hypothèse pourrait être vérifiée *in vivo* en étudiant l'impact d'un traitement chronique précoce (dès le sevrage) et/ou tardif par des hormones thyroïdiennes chez des souris sauvages et des souris « Alzheimer ». En clinique, nous pourrions, en collaboration avec le CMRR Paris-Nord, étudier la relation entre les concentrations plasmatiques de T<sub>4</sub> et les concentrations de peptides A $\beta$  dans le liquide céphalo-rachidien, en exploitant les données disponibles dans la cohorte de patients atteints de la MA.

En conclusion, notre travail de doctorat a permis de compléter la cartographie des transporteurs ABC exprimés et fonctionnels à la BHE chez la souris. Nous avons montré le rôle important des transporteurs Abcg4 et Abca2 dans l'efflux de lipides et du peptide A $\beta$  à travers la BHE, démontrant l'importance de poursuivre les études sur ces transporteurs et ouvrant de nouvelles perspectives thérapeutiques dans la MA.

---

# ANNEXE

---

# Oatp1a4 and an L-Thyroxine-Sensitive Transporter Mediate the Mouse Blood-Brain Barrier Transport of Amyloid- $\beta$ Peptide

Tuan Minh Do<sup>a</sup>, Beatrice Bedussi<sup>b</sup>, Stéphanie Chasseigneaux<sup>b</sup>, Agnès Dodacki<sup>b</sup>, Cédric Yapo<sup>b</sup>,  
Hélène Chacun<sup>c</sup>, Jean-Michel Scherrmann<sup>b</sup>, Robert Farinotti<sup>a</sup> and Fanchon Bourasset<sup>b,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de pharmacie clinique et pharmacocinétique, EA 4123, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

<sup>b</sup>INSERM U705, UMR CNRS 8206, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, Paris, France

<sup>c</sup>UMR CNRS 8612, Université Paris-Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

Handling Associate Editor: Othman Ghribi

Accepted 5 April 2013

**Abstract.** The influx of amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) across the blood-brain barrier is partly mediated by the receptor for advanced glycation end products (RAGE). But other transporters, like Oatp (organic anion transporter polypeptide, SLC21) transporters, could also be involved. We used *in situ* brain perfusion to show that rosuvastatin and taurocholate, two established Oatp1a4 substrates, decreased (5-fold) the Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]A $\beta$  while L-thyroxine increased it (5.5-fold). We demonstrated an interaction between A $\beta$  and Oatp1a4 by co-immunoprecipitation and western blotting experiments, supporting the hypothesis that the rosuvastatin- and taurocholate-sensitive transporter was Oatp1a4. In conclusion, our results suggest that, in mice, the brain uptake of A $\beta$  is partly mediated by Oatp1a4 and that L-thyroxine may play a crucial role in the inhibition of brain A $\beta$  clearance.

**Keywords:** Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$  peptide, blood-brain barrier, *in situ* brain perfusion, L-thyroxine, Oatp1a4, rosuvastatin

## INTRODUCTION

Amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) may accumulate in the brains of patients suffering from Alzheimer's disease (AD) because its clearance is defective rather than because its formation is increased, as suggested by recent human and animal studies [1, 2]. The enormous surface area of the blood-brain barrier (BBB) for solute

exchange makes it by far the most important pathway for the uptake and removal of A $\beta$ . It is thus essential to determine the mechanisms underlying the transport of A $\beta$  across the BBB.

We and others have shown recently that the efflux of A $\beta$  across the BBB can be mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP-1) [3, 4] and several ATP-binding Cassette (ABC) transporters (ABCB1, ABCG2, and ABCG4) [5–11]. The receptor for advanced glycosylation end products (RAGE) is the only transporter known to mediate the influx of A $\beta$  [6, 12]. But RAGE may not be responsible for the total blood-to-brain transport of A $\beta$ ; other, as yet unidentified, transporters are probably involved in the influx of A $\beta$  [6, 13].

\*Correspondence to: Fanchon Bourasset, PharmD, PhD, INSERM U705, CNRS UMR 8206, Université Paris Descartes, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 4 avenue de l'Observatoire 75270 Paris Cedex 06, France. Tel.: +33 1 53 73 98 59; Fax: +33 1 40 05 43 42; E-mail: fanchon.bourasset@parisdescartes.fr.

The cholesterol reducing agents, statins, may help to prevent AD [14–16]. Their beneficial effects could be due to their ability to reduce serum cholesterol, but other mechanisms have also been suggested [15, 17]. Statins are potent substrates for the organic anion transporting polypeptides (OATP) and their hepatic uptake is dramatically dependent on OATP transport [18]. Members of this transporter family, OATP1A2/SLCO1A2 (*Oatp1a4/Slco1a4* in mice) and OATP14 (*Oatp14/Slc21a14* in mice), are present on the luminal and abluminal sides of brain capillary endothelial cells (BCECs), which constitute the first cellular layer of the BBB [19–21]. *Oatp1a4* transports substrates like taurocholate, rosuvastatin, pitavastatin, [D-penicillamine(2,5)]-enkephalin (DPDPE), and digoxin [20]. *Oatp14* transports thyroid hormones like L-thyroxine ( $T_4$ ) and, to a lesser extent, taurocholate and some statins [19, 22]. Our working hypothesis is that statins interfere directly with the transport of  $A\beta$ , through *Oatp1a4* and/or *Oatp14*, at the luminal side of the mouse BBB. We therefore measured the influence of inhibitors of *Oatp1a4* and/or *Oatp14* (taurocholate, rosuvastatin, digoxin, L-thyroxine) on the mouse brain uptake of [ $^3H$ ] $A\beta_{1-40}$ , by using the *in situ* brain perfusion technique, which allows a direct exposure of solutes at the BBB.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Male 8-week-old C57BL/6 mice were obtained from Janvier (Le Genest Saint Isle, France). They had free access to standard laboratory food and water and were kept on a 12 h light-dark cycle at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  for at least 5 days before being used. All studies on animals and their care complied with the EEC guidelines for the care and use of laboratory animals (Official Journal of the European Community, 18/2/86-authorization L3600).

### Reagents

[ $^3H$ ] $A\beta_{1-40}$  (15 Ci/mmol) was purchased from Hartmann Analytic (Braunschweig, Germany). [ $^{14}C$ ]sucrose (588.0 mCi/mmol), liquid scintillation cocktail Ultima Gold®, and Soluene® were purchased from Perkin Elmer Life Sciences (Courtaboeuf, France). Taurocholate, digoxin, L-thyroxine, and unlabeled  $A\beta_{1-40}$  were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Rosuvastatin was

from Astra-Zeneca (France). Rabbit anti-*Oatp1a4* polyclonal antibody (clone M-50) was purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Mouse anti- $A\beta_{1-40}$  monoclonal antibody (clone 6E10) was purchased from Covance (Dedham, MA, USA). Species-specific horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were purchased from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). All the other chemicals were commercial products of reagent grade.

### *In situ* brain perfusion

This technique measures the blood-brain uptake ( $Cl_{up}$ ) of molecules at the luminal side of the brain endothelial cells. The resulting  $Cl_{up}$  integrates the enhancing or limiting factors introduced by the transporters located at the luminal side of BCECs [23]. Thus, this technique enabled us to use transporter inhibitors to determine whether or not a given transporter was involved. An increase in  $Cl_{up}$  when a transporter inhibitor is added indicates that the transporter concerned is an efflux carrier involved in the transport of the molecule studied at the BBB. Similarly, a decrease in the  $Cl_{up}$  when a transporter inhibitor is added indicates that the transporter concerned is an influx carrier involved in the transport of the molecule at the BBB.

### Surgery and perfusion

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of xylazine/ketamine (8/140 mg/kg). The appropriate arteries were ligatured and the right common carotid artery was catheterized with polyethylene tubing. The heart was cut and perfusion started immediately at a flow rate of 2.5 ml/min (infusion pump PHD 2000; Harvard Apparatus, Les Ulis, France). The perfusion fluid was bicarbonate-buffered physiological saline (128 mM NaCl, 24 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 4.2 mM KCl, 2.4 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0.9 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 9 mM D-glucose). The fluid was warmed to  $37^\circ\text{C}$  and gassed with 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$  to keep the pH at 7.4. Each mouse was perfused for 30 s with [ $^3H$ ] $A\beta_{1-40}$  (0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) and [ $^{14}C$ ]sucrose (0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) to check the physical integrity of the BBB. Unlabeled substrates (digoxin (50  $\mu\text{M}$ ), taurocholate (1 mM), rosuvastatin (25  $\mu\text{M}$ ), and L-thyroxine (10  $\mu\text{M}$ )) were added to the perfusate when appropriate. The stock solutions of unlabeled substrates were prepared in water or DMSO (<0.5% final in perfusate). Each treatment used

4–8 mice. Perfusion was terminated by decapitating the mouse. Tissue samples were digested in 1 ml of Soluene at 50°C and mixed with 10 ml Ultima Gold scintillation cocktail. The labels were counted simultaneously in a scintillation counter (Tricarb, Perkin Elmer, Courtaboeuf, France).

#### Calculation of BBB transport parameters [24]

The brain vascular volume of each mouse ( $V_{\text{vasc}}$ ,  $\mu\text{l/g}$ ) was estimated from the tissue distribution of [ $^{14}\text{C}$ ]sucrose, which does not measurably cross the BBB during short perfusions, by dividing the amount of [ $^{14}\text{C}$ ]sucrose (dpm/g) in the right brain hemisphere by the concentration of [ $^{14}\text{C}$ ]sucrose in the perfusion fluid (dpm/ $\mu\text{l}$ ). All the values were under 20  $\mu\text{l/g}$ , indicating that the BBB was intact during each experiment.

The apparent tissue distribution volume ( $V_{\text{brain}}$ ,  $\mu\text{l/g}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  was calculated from the amount of radioactivity in the right brain hemisphere using the following equation:

$$V_{\text{brain}} = X_{\text{brain}}/C_{\text{perf}}$$

where  $C_{\text{perf}}$  (dpm/ $\mu\text{l}$ ) is the concentration of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  in the perfusion fluid, and  $X_{\text{brain}}$  (dpm/g) is the calculated amount of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  in the right cerebral parenchyma, corrected for vascular contamination with the following equation:  $X_{\text{brain}} = X_{\text{tot}} - (V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}})$ , where  $X_{\text{tot}}$  (dpm/g) is the total amount of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  measured in the brain tissue sample (vascular+extravascular). Brain uptake clearance, expressed as  $Cl_{\text{up}}$  ( $\mu\text{l/g/s}$ ), was calculated by dividing  $V_{\text{brain}}$  by the perfusion time (s).

#### Co-immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation from A $\beta$  perfused mouse brain was performed using Crosslink Immunoprecipitation (IP) Kit (Pierce, Brebieres, France) following manufacturer's instruction. Briefly, 10  $\mu\text{g}$  of Oatp1a4 antibody were coupled to the Protein A/G Plus Agarose column. Then antibody was bound covalently to the resin using the DSS crosslinker. The A $\beta$  perfused cerebral hemisphere was homogenized in Krebs's buffer containing 1X Complete protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Switzerland) using 15–20 up-and-down strokes in a manual Potter homogenizer. To increase the linking between Oatp1a4 and A $\beta$ , the homogenate was incubated with 50  $\mu\text{g}$  of human A $\beta$  on a rotating wheel for 15 min at room temperature. Then the

homogenate was centrifuged for 5 min at 2500  $g$ , the supernatant was removed and the pellet suspended in 2 ml of IP buffer (150 mM NaCl, 10 mM Hepes, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1% Triton X100, and 1X Complete protease inhibitor cocktail) on a rotating wheel for 30 min at 4°C. Sample was then centrifuged for 10 min at 13000  $g$  at 4°C, and protein concentration was measured in the supernatant. One mg of the supernatant was then transferred to a fresh tube and pre-cleared by incubation with 80  $\mu\text{l}$  of the Control Agarose Resin Slurry from the Crosslink Immunoprecipitation Kit. After 1 h incubation on a rotating wheel at 4°C, the column was centrifuged, and the pre-cleared lysate was added to the Oatp1a4 antibody-crosslinked resin overnight at 4°C on a rotating wheel. The column was then centrifuged and washed four times with the IP buffer omitted Triton X100 in the last washing. The co-IP complex was then eluted with 30  $\mu\text{l}$  of Elution buffer from the Crosslink Immunoprecipitation Kit in a tube previously filled out with 5  $\mu\text{l}$  of 1 M Tris buffer pH 9.5 to neutralize the low pH of the Elution buffer. In parallel, a negative control co-IP was done using a column without linked antibody.

#### Western blot

Co-IP eluates were separated by SDS-PAGE using a 4–20% Precise Tris-Glycine Gel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), and the separated proteins were transferred to a PVDF membrane (Immobilon, Millipore, Billerica, MA, USA). After blocking with 5% non-fat milk in Tris-buffered saline containing 0.2% Tween 20, the membrane was immunoblotted by incubation overnight at 4°C with mouse monoclonal antibody 6E10 against A $\beta$ . After washings, the membrane was incubated for 1 h at room temperature with HRP-conjugated anti-mouse IgG, then washed and exposed to Immobilon-Star WesternC Chemiluminescence Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Signals were revealed using the Bio-Rad Chemidoc XRS imaging device. The membrane was then stripped and re-probed with rabbit anti-Oatp1a4 polyclonal antibody (M-50) then with HRP-conjugated anti-rabbit IgG.

#### Statistical analysis

The results are expressed as means  $\pm$  S.D. Samples were compared by Student's *t* test or by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Newman-Keuls *post hoc* test, when appropriate. Differences

were considered to be statistically significant when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### *Effect of taurocholate, rosuvastatin, and digoxin on the brain uptake clearance of [ $^3$ H]A $\beta_{1-40}$*

We investigated the role of taurocholate, rosuvastatin, and digoxin on the blood-brain uptake of [ $^3$ H]A $\beta_{1-40}$  in C57BL/6 mice, using the *in situ* brain perfusion technique. Adding taurocholate (1 mM) and rosuvastatin (25  $\mu$ M) to the perfusion fluid significantly decreased the [ $^3$ H]A $\beta_{1-40}$   $Cl_{up}$  by 72% and 60%, respectively (Fig. 1A). Digoxin (50  $\mu$ M) had no effect (Fig. 1A). These results suggested that one or several transporters, sensitive to taurocholate and rosuvastatin, are involved in the blood-to-brain influx of A $\beta_{1-40}$ .

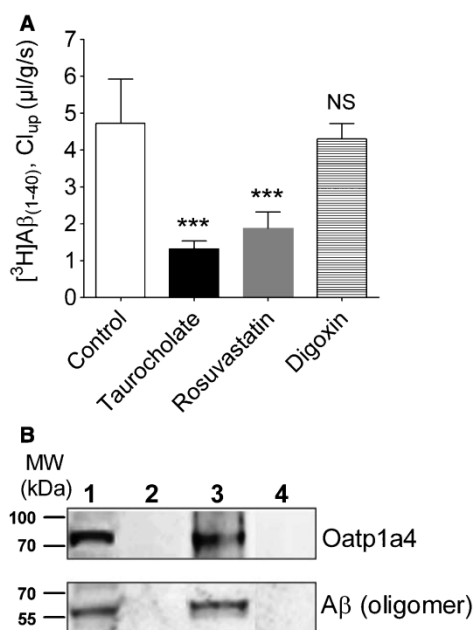


Fig. 1. Involvement of Oatp1a4 in the transport of A $\beta_{1-40}$  at the mouse BBB. A) Brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ,  $\mu$ l/g/s) of [ $^3$ H]A $\beta_{1-40}$  measured by *in situ* brain perfusion in C57BL/6 mice, in the absence (control) or presence of taurocholate (1 mM), rosuvastatin (25  $\mu$ M), or digoxin (50  $\mu$ M). Data are means  $\pm$  S.D. of 4–8 mice, \*\*\* $p < 0.001$ . B) Western blot revealing the co-IP of A $\beta_{1-40}$  perfused mouse brains with Oatp1a4. Lane 1: A $\beta_{1-40}$  perfused mouse brain. Lane 2: negative control co-IP (no anti-Oatp1a4 antibody linked to the beads). Lane 3: co-IP experiments. Lane 4: non-specific control of co-IP. Lanes 1, 2, 3: western blot membrane was probed with anti-Oatp1a4 antibody (upper panel) or anti-A $\beta$  antibody 6E10 (lower panel), followed by HRP secondary antibodies. Lane 4: western blot membrane was probed solely with HRP secondary antibodies.

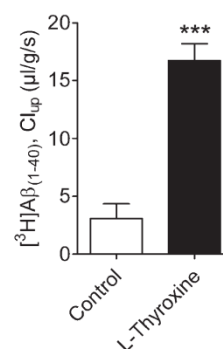


Fig. 2. Brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ,  $\mu$ l/g/s) of [ $^3$ H]A $\beta_{1-40}$  measured by *in situ* brain perfusion in C57BL/6 mice, in the absence (control) or presence of L-thyroxine (10  $\mu$ M). Data are means  $\pm$  S.D. of 6 mice. \*\*\* $p < 0.001$ .

### *Effect of L-thyroxine on the mouse brain uptake clearance of [ $^3$ H]A $\beta_{1-40}$*

Adding L-thyroxine to the perfusate increased the [ $^3$ H]A $\beta_{1-40}$   $Cl_{up}$  by 5.5 folds (Fig. 2), suggesting that a L-thyroxine-sensitive transporter is involved in the brain-to-blood efflux of [ $^3$ H]A $\beta_{1-40}$ .

### *Interaction of A $\beta_{1-40}$ with the transporter Oatp1a4*

Co-IP experiments were performed to determine whether A $\beta_{1-40}$  interacts with Oatp1a4. The brains of mice were perfused with A $\beta_{1-40}$ , homogenized, and the homogenate incubated with Oatp1a4-specific IgG. Co-immunoprecipitates in the eluates were detected by western blotting with the specific anti-A $\beta_{1-40}$  monoclonal antibody 6E10. We found a strong immunoreactive band of  $\sim 56$  kDa (Fig. 1B), which corresponds to an oligomeric form of A $\beta$  peptide [25, 26]. Western blotting with anti-Oatp1a4 IgG revealed an Oatp1a4-immunoreactive band of  $\sim 80$  kDa (Fig. 1B). No interacting bands were detected in control co-IP experiments or when only secondary antibodies were used in western blotting analysis (Fig. 1B).

These data confirm that Oatp1a4 interacts with an oligomeric form of A $\beta$ .

## DISCUSSION

Recent epidemiological studies have suggested that cholesterol-lowering drugs, particularly statins, are beneficial as they can be used in preventive or therapeutic treatment for AD. However, human clinical trials have yielded inconsistent results: some studies showed

beneficial effects while others did not [27]. Nevertheless, the data presently available suggest that statins are more promising than other lipid-lowering drugs for treating AD. A preclinical study using APP transgenic mice (Tg2576) showed that atorvastatin and pitavastatin reduced the brain senile plaques [16]. Similarly, it has been demonstrated that fluvastatin can reduce the brain amyloid in APP transgenic mice (APP23) [15]. In the present study, using the *in situ* brain perfusion technique, we have shown that the blood-brain uptake of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1–40</sub> is dramatically decreased by rosuvastatin. As statins are good Oatp substrates, we determined whether this interaction between rosuvastatin and A $\beta$ <sub>1–40</sub> was mediated by one or more Oatp. We first perfused mouse brains with [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1–40</sub> plus known substrates of Oatp1a4, taurocholate or digoxin. Taurocholate decreased the Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1–40</sub>, while digoxin did not. There are four possible explanations for the different results obtained with taurocholate and digoxin. First, digoxin is a substrate of both Oatp1a4 and Abcb1 [28]. Thus, if digoxin inhibited both the influx (Oatp1a4) and efflux (Abcb1) processes to the same extent, its net effect on the [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1–40</sub> Cl<sub>up</sub> would tend to zero. The second possibility is that digoxin is not a substrate of Oatp1a4, as suggested recently [29]. Third possibility, Oatp1a4 could have several binding sites, leading to differences in the inhibition according to the substrate used [30]. Final possible explanation is that the transporter inhibited by taurocholate and rosuvastatin, but not by digoxin, is not Oatp1a4.

Taurocholate is a substrate of both Oatp1a4 and Oatp14, but its affinity for Oatp1a4 is much higher than that for Oatp14 [31], and taurocholate is a very good probe for Oatp1a4 studies [32]. On the other hand, Oatp14 is inhibited by taurocholate and L-thyroxine, but not by digoxin [22]. But our study failed to demonstrate that L-thyroxine inhibited an influx process at the mouse BBB. In addition, to our knowledge, rosuvastatin has not been shown to be a substrate of Oatp14 [33, 34]. Altogether, these *in vivo* results suggest that rosuvastatin and taurocholate have inhibited Oatp1a4. To confirm this hypothesis, we co-immunoprecipitated A $\beta$ <sub>1–40</sub> with Oatp1a4. Our results show that Oatp1a4 interacted with a 56 kDa A $\beta$  oligomer. It has been previously shown that the 6E10 anti-A $\beta$  antibody used in this study has a high affinity for a 56 kDa dodecameric form of A $\beta$  [35]. This A $\beta$  oligomer has recently been isolated from the brains of animal models of AD and it has been suggested that it plays an important role in the memory deficit observed in these models [25, 26]. High concentrations of this A $\beta$  dodecamer have also

been found in human AD brains as well as in aging normal human brains (at lower concentrations) [35]. We also detected this form in the brains of normal mice that had not been perfused with A $\beta$  (data not shown). Thus, this form of A $\beta$  is present in normal brains and seems to be increased in AD brains. Our results suggest that Oatp1a4 is a key factor in the blood-brain transport of this dodecameric form of A $\beta$ . More studies are now needed to determine exactly how A $\beta$  oligomers interact with Oatp1a4.

We have also demonstrated that L-thyroxine, like probucol [5], can enhance the brain uptake clearance of A $\beta$  by inhibiting an efflux transporter. In our previous study, we showed that probucol inhibited Abcg4 [5]. Thus, it could be hypothesized that L-thyroxine could also inhibit Abcg4. But, to our knowledge, no study has yet demonstrated that L-thyroxine could interact with Abcg4. Nevertheless, an *in vitro* study has shown that L-thyroxine inhibited Abcg1 [36], while probucol did not [37]. There is also evidence that prolonged treatment with L-thyroxine increases the concentration of Abcb1 [38], which influences the brain-to-blood efflux of A $\beta$  [6, 11]. As we used very short perfusion times (30 s), L-thyroxine is unlikely to have influenced the synthesis of Abcb1 in our experiments. However, it has been suggested that T<sub>3</sub> and L-thyroxine are substrates of Abcb1 [39, 40]. Thus, L-thyroxine might also be a competitive inhibitor of the Abcb1-mediated efflux of A $\beta$ . Additional studies to identify the transporter(s) inhibited by L-thyroxine are needed. However, the inhibition of one or several A $\beta$  efflux transporters at the mouse BBB could explain the powerful effect of L-thyroxine on the brain uptake of A $\beta$ . Our results highlight the importance of L-thyroxine in the transport of A $\beta$ <sub>1–40</sub> at the mouse BBB.

Recent human and animal studies have evaluated the link between thyroid disorders and AD, with controversial results. Some clinical studies have associated elevated free plasma thyroxine (fT<sub>4</sub>) with an increased risk of AD [41, 42]. But preclinical studies suggest that cerebral thyroid hormones protect against A $\beta$  formation in the brain and a cognitive deficit [43, 44]. The mechanisms underlying these differences are not fully understood. We find that L-thyroxine disrupts the A $\beta$  efflux transport system. Whether this effect contributes to the pathology of AD, by inducing brain A $\beta$  accumulation for example, merits further study. However, this is the first evidence indicating that plasma L-thyroxine concentration can modify the A $\beta$  disposition in the brain by interfering with its transport at the BBB.

In conclusion, we have identified Oatp1a4 as a promising target for inhibiting the accumulation of A $\beta$

in the brains of AD patients. We also suggest that L-thyroxine plays a crucial role in AD by inhibiting the clearance of A $\beta$  from the brain. Further studies are now needed to determine the details of these interactions between A $\beta$ , statins, and thyroid hormones.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Owen Parkes for editing the English text.

Authors' disclosures available online (<http://www.jalz.com/disclosures/view.php?id=1744>).

## REFERENCES

- [1] Jaeger LB, Dohgu S, Hwang MC, Farr SA, Murphy MP, Fleegal-DeMotta MA, Lynch JL, Robinson SM, Niehoff ML, Johnson SN, Kumar VB, Banks WA (2009) Testing the neurovascular hypothesis of Alzheimer's disease: LRP-1 antisense reduces blood-brain barrier clearance, increases brain levels of amyloid-beta protein, and impairs cognition. *J Alzheimers Dis* **17**, 553-570.
- [2] Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* **330**, 1774.
- [3] Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV (2004) LRP/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* **43**, 333-344.
- [4] Yamada K, Hashimoto T, Yabuki C, Nagae Y, Tachikawa M, Strickland DK, Liu Q, Bu G, Basak JM, Holtzman DM, Ohtsuki S, Terasaki T, Iwatsubo T (2008) The low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates uptake of amyloid beta peptides in an *in vitro* model of the blood-brain barrier cells. *J Biol Chem* **283**, 34554-34562.
- [5] Do TM, Noel-Hudson MS, Ribes S, Besengez C, Smirnova M, Cisternino S, Buyse M, Calon F, Chimini G, Chacun H, Scherrmann JM, Farinotti R, Bourasset F (2012) ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid-beta peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis* **30**, 155-166.
- [6] Candela P, Gosselet F, Saint-Pol J, Sevin E, Boucau MC, Boulanger E, Cecchelli R, Fenart L (2010) Apical-to-basolateral transport of amyloid-beta peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *J Alzheimers Dis* **22**, 849-859.
- [7] Hartz AM, Miller DS, Bauer B (2010) Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* **77**, 715-723.
- [8] Xiong H, Callaghan D, Jones A, Bai J, Rasquinha I, Smith C, Pei K, Walker D, Lue LF, Stanimirovic D, Zhang W (2009) ABCG2 is upregulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for Abeta(1-40) peptides. *J Neurosci* **29**, 5463-5475.
- [9] Kuhnke D, Jedlitschky G, Grube M, Krohn M, Jucker M, Mosyagin I, Cascorbi I, Walker LC, Kroemer HK, Warzok RW, Vogelgesang S (2007) MDR1-P-glycoprotein (ABCB1) mediates transport of Alzheimer's amyloid-beta peptides—implications for the mechanisms of Abeta clearance at the blood-brain barrier. *Brain Pathol* **17**, 347-353.
- [10] Cirrito JR, Deane R, Fagan AM, Spinner ML, Parsadanian M, Finn MB, Jiang H, Prior JL, Sagare A, Bales KR, Paul SM, Zlokovic BV, Pivnicka-Worms D, Holtzman DM (2005) P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* **115**, 3285-3290.
- [11] Qosa H, Abuznait AH, Hill RA, Kaddoumi A (2012) Enhanced brain amyloid-beta clearance by rifampicin and caffeine as a possible protective mechanism against Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **31**, 151-165.
- [12] Deane R, Du Yan S, Subramanian RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Manness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B (2003) RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* **9**, 907-913.
- [13] Zlokovic BV (2004) Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J Neurochem* **89**, 807-811.
- [14] Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* **356**, 1627-1631.
- [15] Shinohara M, Sato N, Kurinami H, Takeuchi D, Takeda S, Shimamura M, Yamashita T, Uchiyama Y, Rakugi H, Morishita R (2010) Reduction of brain beta-amyloid (Abeta) by fluvastatin, a hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor, through increase in degradation of amyloid precursor protein C-terminal fragments (APP-CTFs) and Abeta clearance. *J Biol Chem* **285**, 22091-22102.
- [16] Kurata T, Miyazaki K, Kozuki M, Panin VL, Morimoto N, Ohta Y, Nagai M, Ikeda Y, Matsuura T, Abe K (2011) Atorvastatin and pitavastatin improve cognitive function and reduce senile plaque and phosphorylated tau in aged APP mice. *Brain Res* **1371**, 161-170.
- [17] Butterfield DA (2011) Atorvastatin and Abeta(1-40): Not as simple as cholesterol reduction in brain and relevance to Alzheimer disease. *Exp Neurol* **228**, 15-18.
- [18] Roth M, Obaidat A, Hagenbuch B (2012) OATPs, OATs and OCTs: The organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol* **165**, 1260-1287.
- [19] Sugiyama D, Kusuhara H, Taniguchi H, Ishikawa S, Nozaki Y, Aburatani H, Sugiyama Y (2003) Functional characterization of rat brain-specific organic anion transporter (Oatp14) at the blood-brain barrier: High affinity transporter for thyroxine. *J Biol Chem* **278**, 43489-43495.
- [20] Ose A, Kusuhara H, Endo C, Tohyama K, Miyajima M, Kitamura S, Sugiyama Y (2010) Functional characterization of mouse organic anion transporting peptide 1a4 in the uptake and efflux of drugs across the blood-brain barrier. *Drug Metab Dispos* **38**, 168-176.
- [21] Roberts LM, Woodford K, Zhou M, Black DS, Haggerty JE, Tate EH, Grindstaff KK, Mengesha W, Raman C, Zerangue N (2008) Expression of the thyroid hormone transporters monocarboxylate transporter-8 (SLC16A2) and organic ion transporter-14 (SLC101C1) at the blood-brain barrier. *Endocrinology* **149**, 6251-6261.
- [22] Tohyama K, Kusuhara H, Sugiyama Y (2004) Involvement of multispecific organic anion transporter, Oatp14 (Slc21a14), in the transport of thyroxine across the blood-brain barrier. *Endocrinology* **145**, 4384-4391.



- [23] Cisternino S, Rousselle C, Lorico A, Rappa G, Scherrmann JM (2003) Apparent lack of Mrp1-mediated efflux at the luminal side of mouse blood-brain barrier endothelial cells. *Pharm Res* **20**, 904-909.
- [24] Dagenais C, Rousselle C, Pollack GM, Scherrmann JM (2000) Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 381-386.
- [25] Lesne S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, Gallagher M, Ashe KH (2006) A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352-357.
- [26] Scherzer-Attali R, Farfara D, Cooper I, Levin A, Ben-Romano T, Trudler D, Vientrov M, Shaltiel-Karyo R, Shalev DE, Segev-Amzaleg N, Gazit E, Segal D, Frenkel D (2012) Naphthoquinone-tyrptophan reduces neurotoxic A $\beta$ \*56 levels and improves cognition in Alzheimer's disease animal model. *Neurobiol Dis* **46**, 663-672.
- [27] Shepardson NE, Shankar GM, Selkoe DJ (2011) Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: II. Review of human trials and recommendations. *Arch Neurol* **68**, 1385-1392.
- [28] Dagenais C, Ducharme J, Pollack GM (2001) Uptake and efflux of the peptidic delta-opioid receptor agonist. *Neurosci Lett* **301**, 155-158.
- [29] Taub ME, Mease K, Sane RS, Watson CA, Chen L, Ellens H, Hirakawa B, Reynier EL, Jani M, Lee CA (2011) Digoxin is not a substrate for organic anion-transporting polypeptide transporters OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, and OATP2B1 but is a substrate for a sodium-dependent transporter expressed in HEK293 cells. *Drug Metab Dispos* **39**, 2093-2102.
- [30] Sugiyama D, Kusuhara H, Shitara Y, Abe T, Sugiyama Y (2002) Effect of 17 beta-estradiol-D-17 beta-glucuronide on the rat organic anion transporting polypeptide 2-mediated transport differs depending on substrates. *Drug Metab Dispos* **30**, 220-223.
- [31] Kusuhara H, Sugiyama Y (2005) Active efflux across the blood-brain barrier: Role of the solute carrier family. *NeuroRx* **2**, 73-85.
- [32] Ronaldson PT, Finch JD, Demarco KM, Quigley CE, Davis TP (2011) Inflammatory pain signals an increase in functional expression of organic anion transporting polypeptide 1a4 at the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* **336**, 827-839.
- [33] Kitamura S, Maeda K, Wang Y, Sugiyama Y (2008) Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin. *Drug Metab Dispos* **36**, 2014-2023.
- [34] Klaassen CD, Aleksunes LM (2010) Xenobiotic, bile acid, and cholesterol transporters: Function and regulation. *Pharmacol Rev* **62**, 1-96.
- [35] Sokolow S, Henkins KM, Bilousova T, Miller CA, Vinters HV, Poon W, Cole GM, Gylys KH (2012) AD synapses contain abundant Abeta monomer and multiple soluble oligomers, including a 56-kDa assembly. *Neurobiol Aging* **33**, 1545-1555.
- [36] Cserepes J, Szentpetery Z, Seres L, Ozvegy-Laczka C, Langmann T, Schmitz G, Glavinas H, Klein I, Homolya L, Varadi A, Sarkadi B, Elkind NB (2004) Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: Indications for heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* **320**, 860-867.
- [37] Stefulj J, Panzenboeck U, Becker T, Hirschmugl B, Schweinzer C, Lang I, Marsche G, Sadjak A, Lang U, Desoye G, Wadsack C (2009) Human endothelial cells of the placental barrier efficiently deliver cholesterol to the fetal circulation via ABCA1 and ABCG1. *Circ Res* **104**, 600-608.
- [38] Nishio N, Katsura T, Ashida K, Okuda M, Inui K (2005) Modulation of P-glycoprotein expression in hyperthyroid rat tissues. *Drug Metab Dispos* **33**, 1584-1587.
- [39] Mitchell AM, Tom M, Mortimer RH (2005) Thyroid hormone export from cells: Contribution of P-glycoprotein. *J Endocrinol* **185**, 93-98.
- [40] Kassem NA, Deane R, Segal MB, Chen R, Preston JE (2007) Thyroxine (T<sub>4</sub>) transfer from CSF to choroid plexus and ventricular brain regions in rabbit: Contributory role of P-glycoprotein and organic anion transporting polypeptides. *Brain Res* **1181**, 44-50.
- [41] de Jong FJ, Masaki K, Chen H, Remaley AT, Breteler MM, Petrovitch H, White LR, Launer LJ (2009) Thyroid function, the risk of dementia and neuropathologic changes: The Honolulu-Asia aging study. *Neurobiol Aging* **30**, 600-606.
- [42] Kapaki E, Paraskevas GP, Mantzou E, Papapostolou A, Alevisaki M, Vassilopoulos D (2006) Thyroid function in patients with Alzheimer disease: Implications on response to anticholinesterase treatment. *Alzheimer Dis Assoc Disord* **20**, 242-247.
- [43] Fu AL, Zhou CY, Chen X (2010) Thyroid hormone prevents cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **58**, 722-729.
- [44] Belakavadi M, Dell J, Grover GJ, Fondell JD (2011) Thyroid hormone suppression of beta-amyloid precursor protein gene expression in the brain involves multiple epigenetic regulatory events. *Mol Cell Endocrinol* **339**, 72-80.

# Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- $\beta$ Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD)

Tuan Minh Do<sup>a</sup>, Agnès Dodacki<sup>c,d,e</sup>, Wael Alata<sup>b</sup>, Frédéric Calon<sup>b</sup>, Sophie Nicolic<sup>c,d,e</sup>, Jean-Michel Scherrmann<sup>c,d,e</sup>, Robert Farinotti<sup>a</sup> and Fanchon Bourasset<sup>c,d,e,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire de Pharmacie Clinique et pharmacocinétique, EA 4123, Université Paris-Sud 11, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry, France

<sup>b</sup>Faculty of Pharmacy, Laval University, Quebec (QC), Canada

<sup>c</sup>Inserm UMR-S1144, Paris, F 75006, France

<sup>d</sup>Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>e</sup>Université Paris Diderot, Paris, France

Handling Associate Editor: Othman Ghribi

Accepted 15 August 2015

**Abstract.** The involvement of transporters located at the blood-brain barrier (BBB) has been suggested in the control of cerebral A $\beta$  levels, and thereby in Alzheimer's disease (AD). However, little is known about the regulation of these transporters at the BBB in animal models of AD. In this study, we investigated the BBB expression of A $\beta$  influx (Rage) and efflux (Abcb1-Abcg2-Abcg4-Lrp-1) transporters and cholesterol transporter (Abca1) in 3–18-month-old 3xTg-AD and control mice. The age-dependent effect of BBB transporters regulation on the brain uptake clearance (Cl<sub>up</sub>) of [<sup>3</sup>H]cholesterol and [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1–40</sub> was then evaluated in these mice, using the *in situ* brain perfusion technique. Our data suggest that transgenes expression led to the BBB increase in A $\beta$  influx receptor (Rage) and decrease in efflux receptor (Lrp-1). Our data also indicate that mice have mechanisms counteracting this increased net influx. Indeed, Abcg4 and Abca1 are up regulated in 3- and 3/6-month-old 3xTg-AD mice, respectively. Our data show that the balance between the BBB influx and efflux of A $\beta$  is maintained in 3 and 6-month-old 3xTg-AD mice, suggesting that Abcg4 and Abca1 control the efflux of A $\beta$  through the BBB by a direct (Abcg4) or indirect (Abca1) mechanism. At 18 months, the BBB A $\beta$  efflux is significantly increased in 3xTg-AD mice compared to controls. This could result from the significant up-regulation of both Abcg2 and Abcb1 in 3xTg-AD mice compared to control mice. Thus, age-dependent regulation of several A $\beta$  and cholesterol transporters at the BBB could ultimately limit the brain accumulation of A $\beta$ .

**Keywords:** Abca1, Abcb1, Abcg2, Abcg4, Alzheimer's disease, amyloid- $\beta$ , blood-brain barrier, cholesterol, Oatp1a4, Rage, 3xTg-AD

## INTRODUCTION

The accumulation of amyloid- $\beta$  peptide (A $\beta$ ) in the brain is an important histological feature of Alzheimer's disease (AD), but recent work indicates

\*Correspondence to: Bourasset Fanchon, PharmD, PhD, Faculté de Pharmacie, Université Paris Descartes, 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France. Tel.: +33 1 53 73 98 59; E-mail: fanchon.bourasset@parisdescartes.fr.

that brain A $\beta$  concentrations are dynamically regulated by several mechanisms. As the clearance of A $\beta$  by AD brains is 30% less efficient than the clearance by normal brains [1], the blood-brain barrier (BBB) may be important for regulating brain A $\beta$  concentrations [1–3].

The BBB is formed by brain capillary endothelial cells (BCECs) which are connected together by tight junctions. The barrier effect is reinforced by influx and efflux transporters at the BCECs, such as solute carriers (SLC) and ATP-binding cassette (ABC) transporters [4]. Unlike the endothelium of systemic capillaries, which have a very permeable barrier allowing transport of solutes and bigger molecules into the interstitial fluid [5], the BBB generally restricts entry of polar molecules into the brain. However, essential nutrients for the brain such as glucose, amino acids, and vitamins can cross the BBB using specific transporters expressed in the brain endothelium [6, 7]. The blood-brain exchanges of larger molecules, such as several regulatory neuroactive peptides and proteins, have also been described [8–11].

Recently, the transport of A $\beta$  across the BCECs has been demonstrated as a two-directional process mediated by several transporters [12, 13]. The influx of A $\beta$  from blood to brain across the BBB is mediated by at least two mechanisms. One is a receptor-mediated mechanism involving receptor for advanced glycation end products (Rage) [14]. This mechanism has been validated *in vivo* (in mice) [15, 16] and *in vitro* (in a bovine model of BBB) [17]. A second mechanism, involving the SLC transporter Oatp1a4, has recently been demonstrated by our group [12]. The several mechanisms involved in the efflux of A $\beta$  from the BBB are not yet fully understood. One involves the low density lipoprotein-related receptor 1 (Lrp-1) [18, 19]. There is also evidence that three ABC transporters (Abcg2, Abcg4 and Abcb1) restrict the passage of A $\beta$  across the BBB both *in vivo* (in mice) and *in vitro* (transfected cells or *in vitro* models of BBB) [20–22]. Lastly, unidentified insulin-sensitive or vitamin E-sensitive transporters/receptors may take part in the clearance of A $\beta$  across the BBB [23–25]. All these data show that the amount of A $\beta$  in the brain is strictly controlled by a complex of coordinated transporters at the BBB. They work together to maintain the brain influx/efflux of A $\beta$  in equilibrium in normal situations. Any change in the synthesis and/or function of these BBB transporters can influence the amount of A $\beta$  in the brain and lead to disorders such as AD [26]. Both aging and AD are associated with

altered regulation of several transporters in the brain. The amounts of Abcb1 and Lrp-1 in normal aging brains are sub-normal [27, 28], as are their amounts in the BBB of AD patients [29]. The amount of Rage in the BBB also increases with normal aging [30] and in AD [31]. On the other hand, the amount of Abcg2 is elevated in the BBB of AD patients who are also suffering from a cerebral amyloid angiopathy disorder [20], as is that of Abcg4 in the microglial cells of AD patients [32]. Finally, the amount of the cholesterol efflux transporter Abca1 in the brains of AD sufferers is above normal [33, 34]. The amount of Abca1 in the brains of transgenic mouse models of AD varies inversely with the brain A $\beta$  concentration [35, 36].

We therefore postulated that the transporters involved in the BBB exchanges of A $\beta$  and/or cholesterol are regulated in AD [29, 31]. But most studies on these regulations have been done on whole brain homogenates or using brain cells other than brain endothelial cells where A $\beta$  influx and efflux are controlled [32, 34]. It is therefore important to work with these particular cells to better understand the role of the BBB in AD. Another question is whether these regulations have a direct impact on the BBB transport of A $\beta$  and when regulation occurs. To answer these questions, we have measured the amounts of several transporters involved in the A $\beta$  (Abcb1, Abcg2, Abcg4, Lrp-1, Rage and Oatp1a4) and cholesterol (Abca1) exchanges through the BBB in brain capillaries at different stages of AD development (3 to 18 months), in a mouse model of AD (3xTg-AD) that harbors three mutant genes (A $\beta$ PP<sub>swe</sub>/PS1<sub>M146V</sub>/Tau<sub>p301L</sub>). These mice are one of the few transgenic models that mimic both major pathological lesions of AD: amyloid and tau, in the same time-dependent manner as AD patients [37]. We also investigated the impact of these modifications on the BBB transport of A $\beta$  and cholesterol, two major markers in AD.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Triple-transgenic mice (3xTg-AD) were produced in our laboratories and used as models of AD [37, 38]. As previously described, 3xTg-AD mice were studied at 3, 6, and 18 months of age to coincide with early, middle, and late plaque and tangle pathology, respectively [39–41].

They were genotyped using the polymerase chain reaction (PCR) and DNA extracted from tail biopsies as described previously [37]. The mice had free access to standard laboratory food and water and were kept on a 12 h light-dark cycle at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$ . Studies involving animals and their care were performed according to the National Research Council guidelines for the care and use of laboratory animals. The experimental protocols were approved by the Faculty Committee for Animal Care and Use.

### Reagents

[ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  (15 Ci/mmol) was purchased from Ambios Labs (Newington, CT, USA). [ $^3\text{H}$ ]cholesterol (44.5 Ci/mmol), [ $^{14}\text{C}$ ]sucrose (588.0 mCi/mmol), liquid scintillation cocktails Ultima Gold and Soluene were purchased from PerkinElmer Life Sciences (Courtaboeuf, France). Triton X-100 and bicinchoninic protein assay kits were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM), fetal calf serum (FCS) and phosphate-buffered saline (PBS) were purchased from Gibco Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Bovine serum albumin (BSA) was purchased from EuroMedex (Souffelweyersheim, France). Rat anti-human/mouse Abcg2 antibody (BXP-53), mouse anti-mouse Abcb1 antibody (C219), mouse anti-mouse  $\beta$ -actin antibody (AC-74) and peroxidase-conjugated secondary antibodies were purchased from Dako (Glostrup, Denmark). Rat anti-mouse Abca1 antibody (NB400-164) and goat anti-mouse Oatp1a4 antibody (M-13) were from Novus Biological (Littleton, USA). Rabbit anti-mouse Abcg4 and rabbit anti-mouse Rage antibodies were purchased from Alpha Diagnostic International (San Antonio, TX, USA) and Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France), respectively. Rabbit anti-mouse Lrp-1 antibody was from Abcam (Toronto, ON, Canada).

All other chemicals were reagent grade commercial products.

#### *In situ* brain perfusion

This method was developed to study drug transport through the BBB [42]. It can be used to measure several transport parameters, including the distribution volume and the brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ) of a target molecule over very short initial periods (15–120 s) [43, 44].

### Surgery and perfusion

Mice were anesthetized by intra-peritoneal injection of a xylazine and ketamine mixture (8/140 mg/kg). The common carotid artery was ligated on the heart side and the right external carotid artery was ligated rostral to the occipital artery at the level of the bifurcation of the common carotid. The right common carotid artery was then catheterized with polyethylene tubing. A syringe containing the perfusion fluid was placed in an infusion pump (PHD 2000; Harvard Apparatus, Les Ulis, France) and connected to the catheter. The thorax of the animal was opened, the heart was cut and perfusion was started immediately at a flow rate of 2.5 ml/min. The perfusion fluid consisted of bicarbonate-buffered physiological saline containing 128 mM NaCl, 24 mM NaHCO $_3$ , 4.2 mM KCl, 2.4 mM NaH $_2$ PO $_4$ , 1.5 mM CaCl $_2$ , 0.9 mM MgCl $_2$ , and 9 mM D-glucose. The solution was gassed with 95% O $_2$ -5% CO $_2$  for pH control (7.4) and warmed to 37°C in a water bath.

Each mouse was perfused with [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  (0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ ) for 30 s or with [ $^3\text{H}$ ]cholesterol (0.2  $\mu\text{Ci/ml}$ ) for 60 s. The molar concentration of A $\beta_{1-40}$  was 6.6 nM which is equivalent to the plasma concentrations of A $\beta_{1-40}$  found in several transgenic mouse models of AD [45, 46]. For each animal, [ $^{14}\text{C}$ ]sucrose (0.1–0.2  $\mu\text{Ci/ml}$ ) was perfused with the tritiated substrate to check the physical integrity of the BBB and to correct for vascular space contamination. Perfusion was terminated by decapitating the mouse. The right cerebral hemisphere and aliquots of the perfusion fluid were sampled. Tissue samples were digested in 1 ml Soluene at 50°C and mixed with 10 ml Ultima Gold scintillation cocktail. The two labels were counted simultaneously in a scintillation counter (LS 6500, Beckman, Ireland).

### Calculation of BBB transport parameters

All the calculations were performed as described previously [42].

The brain vascular volume of each animal ( $V_{\text{vasc}}$ ,  $\mu\text{l/g}$ ) was estimated from the tissue distribution of [ $^{14}\text{C}$ ]sucrose, which does not measurably cross the BBB during short perfusions, by dividing the amount of [ $^{14}\text{C}$ ]sucrose (dpm/g) in the right brain hemisphere by the concentration of [ $^{14}\text{C}$ ]sucrose in the perfusion fluid (dpm/ $\mu\text{l}$ ). All the values were below 20  $\mu\text{l/g}$ , indicating that the BBB was not altered during the experiments.

The apparent tissue distribution volume ( $V_{\text{brain}}$ ,  $\mu\text{l/g}$ ) of [ $^3\text{H}$ ]A $\beta_{1-40}$  or [ $^3\text{H}$ ]cholesterol was calculated from the amount of radioactivity in the right brain hemisphere using the following equation:

$$V_{\text{brain}} = X_{\text{brain}}/C_{\text{perf}} \quad (1)$$

where  $C_{\text{perf}}$  (dpm/ $\mu\text{l}$ ) is the concentration of tritiated tracer in the perfusion fluid, and  $X_{\text{brain}}$  (dpm/g) is the calculated amount of tritiated tracer in the right cerebral parenchyma, corrected for vascular contamination with the following equation:  $X_{\text{brain}} = X_{\text{tot}} - (V_{\text{vasc}} \times C_{\text{perf}})$ , where  $X_{\text{tot}}$  (dpm/g) is the total amount of tritiated tracer measured in the brain tissue sample (vascular + extravascular).

Brain uptake clearance, expressed as  $Cl_{\text{up}}$  ( $\mu\text{l/g/s}$ ), was calculated by dividing  $V_{\text{brain}}$  by the perfusion time (s).

The resulting  $Cl_{\text{up}}$  integrates the enhancing or limiting factors introduced by the transporters located at the luminal side of BCECs. Thus, this technique enabled us to evaluate a given transporter's function at the BBB level. For example, up-regulation of an efflux transporter may result in a more efficient export of the transporter's substrate from BCECs to the circulation and therefore a decrease in the substrate's  $Cl_{\text{up}}$ . On the contrary, up-regulation of an influx transporter could enhance the substrate's  $Cl_{\text{up}}$  as more substrate is transferred from blood to BCECs.

#### Capillary isolation

Mouse brain microvessels were isolated by density-gradient centrifugation, essentially as described previously [21]. Briefly, a mouse brain was immersed in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS), and the cerebellum, meninges, brainstem, and large superficial blood vessels removed. The cortex was gently homogenized in ice-cold DMEM containing 10% FCS in a Teflon Potter homogenizer. The resulting homogenate was centrifuged at 500  $g$  for 10 min at 4°C and the supernatant discarded. The pellet was homogenized in 5 ml of DMEM, 25% bovine serum albumin, and centrifuged at 1500  $g$  for 20 min at 4°C. This pellet was homogenized in DMEM containing 10% FCS and the homogenate passed through a 140- $\mu\text{m}$  mesh nylon filter. This filtrate was passed through a 40- $\mu\text{m}$  mesh nylon filter. The fraction retained on the 40- $\mu\text{m}$  filter was collected, suspended in ice-cold DMEM - 10% FCS and centrifuged at 12000  $g$  for 45 min at 4°C. The pellet containing the microvessels was washed in ice-cold PBS and centrifuged again at 12000  $g$  for 20 min

at 4°C. The supernatant was discarded and the pellets were stored at -80°C.

#### Western blotting

Total proteins were extracted from the pellets containing microvessels by homogenizing them in TENTs (10 mM Tris-HCl at pH 7.4, 5 mM EDTA at pH 8, 126 mM NaCl, 1% (v/v) Triton X-100, and 0.1% (v/v) SDS) supplemented with leupeptin, aprotinin, pepstatin and phenyl methane sulfonyl fluoride (Sigma-Aldrich, France). The suspensions were agitated gently for 1 h at 4°C and then centrifuged at 12000  $g$  at 4°C for 20 min. The protein content of the supernatant was determined with the bicinchoninic acid assay.

Proteins (10 or 25  $\mu\text{g}$  per lane) were separated by electrophoresis on 8% SDS-polyacrylamide gels and transferred electrophoretically to nitrocellulose membranes. Free binding sites on the membranes were blocked by incubation with Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 (TTBS) and 10% non-fat dried milk for 1 h at 20–25°C. The membranes were washed with TTBS and incubated with primary antibody for 2 h at 20–25°C. The dilutions of primary antibodies were: 1:1500 for Abca1, 1:100 for Abcb1, 1:80 for Abcg2, 1:1000 for Abcg4, 1:200 for Oatp1a4, 1:1000 for Rage, 1:10000 for Lrp-1, and 1:2000 for  $\beta$ -actin. The membranes were then washed with TTBS (5 times for 10 min each) and then incubated with secondary antibodies diluted 1:5000 for 1 h at 20–25°C. The membranes were again washed (5 times for 10 min) with TTBS and probed with the Western Lightning Chemiluminescence Reagent (Perkin Elmer Life Sciences, Courtaboeuf, France). The intensities of the bands were quantified with the Scion Image program (NIH, Scion Corporation, Bethesda, MD, USA).

#### Statistical analysis

The results are expressed as means  $\pm$  S.D. Samples were compared by Student's  $t$  test when appropriate. Differences were considered to be statistically significant when  $p < 0.05$ .

## RESULTS

#### The A $\beta$ influx transporters Rage and Oatp1a4 in mouse BCECs

The amount of Rage in the brain capillary fractions of 3xTg-AD mice were greater than in their age-

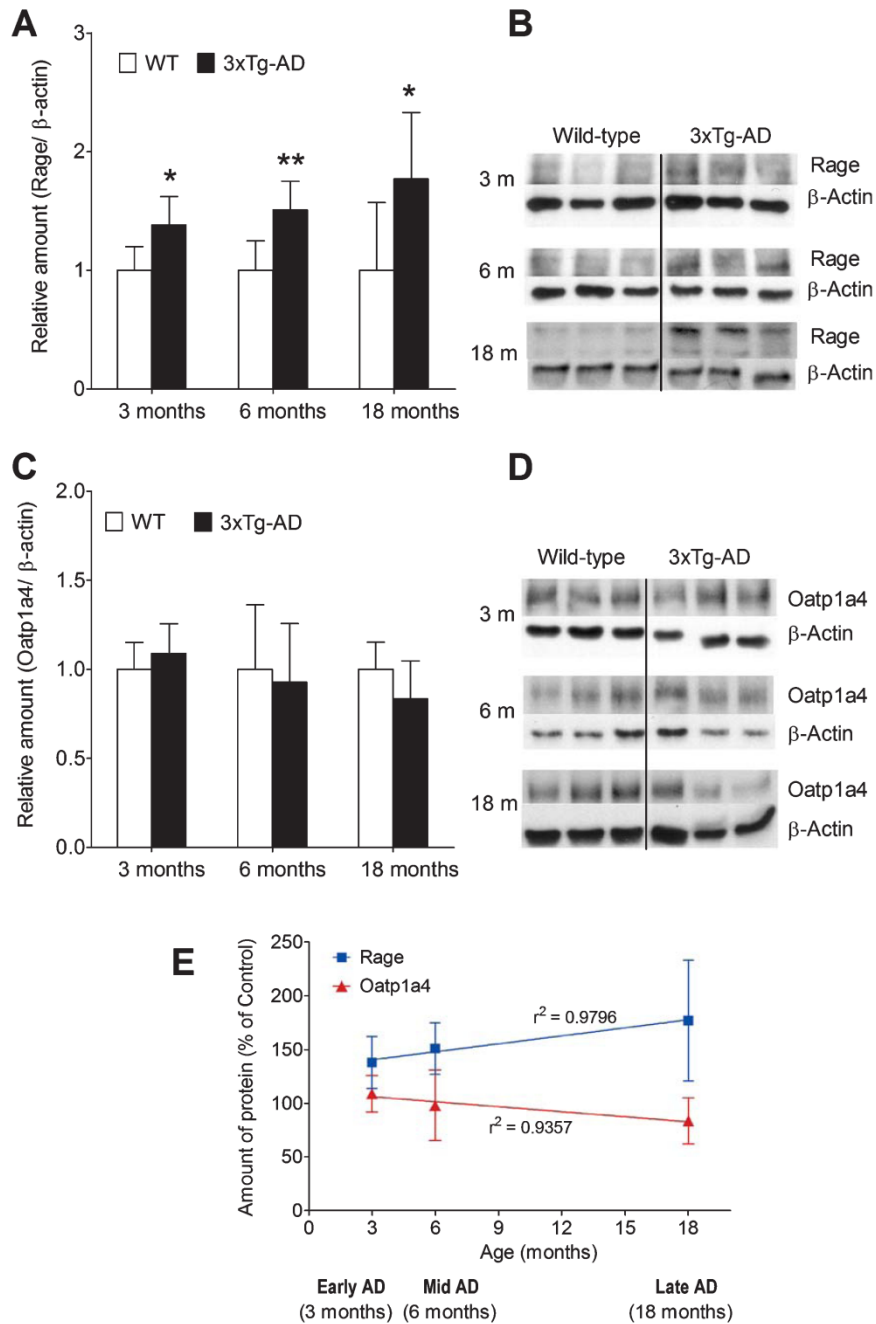


Fig. 1. Quantification of A $\beta$  influx transporters (Rage and Oatp1a4) in the brain capillaries of wild-type (WT, □) and 3xTg-AD (■) mice aged from 3 to 18 months. A) Densitometric analysis of Rage protein normalized to  $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=6-7$  mice in each group). \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  for wild-type and 3xTg-AD mice. B) The representative western blot shows Rage protein ( $\sim 45$  kDa) and  $\beta$ -actin in the brain capillaries of wild-type (WT) and 3xTg-AD mice aged from 3 to 18 months. C) Densitometric analysis of Oatp1a4 protein normalized to  $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=6-7$  mice in each group). D) The representative western blot shows Oatp1a4 protein ( $\sim 90$  kDa) and  $\beta$ -actin in the brain capillaries of wild-type (WT) and 3xTg-AD mice aged from 3 to 18 months. E) Relationship between amounts of Rage and Oatp1a4 in 3xTg-AD mice (presented as percentage of control) and age. Linear regression analyses show good correlations between amounts of protein and mouse age.

matched controls: 1.4-times at 3 months and 1.5- and 1.8-times at 6 and 18 months, respectively (Fig. 1A, B). The 18-month-old 3xTg-AD mice also had slightly less

Oatp1a4, statistically non-significant (17%,  $p=0.07$ ), than age-matched control mice (Fig. 1C, D). The amount of Rage at the BBB tended to be positively

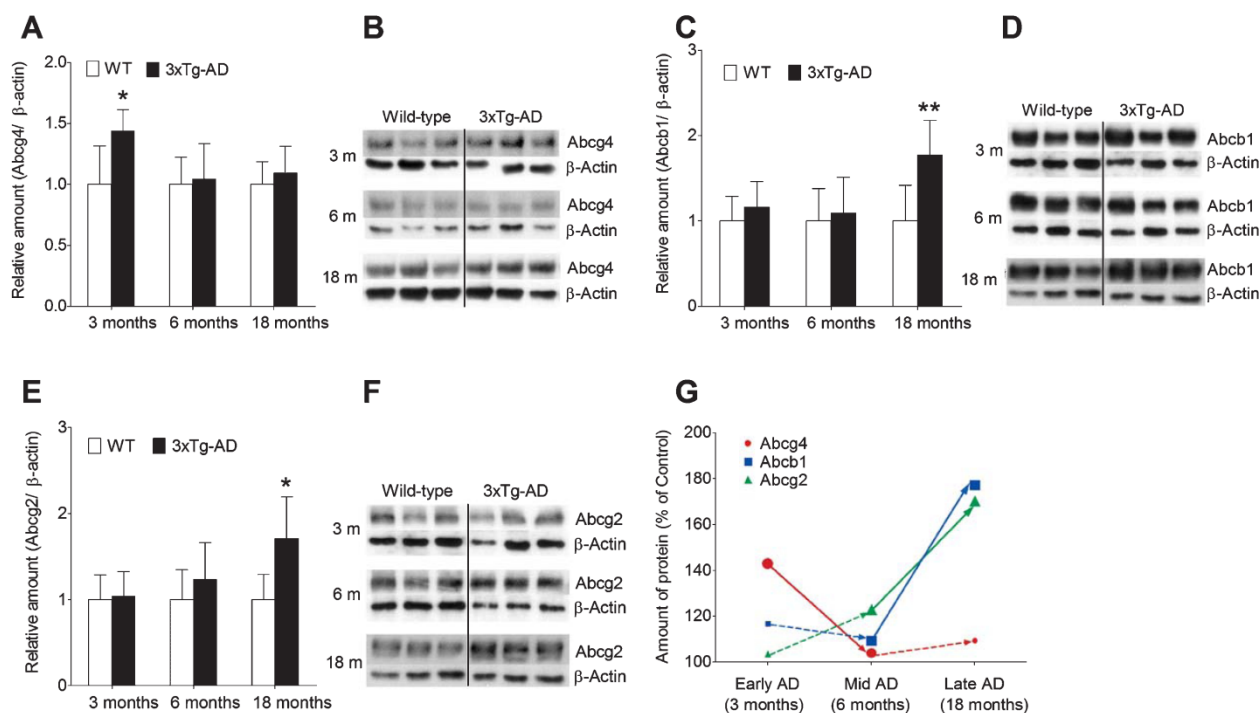


Fig. 2. Quantification of A $\beta$  efflux transporters (Abcb1, Abcg2, and Abcg4) in the brain capillaries of wild-type (WT, □) and 3xTg-AD (■) mice aged from 3 to 18 months. A) Densitometric analysis of Abcg4 protein normalized to  $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=6-7$  mice in each group). \* $p < 0.05$  for wild-type and 3xTg-AD mice. B) The representative western blot shows Abcg4 protein ( $\sim 70$  kDa) and  $\beta$ -actin in the brain capillaries of wild-type (WT) and 3xTg-AD mice aged from 3 to 18 months. C) Densitometric analysis of Abcb1 protein normalized to  $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=6-7$  mice in each group). \*\* $p < 0.01$  for wild-type and 3xTg-AD mice. D) The representative western blot shows Abcb1 protein ( $\sim 170$  kDa) and  $\beta$ -actin in the brain capillaries of wild-type (WT) and 3xTg-AD mice aged from 3 to 18 months. E) Densitometric analysis of Abcg2 protein normalized to  $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=6-7$  mice in each group). \* $p < 0.05$  for wild-type and 3xTg-AD mice. F) The representative western blot shows Abcg2 protein ( $\sim 72$  kDa) and  $\beta$ -actin in the brain capillaries of wild-type (WT) and 3xTg-AD mice aged from 3 to 18 months. G) Amounts of Abcg4 (red line, circles), Abcb1 (blue line, squares), Abcg2 (green line, triangles) in 3xTg-AD mice (presented as percentage of control) as a function of age.

( $r^2 = 0.9796$ ) correlated with the age of the 3xTg-AD mice, while that of Oatp1a4 tended to be negatively correlated ( $r^2 = 0.9357$ ) (Fig. 1E).

#### The A $\beta$ efflux transporters Abcb1, Abcg2, Abcg4 and Lrp-1 in mouse BCECs

The amounts of Abcb1, Abcg2 and Abcg4 in the brain capillary fractions of wild-type and 3xTg-AD mice aged 3 to 18 months were measured by western blotting. The amount of Abcg4 protein in the BCECs of 3-month-old 3xTg-AD mice was 1.4-times higher than in their age-matched wild-type controls, but that of Abcb1 and Abcg2 proteins was not different from controls. In contrast, the capillary fractions from 18-month-old 3xTg-AD mice contained 1.7-times more of both Abcb1 and Abcg2 proteins than did age-matched controls, while those of Abcg4 in the 3xTg-AD and control mice were the same (Fig. 2A-F). Finally, the

amounts of Abcb1, Abcg2 and Abcg4 in the capillary fractions of 6-month-old control and 3xTg-AD mice were not significantly different (Fig. 2A-F). Figure 2G also indicates that the amounts of A $\beta$  efflux transporters tended to vary inversely: the BBB amounts of Abcb1 and Abcg2 increased with age in 3xTg-AD mice while that of Abcg4 decreased.

We also measured the amount of Lrp-1 in the brain capillary fractions of 18-month-old 3xTg-AD and wild-type control mice. Our results showed that the amount Lrp-1 was significantly decreased in the BCECs of 3xTg-AD mice as compared to age-matched control mice (Fig. 3A, B).

#### The cholesterol efflux transporter Abca1 in mouse BCECs

The BCECs of 3-month-old and 18-month-old 3xTg-AD mice contained 1.3-times more Abca1 than

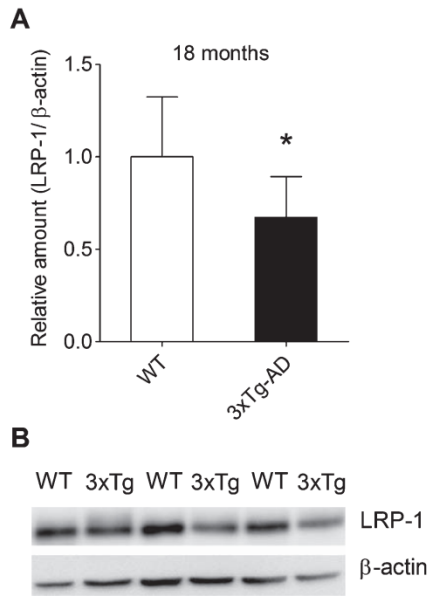


Fig. 3. A) Densitometric analysis of Lrp-1 protein normalized to  $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=6-7$  mice in each group). \* $p < 0.05$  for wild-type and 3xTg-AD mice. B) The representative western blot shows Lrp-1 protein ( $\sim 85$  kDa) and  $\beta$ -actin in the brain capillaries of wild-type (WT) and 3xTg-AD mice aged 18 months.

their controls; the greatest increase in Abca1 (3.2-times control) was detected in 3xTg-AD mice aged 6 months (Fig. 4A, B).

*Brain uptake of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub>*

In AD, A $\beta$  mainly exists as 40 or 42 amino-acids forms, which are thought to be transported by the same set of transporters at the BBB level [17, 47, 48]. Although the A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptide has been shown to be more amyloidogenic, in this study, we used the A $\beta$ <sub>1-40</sub> peptide for *in vivo* BBB transport studies as it is the most abundant A $\beta$  peptide found in the cerebral vasculature and it is more soluble and stable in solution than A $\beta$ <sub>1-42</sub> peptide [49–51]. The brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ) of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> was measured by *in situ* brain perfusion. It was the same in 3xTg-AD and age-matched controls aged from 3 to 6 months (Fig. 5). But [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub>  $Cl_{up}$  was significantly lower (17%) in 3xTg-AD mice aged 18 months than in their age-matched controls (Fig. 5).

*Brain uptake of [<sup>3</sup>H]cholesterol*

The brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ) of [<sup>3</sup>H]cholesterol, measured by *in situ* brain perfusion, was significantly lower (15%) in 3 and 6-month-old 3xTg-AD mice than in their age-matched

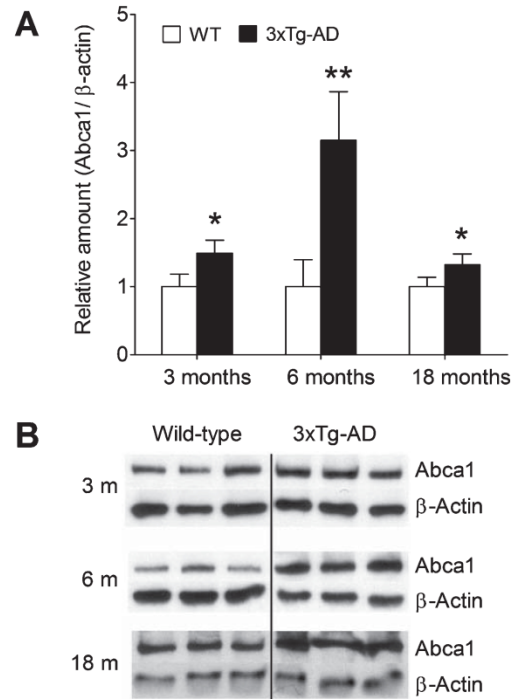


Fig. 4. Quantification of the cholesterol efflux transporter Abca1 in the brain capillaries of wild-type (WT,  $\square$ ) and 3xTg-AD ( $\blacksquare$ ) mice aged from 3 to 18 months. A) Densitometric analysis of Abca1 protein normalized to  $\beta$ -actin. Data are means  $\pm$  S.D. ( $n=6$  mice in each group). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  for wild-type and 3xTg-AD mice. B) The representative western blot shows Abca1 protein ( $\sim 220$  kDa) and  $\beta$ -actin in the brain capillaries of wild-type (WT) and 3xTg-AD mice aged from 3 to 18 months.

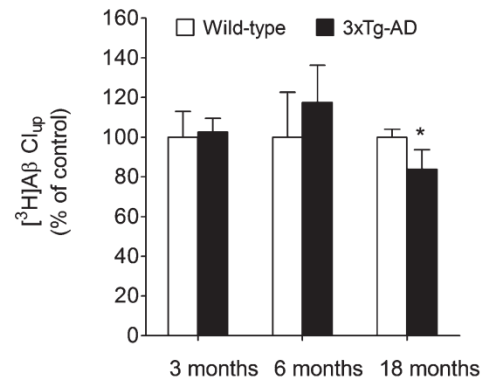


Fig. 5. Comparison of brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ) of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> in wild-type (WT,  $\square$ ) and 3xTg-AD ( $\blacksquare$ ) mice, aged from 3 to 18 months by *in situ* brain perfusion assays. The  $Cl_{up}$  of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>(1-40)</sub> was quantified and expressed as percentage of control. Data are means  $\pm$  S.D. of 4–9 mice. \* $p < 0.05$  comparing wild-type and 3xTg-AD mice.

controls (Fig. 6). But the [<sup>3</sup>H]cholesterol  $Cl_{up}$  in 3xTg-AD and control mice aged 18 months were not significantly different (Fig. 6).



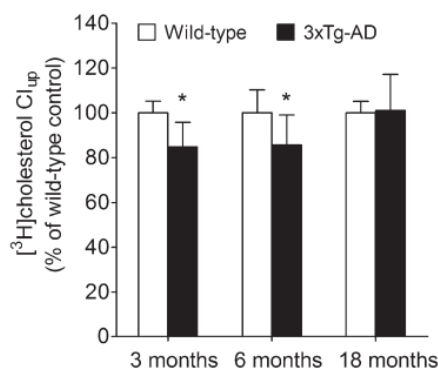


Fig. 6. Comparison of brain uptake clearance ( $Cl_{up}$ ) of [ $^3H$ ]cholesterol in wild-type (WT,  $\square$ ) and 3xTg-AD ( $\blacksquare$ ) mice, aged from 3 to 18 months by *in situ* brain perfusion assays. The  $Cl_{up}$  of [ $^3H$ ]cholesterol was quantified and expressed as percentage of control. Data are means  $\pm$  S.D. of 4–9 mice. \* $p < 0.05$  comparing wild-type and 3xTg-AD mice.

## DISCUSSION

We first studied the mechanisms involved in the BBB influx of A $\beta$ . Our results demonstrate that the amount of Rage in brain capillaries increased linearly with the severity of the disorder (Fig. 1A, B, and E). This agrees well with data from AD patients; the Rage amount in endothelial cells increases linearly from early stage AD as does the severity of the AD [52]. These mouse-age data confirm that the mouse model of AD we used reproduces events observed in AD. Conversely, we find that the amount of Oatp1a4 in brain capillaries tends to decrease linearly with the severity of the disorder (Fig. 1C–E), although the decrease was not statistically significant ( $p = 0.07$  in 18-month-old mice). These opposing changes in the amounts of BBB Rage and Oatp1a4 with the severity of AD suggest that the late decrease tendency in Oatp1a4 might partially compensate for the increase in Rage in the BBB.

Secondly, we studied the mechanisms involved in the BBB efflux of A $\beta$ /cholesterol. Our data show that the regulation of the A $\beta$ /cholesterol efflux mechanisms in the BBB begins early (3 months) in the development of AD-like neuropathology in 3xTg-AD mice. Abcg4 and Abca1 are the first efflux transporters to become over-abundant in brain capillary extracts from 3-month-old 3xTg-AD mice (Fig. 2A, B and Fig. 4A, B). This shows that the BBB regulation begins before the formation of senile plaques or neurofibrillary tangles which appear in 3xTg-AD mice at about 9–10 months [37]. The increase in Abcg4 was transient since it did not occur in later stages of AD (in mice aged 6 and 18 months). Our results agree with those of studies showing that Abcg4

and Abca1 amounts are above-normal in human AD brains (microglial cells for Abcg4 and hippocampus for Abca1) and in hippocampal neurons of A $\beta$ PP/PS1 mice (Abca1) [32–34].

At early (3 months) stage we saw no change in the brain uptake clearance of [ $^3H$ ]A $\beta$ <sub>1–40</sub> (Fig. 5). We suggest that the efflux transporters Abcg4 and Abca1 are regulated to offset the increase in Rage. If so, these early changes in BBB transporters could be an initial defense against the accumulation of A $\beta$  in the brain. There is evidence that Abcg4 is important for clearing A $\beta$  from mouse cerebral tissue via the BBB [21]. The role of Abca1 is, however, not very clear since Abca1 itself does not directly transport A $\beta$  across the mouse BBB [21, 53].

The amount of Abca1 also increased in older 3xTg-AD mice BBB and was maximal (x 3.2) in 6-month-old 3xTg-AD mice. Besides, the BBB efflux of [ $^3H$ ]cholesterol was enhanced in 3 and 6 months but not in 18-month-old 3xTg-AD mice (Fig. 6). In 3-month-old 3xTg-AD mice BBB, the 1.3-fold increase of Abca1 amount was associated with a 1.4-fold increase of Abcg4 amount, which was not the case in 6- and 18-month-old 3xTg-AD mice. This suggests that the increase of [ $^3H$ ]cholesterol efflux occurring in 3-month-old 3xTg-AD mice might be mediated by Abca1 and/or Abcg4. On the contrary, the increase of the BBB [ $^3H$ ]cholesterol efflux occurring in 6-month-old 3xTg-AD mice might only be mediated by Abca1, since the BBB Abcg4 amount was unchanged in 6-month-old 3xTg-AD mice. But despite a 1.3-fold increase of the Abca1 amount, the [ $^3H$ ]cholesterol efflux was unchanged in 18-month-old 3xTg-AD mice BBB. This suggests that a 3.2-fold enhance in Abca1 protein is needed to observe an Abca1-mediated decrease of [ $^3H$ ]cholesterol efflux at the BBB level. The increased of Abca1 production and function could provide an indirect control of brain A $\beta$  by regulating brain cholesterol. We suggest that this is a second mechanism of preventing the accumulation A $\beta$  in the brain. There have been several reports of a reciprocal relationship between the amount of Abca1 in the brain and the cerebral A $\beta$  level [35, 54, 55]. But exactly how Abca1 affects the amount of A $\beta$  in the brain is not fully understood. A recent *in vitro* study suggests that Abca1 mediates the transport of an A $\beta$ -cholesterol complex from the brain to the peripheral compartment [56]. However, studies in our laboratory found no difference in the  $Cl_{up}$  of [ $^3H$ ]A $\beta$ <sub>1–40</sub> of *Abca1*(+/+) and *Abca1*(-/-) mice perfused with [ $^3H$ ]A $\beta$ <sub>1–40</sub> and unlabeled cholesterol (data not shown). Other studies suggest that Abca1 could indirectly regulate the

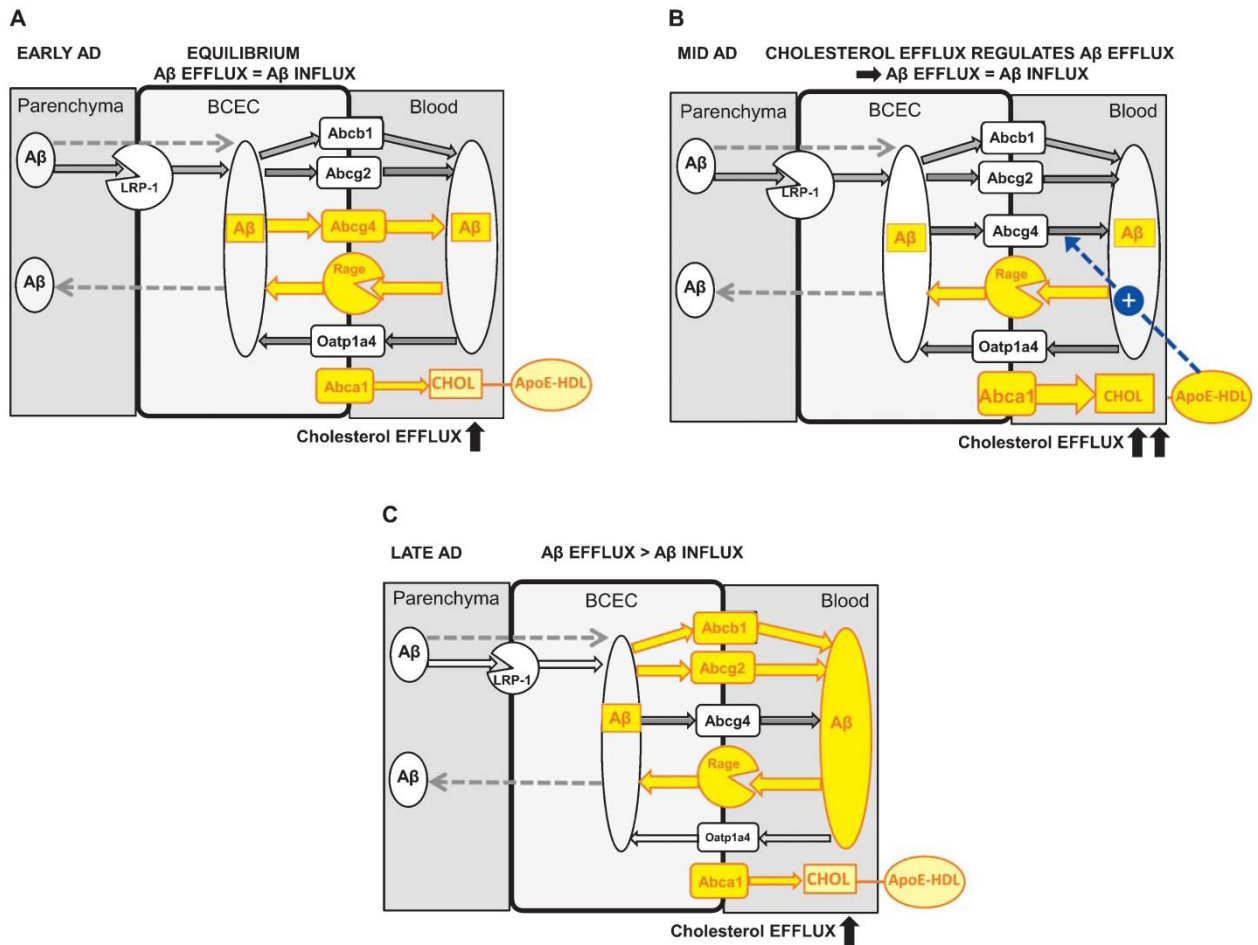


Fig. 7. Diagram showing the transport directions and concentrations of A $\beta$  and cholesterol transporters at the BBB as a function of the severity of AD. Yellow arrows represent increased transporters (Colours are visible in the online version of the article; <http://dx.doi.org/10.3233/JAD-150350>). A) The transport of A $\beta$  peptides across the BBB is in equilibrium in early AD. The early increase in the amount of A $\beta$  influx transporter RAGE in the BBB is offset by an increase in the amount of the A $\beta$  efflux transporter Abcg4 at the BBB. There is also a small increase in the amount of the BBB cholesterol transporter Abca1. B) The increased amount of RAGE at the BBB is maintained in the 6 month-old mice (mid AD) while the early synthesis of Abcg4 is slowed. The BBB transport of A $\beta$  is unchanged. The increase in the amount of the cholesterol transporter Abca1 at the BBB, which is maximal at mid AD may indirectly affect the Abcg4-mediated transport of A $\beta$  across the BBB and help maintaining the flux of these peptides across the BBB. C) The equilibration transport of A $\beta$  breaks down in late AD (18-month-old mice). While the amount of RAGE in the BBB remains elevated, the BBB amount of Lrp-1 decreases slightly. The amounts of two A $\beta$  efflux transporters (Abcb1 and Abcg2) in the BBB increase and the amount of the A $\beta$  influx transporter (Oatp1a4) in the BBB decreases slightly. This results in a significant increase in the efflux of these peptides across the BBB.

amount of A $\beta$  in the brain via an ApoE-dependent pathway. Indeed, Abca1 was found to mediate the lipidation of ApoE to form PC-rich ApoE-HDL [57–59]. Interestingly, it has been shown that substrates of Abcg4 like cholesterol were effluxed from cells to ApoE-HDL [21, 60]. We then hypothesized that an increase of Abca1 amount and function at the mouse BBB level could lead to an increase of ApoE-HDL which in turns stimulates the Abcg4-mediated efflux of A $\beta$ . This hypothesis is supported by recent studies showing that the stimulation of the retinoid X receptor (RXR), an Abca1 and Abcg4 transcription factor [61], resulted in an increase

of the BBB clearance of A $\beta$  in *ApoE4* competent mice but not in *ApoE4* knock-out mice [57, 62]. Further studies are needed to determine the exact role of Abca1 in the regulation of brain A $\beta$  and the part it plays in AD. Nevertheless, there appears to be a close relationship between cholesterol/A $\beta$  transporters like Abca1 and Abcg4 in the regulation of brain A $\beta$ .

Our data also evidenced a late regulation of the BBB A $\beta$  transporters. Indeed, while the amount of RAGE (influx of A $\beta$ ) is still increased (1.8-times) and the amount of Lrp-1 (efflux of A $\beta$ ) is decreased in 18-month-old 3xTg-AD mice (Fig. 1A, B and Fig. 3A, B),

the amounts of two ABC efflux transporters, Abcb1 and Abcg2, are significantly increased (1.7-fold) in 18-month-old 3xTg-AD mice (Fig. 2C-F). Our results agree with previous studies showing a late increase of Abcg2 and a decrease of Lrp-1 in the BBB of transgenic AD mice and in human AD brains [20, 31, 63]. On the contrary, some other studies have detected a downregulation of Abcb1 in transgenic mice or AD patients [29, 63, 64]. The discrepancy between our study and previous animal studies could be due to the differences in the AD animal models used and/or the time at which the BBB amounts Abcb1 were measured. For example, a decrease in the BBB amount of Abcb1 has been detected in 3-month-old Tg2576 transgenic mice, as compared to wild-type controls [63]. However, the Tg2576 mice are different from 3xTg-AD mice in term of genetic modifications. While 3xTg-AD mice express three human mutant genes, the Tg2576 mice have only a mutant form of A $\beta$ PP. Consequently, the 3xTg-AD mice develop both plaques and tangles while the latter is absent in Tg2576 mice. This difference might have an impact on the type of A $\beta$ -transporters regulated and the moments at which these regulations begin. Thus, while the increase in BBB amount of Abcb1 was observed in old 3xTg-AD mice aged 18 months, the downregulation of Abcb1 amount was found in young 3-month-old Tg2576 mice. In addition, no difference in the BBB amount of RAGE has been observed in young Tg2576 mice while the up-regulation of this receptor has been observed early in 3-month-old 3xTg-AD mice.

In humans, however, the BBB amounts of Abcb1 are dependent on multiple factors other than AD, such as age, genetic polymorphisms, and coexisting diseases. Thus, the number of patients included in these studies must be large enough to confirm the expression pattern of Abcb1 in AD.

Abcb1 and Abcg2 have been recently suggested to function as gatekeepers at the BBB to prevent the circulated A $\beta$  peptides from entering the brain [65, 66]. Up-regulation of Abcb1 or Abcg2 in response to cerebral amyloid accumulation have also been observed in old rats' choroid plexus or in late-stage AD brains, respectively [20, 67]. In the current study, the down regulation of Lrp-1, another A $\beta$  efflux transporter, and the up-regulation of RAGE in 18-month-old 3xTg-AD mice could induce an increase in the blood-to-brain flux of A $\beta$ . However, this increase in the A $\beta$  influx was counterbalanced by an increase in the amount of both Abcb1 and Abcg2 in combination with a slight decrease of Oatp1a4 in 3xTg-AD mice. Consequently, the Cl<sub>up</sub> of [<sup>3</sup>H]A $\beta$ <sub>1-40</sub> was significantly decreased in

these mice (Fig. 5). This suggests that there is a third defense mechanism operating in 18-month-old 3xTg-AD mice to reduce the cerebral amyloid burden in these mice. Our results agree with recent studies showing that the plasma concentrations of A $\beta$  tend to increase in 15- and 22-month-old 3xTg-AD mice compared to younger mice aged 9 and 17 months, respectively, maybe as the result of an enhanced A $\beta$  efflux from the brain [68–70]. However, this late-onset system may not be sufficient to reverse the accumulation of A $\beta$  in the brains of AD patients or those of 3xTg-AD mice [37, 71].

As the regulation of the transporters involved in the mouse BBB A $\beta$  efflux occurs at different stage of the pathology (i.e., 3 months for Abcg4 and 18 months for Abcb1/Abcg2), we hypothesized that the mechanisms involved in the regulation of Abcg4 and Abcb1/Abcg2 are different. The mechanisms underlying the early increase in the amount of Abcg4 at the BBB of 3xTg-AD mice remain unknown. There is little published information on the regulation of this transporter in the brain. Although the sequence of Abcg4 is very similar to that of Abcg1, another well-known cholesterol transporter, it seems to be regulated differently. Abcg1 synthesis is increased in response to both RXR and LXR (liver X receptor) agonists, while that of Abcg4 is only regulated by RXR agonists [61, 72]. In contrast, Abcb1 and Abcg2 share the same transcription factors (e.g., pregnane X receptor) and constitutive androstane receptor) [73, 74]. It has also been suggested that inflammatory conditions can modify the synthesis and/or function of both Abcb1 and Abcg2 at the BBB [75–77]. Elevated concentrations of cytokines such as TNF- $\alpha$  were detected recently in 3xTg-AD mice aged 16 months [77]. These inflammatory conditions may favor the late increases in Abcb1/Abcg2 in these mice. Further mechanistic studies are thus necessary to confirm and establish the factors regulating the synthesis of A $\beta$  efflux and/or influx transporters in the brain capillaries. A thorough understanding of these regulatory mechanisms could lead to the development of therapeutic strategies eliminating A $\beta$  from the brain.

In this study, we did not use transporter inhibitors to evaluate the extent to which each transporter exerts an effect on the brain uptake clearance of A $\beta$  because of the non-specificity of these compounds. Moreover, at each stage of the disease, there were often more than one A $\beta$  transporter that were regulated at the BBB of 3xTg-AD mice. The results obtained with non-specific inhibitors could be very difficult to interpret. However, it would be interesting to study the BBB

transport of A $\beta$  in 3xTg-AD mice that are knocked-out or knocked-in for an A $\beta$  transporter. The use of transporter inhibitors in these cases would be more valuable to confirm the effect of the studied transporter on the BBB transport of A $\beta$  in the AD transgenic mice.

In conclusion, the increase in RAGE is associated with compensatory regulation of A $\beta$  and cholesterol efflux transporters in the BBB so as to reduce the amount of A $\beta$  in the brain. We have identified three lines of defense (early, mid, and late) at the BBB. Figure 7 summarizes the changes at the BBB during the AD-like aging of our murine model of AD. The early increase in brain A $\beta$  uptake mediated by the receptor RAGE is offset by increased elimination of A $\beta$  from the brain mediated by the efflux transporter Abcg4. This seems to be the initial defense system limiting the accumulation of A $\beta$  in the brain; it keeps the flux of A $\beta$  across the BBB in equilibrium. The increase in the RAGE-mediated influx of A $\beta$  into the brain is no longer offset by an increase in A $\beta$  efflux transporter Abcg4 from the brain in older mice (6 months). The influx and efflux of A $\beta$  should be therefore no longer in equilibrium. However, A $\beta$  Cl<sub>up</sub> is still maintained. This could be due to an increase in the synthesis of the cholesterol transporter Abca1 whose level is maximal in 6-month-old mice and may indirectly control the transport of A $\beta$  across the BBB. This is our postulated indirect second mechanism of limiting the accumulation of A $\beta$  in the brain. Lastly, 18-month-old mice with late stage AD have a third mechanism for clearing A $\beta$  from the brain. This involves the increased synthesis of two A $\beta$  efflux transporters (Abcg2/Abcb1) and a slight decrease in an influx transporter (Oatp1a4) which results in a significant decrease in the uptake of A $\beta$  by the brain. Our results provide further evidence that the BBB is a dynamic barrier, adapting its transporter profile in response to pathological conditions. The most efficient therapeutic strategy for limiting the accumulation of A $\beta$  in the brain as early as possible in disease development could be to block A $\beta$  influx by inhibiting RAGE and/or Oatp1a4, or to stimulate the synthesis and/or function of Abca1 and/or Abcg4 at the BBB.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Owen Parkes for editing the English text and Valérie Domergue-Dupont, head of the Faculty of Pharmacy central animal facility, for taking care of the mice. We are grateful for the assistance of Claudine Deloménie (Trans-Prot, IFR141-IPSIT) in

technical support for this work, particularly relating to mouse genotyping.

This work was supported by Paris Sud University (France), Paris Descartes University (France), Laval University (Quebec, Qc, Canada), the Canadian Institutes of Health Research (MOP 102532) and the "Fonds de la recherche en santé du Québec" (Canada).

Authors' disclosures available online (<http://j-alz.com/manuscript-disclosures/15-0350r1>).

## REFERENCES

- [1] Mawuenyega KG, Sigurdson W, Ovod V, Munsell L, Kasten T, Morris JC, Yarasheski KE, Bateman RJ (2010) Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* **330**, 1774.
- [2] Gosselet F, Candela P, Cecchelli R, Fenart L (2011) [Role of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease]. *Med Sci (Paris)* **27**, 987-992.
- [3] Roberts KF, Elbert DL, Kasten TP, Patterson BW, Sigurdson WC, Connors RE, Ovod V, Munsell LY, Mawuenyega KG, Miller-Thomas MM, Moran CJ, Cross DT, 3rd, Derdeyn CP, Bateman RJ (2014) Amyloid-beta efflux from the central nervous system into the plasma. *Ann Neurol* **76**, 837-844.
- [4] Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ (2010) Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* **37**, 13-25.
- [5] Mann GE, Zlokovic BV, Yudilevich DL (1985) Evidence for a lactate transport system in the sarcolemmal membrane of the perfused rabbit heart: Kinetics of unidirectional influx, carrier specificity and effects of glucagon. *Biochim Biophys Acta* **819**, 241-248.
- [6] Zlokovic BV, Segal MB, Begley DJ, Davson H, Rakic L (1985) Permeability of the blood-cerebrospinal fluid and blood-brain barriers to thyrotropin-releasing hormone. *Brain Res* **358**, 191-199.
- [7] Campos-Bedolla P, Walter FR, Veszelka S, Deli MA (2014) Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch Med Res* **45**, 610-638.
- [8] Zlokovic BV (1995) Cerebrovascular permeability to peptides: Manipulations of transport systems at the blood-brain barrier. *Pharm Res* **12**, 1395-1406.
- [9] Mackic JB, Bading J, Ghiso J, Walker L, Wisniewski T, Frangione B, Zlokovic BV (2002) Circulating amyloid-beta peptide crosses the blood-brain barrier in aged monkeys and contributes to Alzheimer's disease lesions. *Vascul Pharmacol* **38**, 303-313.
- [10] Zlokovic BV, Begley DJ, Chain-Eliash DG (1985) Blood-brain barrier permeability to leucine-enkephalin, D-alanine2-D-leucine5-enkephalin and their N-terminal amino acid (tyrosine). *Brain Res* **336**, 125-132.
- [11] Zlokovic BV, Lipovac MN, Begley DJ, Davson H, Rakic L (1987) Transport of leucine-enkephalin across the blood-brain barrier in the perfused guinea pig brain. *J Neurochem* **49**, 310-315.
- [12] Do TM, Bedussi B, Chasseigneaux S, Dodacki A, Yapo C, Chacun H, Scherrmann JM, Farinotti R, Bourasset F (2013) Oatp1a4 and an L-thyroxine-sensitive transporter mediate the mouse blood-brain barrier transport of amyloid-beta peptide. *J Alzheimers Dis* **36**, 555-561.

- [13] Abuznait AH, Kaddoumi A (2012) Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci* **3**, 820-831.
- [14] Mackic JB, Stins M, McComb JG, Calero M, Ghiso J, Kim KS, Yan SD, Stern D, Schmidt AM, Frangione B, Zlokovic BV (1998) Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1-40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. *J Clin Invest* **102**, 734-743.
- [15] Deane R, Du Yan S, Subramanyam RK, LaRue B, Jovanovic S, Hogg E, Welch D, Maness L, Lin C, Yu J, Zhu H, Ghiso J, Frangione B, Stern A, Schmidt AM, Armstrong DL, Arnold B, Liliensiek B, Nawroth P, Hofman F, Kindy M, Stern D, Zlokovic B (2003) Rage mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat Med* **9**, 907-913.
- [16] Liu LP, Hong H, Liao JM, Wang TS, Wu J, Chen SS, Li YQ, Long Y, Xia YZ (2009) Up-regulation of Rage at the blood-brain barrier in streptozotocin-induced diabetic mice. *Synapse* **63**, 636-642.
- [17] Candela P, Gosselet F, Saint-Pol J, Sevin E, Boucau MC, Boulanger E, Cecchelli R, Fenart L (2010) Apical-to-basolateral transport of amyloid-beta peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *J Alzheimers Dis* **22**, 849-859.
- [18] Deane R, Wu Z, Sagare A, Davis J, Du Yan S, Hamm K, Xu F, Parisi M, LaRue B, Hu HW, Spijkers P, Guo H, Song X, Lenting PJ, Van Nostrand WE, Zlokovic BV (2004) Lrp/amyloid beta-peptide interaction mediates differential brain efflux of Abeta isoforms. *Neuron* **43**, 333-344.
- [19] Bell RD, Deane R, Chow N, Long X, Sagare A, Singh I, Streb JW, Guo H, Rubio A, Van Nostrand W, Miano JM, Zlokovic BV (2009) SRF and myocardin regulate Lrp-mediated amyloid-beta clearance in brain vascular cells. *Nat Cell Biol* **11**, 143-153.
- [20] Xiong H, Callaghan D, Jones A, Bai J, Rasquinha I, Smith C, Pei K, Walker D, Lue LF, Stanimirovic D, Zhang W (2009) Abcg2 is upregulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for Abeta(1-40) peptides. *J Neurosci* **29**, 5463-5475.
- [21] Do TM, Noel-Hudson MS, Ribes S, Besengez C, Smirnova M, Cisternino S, Buysse M, Calon F, Chimini G, Chacun H, Scherrmann JM, Farinotti R, Bourasset F (2012) Abcg2- and Abcg4-mediated efflux of amyloid-beta peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier. *J Alzheimers Dis* **30**, 155-166.
- [22] Lam FC, Liu R, Lu P, Shapiro AB, Renoir JM, Sharom FJ, Reiner PB (2001) beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J Neurochem* **76**, 1121-1128.
- [23] Ito S, Ohtsuki S, Murata S, Katsukura Y, Suzuki H, Funaki M, Tachikawa M, Terasaki T (2014) Involvement of insulin-degrading enzyme in insulin- and atrial natriuretic peptide-sensitive internalization of amyloid-beta peptide in mouse brain capillary endothelial cells. *J Alzheimers Dis* **38**, 185-200.
- [24] Nishida Y, Ito S, Ohtsuki S, Yamamoto N, Takahashi T, Iwata N, Jishage K, Yamada H, Sasaguri H, Yokota S, Piao W, Tomimitsu H, Saïdo TC, Yanagisawa K, Terasaki T, Mizusawa H, Yokota T (2009) Depletion of vitamin E increases amyloid beta accumulation by decreasing its clearances from brain and blood in a mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* **284**, 33400-33408.
- [25] Shiiki T, Ohtsuki S, Kurihara A, Naganuma H, Nishimura K, Tachikawa M, Hosoya K, Terasaki T (2004) Brain insulin impairs amyloid-beta(1-40) clearance from the brain. *J Neurosci* **24**, 9632-9637.
- [26] Pahnke J, Langer O, Krohn M (2014) Alzheimer's and ABC transporters - new opportunities for diagnostics and treatment. *Neurobiol Dis* **72**, 54-60.
- [27] Vogelgesang S, Cascorbi I, Schroeder E, Pahnke J, Kroemer HK, Siegmund W, Kunert-Keil C, Walker LC, Warzok RW (2002) Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* **12**, 535-541.
- [28] Silverberg GD, Messier AA, Miller MC, Machan JT, Majmudar SS, Stopa EG, Donahue JE, Johanson CE (2010) Amyloid efflux transporter expression at the blood-brain barrier declines in normal aging. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 1034-1043.
- [29] Wijesuriya HC, Bullock JY, Faull RL, Hladky SB, Barrand MA (2010) ABC efflux transporters in brain vasculature of Alzheimer's subjects. *Brain Res* **1358**, 228-238.
- [30] Silverberg GD, Miller MC, Messier AA, Majmudar S, Machan JT, Donahue JE, Stopa EG, Johanson CE (2010) Amyloid deposition and influx transporter expression at the blood-brain barrier increase in normal aging. *J Neuropathol Exp Neurol* **69**, 98-108.
- [31] Donahue JE, Flaherty SL, Johanson CE, Duncan JA, 3rd, Silverberg GD, Miller MC, Tavares R, Yang W, Wu Q, Sabo E, Hovanesian V, Stopa EG (2006) Rage, Lrp-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **112**, 405-415.
- [32] Uehara Y, Yamada T, Baba Y, Miura S, Abe S, Kitajima K, Higuchi MA, Iwamoto T, Saku K (2008) ATP-binding cassette transporter G4 is highly expressed in microglia in Alzheimer's brain. *Brain Res* **1217**, 239-246.
- [33] Akram A, Schmeidler J, Katsel P, Hof PR, Haroutunian V (2010) Increased expression of cholesterol transporter Abca1 is highly correlated with severity of dementia in AD hippocampus. *Brain Res* **1318**, 167-177.
- [34] Kim WS, Bhatia S, Elliott DA, Agholme L, Kagedal K, McCann H, Halliday GM, Barnham KJ, Garner B (2010) Increased ATP-binding cassette transporter A1 expression in Alzheimer's disease hippocampal neurons. *J Alzheimers Dis* **21**, 193-205.
- [35] Koldamova R, Staufenbiel M, Lefterov I (2005) Lack of Abca1 considerably decreases brain ApoE level and increases amyloid deposition in APP23 mice. *J Biol Chem* **280**, 43224-43235.
- [36] Koldamova R, Lefterov I, Staufenbiel M, Wolfe D, Huang S, Glorioso J, Walter M, Roth M, Lazo J (2005) The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production *in vitro* and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* **280**, 4079-4088.
- [37] Oddo S, Caccamo A, LaFerla F (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409-421.
- [38] Julien C, Tremblay C, Phivilay A, Berthiaume L, Emond V, Julien P, Calon F (2008) High-fat diet aggravates amyloid-beta and tau pathologies in the 3xTg-AD mouse model. *Neurobiol Aging* **31**, 1516-1531.
- [39] Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005) Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* **45**, 675-688.

- [40] Stargardt A, Gillis J, Kamphuis W, Wiemhoefer A, Kooijman L, Raspe M, Benckhuijsen W, Drijfhout JW, Hol EM, Reits E (2013) Reduced amyloid-beta degradation in early Alzheimer's disease but not in the APP<sup>swe</sup>PS1<sup>DE9</sup> and 3xTg-AD mouse models. *Aging Cell* **12**, 499-507.
- [41] Davis KE, Fox S, Gigg J (2014) Increased hippocampal excitability in the 3xTgAD mouse model for Alzheimer's disease *in vivo*. *PLoS One* **9**, e91203.
- [42] Dagenais C, Rousselle C, Pollack GM, Scherrmann JM (2000) Development of an *in situ* mouse brain perfusion model and its application to mdrla P-glycoprotein-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 381-386.
- [43] Do TM, Alata W, Dodacki A, Traversy MT, Chacun H, Pradier L, Scherrmann JM, Farinotti R, Calon F, Bourasset F (2014) Altered cerebral vascular volumes and solute transport at the blood-brain barriers of two transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **81**, 311-317.
- [44] Bourasset F, Ouellet M, Tremblay C, Julien C, Do TM, Oddo S, LaFerla F, Calon F (2009) Reduction of the cerebrovascular volume in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* **56**, 808-813.
- [45] Thakker DR, Weatherspoon MR, Harrison J, Keene TE, Lane DS, Kaemmerer WF, Stewart GR, Shafer LL (2009) Intracerebroventricular amyloid-beta antibodies reduce cerebral amyloid angiopathy and associated micro-hemorrhages in aged Tg2576 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4501-4506.
- [46] Cao C, Cirrito JR, Lin X, Wang L, Verges DK, Dickson A, Mamcarz M, Zhang C, Mori T, Arendash GW, Holtzman DM, Potter H (2009) Caffeine suppresses amyloid-beta levels in plasma and brain of Alzheimer's disease transgenic mice. *J Alzheimers Dis* **17**, 681-697.
- [47] Ito S, Ohtsuki S, Terasaki T (2006) Functional characterization of the brain-to-blood efflux clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the rat blood-brain barrier. *Neurosci Res* **56**, 246-252.
- [48] Deane R, Singh I, Sagare AP, Bell RD, Ross NT, LaRue B, Love R, Perry S, Paquette N, Deane RJ, Thiyagarajan M, Zarcone T, Fritz G, Friedman AE, Miller BL, Zlokovic BV (2012) A multimodal Rage-specific inhibitor reduces amyloid beta-mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* **122**, 1377-1392.
- [49] Weller RO, Massey A, Newman TA, Hutchings M, Kuo YM, Roher AE (1998) Cerebral amyloid angiopathy: Amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* **153**, 725-733.
- [50] Gregory GC, Halliday GM (2005) What is the dominant A $\beta$  species in human brain tissue? A review. *Neurotox Res* **7**, 29-41.
- [51] Matsuzaki K (2007) Physicochemical interactions of amyloid beta-peptide with lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1935-1942.
- [52] Miller MC, Tavares R, Johanson CE, Hovanesian V, Donahue JE, Gonzalez L, Silverberg GD, Stopa EG (2008) Hippocampal Rage immunoreactivity in early and advanced Alzheimer's disease. *Brain Res* **1230**, 273-280.
- [53] Akanuma S, Ohtsuki S, Doi Y, Tachikawa M, Ito S, Hori S, Asashima T, Hashimoto T, Yamada K, Ueda K, Iwatsubo T, Terasaki T (2008) ATP-binding cassette transporter A1 (Abca1) deficiency does not attenuate the brain-to-blood efflux transport of human amyloid-beta peptide (1-40) at the blood-brain barrier. *Neurochem Int* **52**, 956-961.
- [54] Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Kim J, Li A, Knoten A, Jain S, Hirsch-Reinshagen V, Wellington CL, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (2008) Overexpression of Abca1 reduces amyloid deposition in the PDAPP mouse model of Alzheimer disease. *J Clin Invest* **118**, 671-682.
- [55] Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Hartman RE, Bales KR, Paul SM, Holtzman DM (2005) Deletion of Abca1 increases A $\beta$  deposition in the PDAPP transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J Biol Chem* **280**, 43236-43242.
- [56] Umeda T, Mori H, Zheng H, Tomiyama T (2010) Regulation of cholesterol efflux by amyloid beta secretion. *J Neurosci Res* **88**, 1985-1994.
- [57] Bachmeier C, Beaulieu-Abdelahad D, Crawford F, Mullan M, Paris D (2013) Stimulation of the retinoid X receptor facilitates beta-amyloid clearance across the blood-brain barrier. *J Mol Neurosci* **49**, 270-276.
- [58] Jiang Q, Lee CY, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, Mann K, Lamb B, Willson TM, Collins JL, Richardson JC, Smith JD, Comery TA, Riddell D, Holtzman DM, Tontonoz P, Landreth GE (2008) ApoE promotes the proteolytic degradation of A $\beta$ . *Neuron* **58**, 681-693.
- [59] Tokuda T, Calero M, Matsubara E, Vidal R, Kumar A, Permanne B, Zlokovic B, Smith JD, Ladu MJ, Rostagno A, Frangione B, Ghiso J (2000) Lipidation of apolipoprotein E influences its isoform-specific interaction with Alzheimer's amyloid beta peptides. *Biochem J* **348 Pt 2**, 359-365.
- [60] Sano O, Ito S, Kato R, Shimizu Y, Kobayashi A, Kimura Y, Kioka N, Hanada K, Ueda K, Matsuo M (2014) Abca1, Abcg1, and Abcg4 are distributed to distinct membrane meso-domains and disturb detergent-resistant domains on the plasma membrane. *PLoS One* **9**, e109886.
- [61] Engel T, Lorkowski S, Lueken A, Rust S, Schluter B, Berger G, Cullen P, Assmann G (2001) The human Abcg4 gene is regulated by oxysterols and retinoids in monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **288**, 483-488.
- [62] Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CY, Karlo JC, Zinn AE, Casali BT, Restivo JL, Goebel WD, James MJ, Brunden KR, Wilson DA, Landreth GE (2012) ApoE-directed therapeutics rapidly clear beta-amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science* **335**, 1503-1506.
- [63] Hartz AM, Miller DS, Bauer B (2010) Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Pharmacol* **77**, 715-723.
- [64] Mehta DC, Short JL, Nicolazzo JA (2013) Altered brain uptake of therapeutics in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Pharm Res* **30**, 2868-2879.
- [65] Tai LM, Loughlin AJ, Male DK, Romero IA (2009) P-glycoprotein and breast cancer resistance protein restrict apical-to-basolateral permeability of human brain endothelium to amyloid-beta. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 1079-1083.
- [66] Zhang W, Xiong H, Callaghan D, Liu H, Jones A, Pei K, Fatehi D, Brunette E, Stanimirovic D (2013) Blood-brain barrier transport of amyloid beta peptides in efflux pump knock-out animals evaluated by *in vivo* optical imaging. *Fluids Barriers CNS* **10**, 13.
- [67] Pascale CL, Miller MC, Chiu C, Boylan M, Caralopoulos IN, Gonzalez L, Johanson CE, Silverberg GD (2011) Amyloid-beta transporter expression at the blood-CSF barrier is age-dependent. *Fluids Barriers CNS* **8**, 21.
- [68] Liu Y, Studzinski C, Beckett T, Guan H, Hersh MA, Murphy MP, Klein R, Hersh LB (2009) Expression of neprilysin in skeletal muscle reduces amyloid burden in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Mol Ther* **17**, 1381-1386.
- [69] Liu Y, Studzinski C, Beckett T, Murphy MP, Klein RL, Hersh LB (2010) Circulating neprilysin clears brain amyloid. *Mol Cell Neurosci* **45**, 101-107.

- [70] Minami SS, Sidahmed E, Aid S, Shimoji M, Mochetti I, Rebeck GW, Prendergast JS, Dealwis C, Wetzel R, Bosetti F, Matsuoka Y, Hoe HS, Turner RS (2010) Therapeutic versus neuroinflammatory effects of passive immunization is dependent on Abeta/amyloid burden in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation* **7**, 57.
- [71] Oddo S, Caccamo A, Kitazawa M, Tseng BP, LaFerla FM (2003) Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* **24**, 1063-1070.
- [72] Tarr PT, Edwards PA (2008) Abcg1 and Abcg4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J Lipid Res* **49**, 169-182.
- [73] Lemmen J, Tozakidis IE, Bele P, Galla HJ (2013) Constitutive androstane receptor upregulates Abcb1 and Abcg2 at the blood-brain barrier after CITCO activation. *Brain Res* **1501**, 68-80.
- [74] Lemmen J, Tozakidis IE, Galla HJ (2013) Pregnane X receptor upregulates ABC-transporter Abcg2 and Abcb1 at the blood-brain barrier. *Brain Res* **1491**, 1-13.
- [75] von Wedel-Parlow M, Wolte P, Galla HJ (2009) Regulation of major efflux transporters under inflammatory conditions at the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neurochem* **111**, 111-118.
- [76] Yu C, Kastin AJ, Tu H, Waters S, Pan W (2007) TNF activates P-glycoprotein in cerebral microvascular endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* **20**, 853-858.
- [77] Zaheer S, Thangavel R, Wu Y, Khan MM, Kempuraj D, Zaheer A (2013) Enhanced expression of glia maturation factor correlates with glial activation in the brain of triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Neurochem Res* **38**, 218-225.

---

## REFERENCES

---

- Abbott, N.J., Rönnebeck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 41–53.
- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., and Begley, D.J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* *37*, 13–25.
- Aberuyi, N., Rahgozar, S., and Moafi, A. (2014). The role of ATP-binding cassette transporter A2 in childhood acute lymphoblastic leukemia multidrug resistance. *Iran. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* *4*, 118–126.
- Abuznait, A.H., and Kaddoumi, A. (2012). Role of ABC transporters in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *ACS Chem. Neurosci.* *3*, 820–831.
- Agarwal, S., and Elmquist, W.F. (2012). Insight into the cooperation of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) at the blood-brain barrier: a case study examining sorafenib efflux clearance. *Mol. Pharm.* *9*, 678–684.
- Agarwal, R., Kushwaha, S., Chhillar, N., Kumar, A., Dubey, D.K., and Tripathi, C.B. (2013). A cross-sectional study on thyroid status in North Indian elderly outpatients with dementia. *Ann. Indian Acad. Neurol.* *16*, 333–337.
- Agarwal, S., Sane, R., Ohlfest, J.R., and Elmquist, W.F. (2011). The role of the breast cancer resistance protein (ABCG2) in the distribution of sorafenib to the brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *336*, 223–233.
- Aiello, R.J., Brees, D., Bourassa, P.-A., Royer, L., Lindsey, S., Coskran, T., Haghpassand, M., and Francone, O.L. (2002). Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *22*, 630–637.
- Akanuma, S., Ohtsuki, S., Doi, Y., Tachikawa, M., Ito, S., Hori, S., Asashima, T., Hashimoto, T., Yamada, K., Ueda, K., et al. (2008). ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) deficiency does not attenuate the brain-to-blood efflux transport of human amyloid-beta peptide (1-40) at the blood-brain barrier. *Neurochem. Int.* *52*, 956–961.
- Akiyama, H., Kondo, H., Ikeda, K., Kato, M., and McGeer, P.L. (2001). Immunohistochemical localization of neprilysin in the human cerebral cortex: inverse association with vulnerability to amyloid beta-protein (A $\beta$ ) deposition. *Brain Res.* *902*, 277–281.
- Albrecht, C., and Viturro, E. (2007). The ABCA subfamily--gene and protein structures, functions and associated hereditary diseases. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *453*, 581–589.
- Allen, J.D., van Loevezijn, A., Lakhai, J.M., van der Valk, M., van Tellingen, O., Reid, G., Schellens, J.H.M., Koomen, G.-J., and Schinkel, A.H. (2002). Potent and specific inhibition of the breast cancer resistance protein multidrug transporter in vitro and in mouse intestine by a novel analogue of fumitremorgin C. *Mol. Cancer Ther.* *1*, 417–425.
- Almutairi, M.M.A., Gong, C., Xu, Y.G., Chang, Y., and Shi, H. (2016). Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *73*, 57–77.



- Amtul, Z., Wang, L., Westaway, D., and Rozmahel, R.F. (2010). Neuroprotective mechanism conferred by 17beta-estradiol on the biochemical basis of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 169, 781–786.
- Annilo, T., Tammur, J., Hutchinson, A., Rzhetsky, A., Dean, M., and Allikmets, R. (2001). Human and mouse orthologs of a new ATP-binding cassette gene, ABCG4. *Cytogenet. Cell Genet.* 94, 196–201.
- Arbor, S.C., LaFontaine, M., and Cumbay, M. (2016). Amyloid-beta Alzheimer targets - protein processing, lipid rafts, and amyloid-beta pores. *Yale J. Biol. Med.* 89, 5–21.
- Arendt, T., Stieler, J.T., and Holzer, M. (2016). Tau and tauopathies. *Brain Res. Bull.* 126, 238–292.
- Armulik, A., Genové, G., Mäe, M., Nisancioglu, M.H., Wallgard, E., Niaudet, C., He, L., Norlin, J., Lindblom, P., Strittmatter, K., et al. (2010). Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 468, 557–561.
- Armulik, A., Genové, G., and Betsholtz, C. (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev. Cell* 21, 193–215.
- Aronica, E., Gorter, J.A., Redeker, S., van Vliet, E.A., Ramkema, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., van der Valk, P., Leenstra, S., Baayen, J.C., et al. (2005). Localization of breast cancer resistance protein (BCRP) in microvessel endothelium of human control and epileptic brain. *Epilepsia* 46, 849–857.
- Baldán, A., Tarr, P., Vales, C.S., Frank, J., Shimotake, T.K., Hawgood, S., and Edwards, P.A. (2006). Deletion of the transmembrane transporter ABCG1 results in progressive pulmonary lipidosis. *J. Biol. Chem.* 281, 29401–29410.
- Ballatore, C., Lee, V.M.-Y., and Trojanowski, J.Q. (2007). Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 663–672.
- Barage, S.H., and Sonawane, K.D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides* 52, 1–18.
- Barron, A.M., and Pike, C.J. (2012). Sex hormones, aging, and Alzheimer's disease. *Front. Biosci. Elite Ed.* 4, 976–997.
- Baumgart, M., Snyder, H.M., Carrillo, M.C., Fazio, S., Kim, H., and Johns, H. (2015). Summary of the evidence on modifiable risk factors for cognitive decline and dementia: A population-based perspective. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 11, 718–726.
- Bayes-Genis, A., Barallat, J., and Richards, A.M. (2016). A Test in Context: Nprilysin: Function, Inhibition, and Biomarker. *J. Am. Coll. Cardiol.* 68, 639–653.
- ter Beek, J., Guskov, A., and Slotboom, D.J. (2014). Structural diversity of ABC transporters. *J. Gen. Physiol.* 143, 419–435.
- Beis, K. (2015). Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 889–893.
- Belakavadi, M., Dell, J., Grover, G.J., and Fondell, J.D. (2011). Thyroid hormone suppression of  $\beta$ -amyloid precursor protein gene expression in the brain involves multiple epigenetic regulatory events. *Mol. Cell. Endocrinol.* 339, 72–80.

- Bell, R.D., Winkler, E.A., Sagare, A.P., Singh, I., LaRue, B., Deane, R., and Zlokovic, B.V. (2010). Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 68, 409–427.
- Bello, I., and Salerno, M. (2015). Evidence against a role of P-glycoprotein in the clearance of the Alzheimer's disease A $\beta$ 1-42 peptides. *Cell Stress Chaperones* 20, 421–430.
- Benilova, I., Karran, E., and De Strooper, B. (2012). The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat. Neurosci.* 15, 349–357.
- Bernacki, J., Dobrowolska, A., Nierwińska, K., and Małeck, A. (2008). Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharmacol. Rep. PR* 60, 600–622.
- Bernstein, H.G., Ansorge, S., Riederer, P., Reiser, M., Frölich, L., and Bogerts, B. (1999). Insulin-degrading enzyme in the Alzheimer's disease brain: prominent localization in neurons and senile plaques. *Neurosci. Lett.* 263, 161–164.
- Bierhaus, A., and Nawroth, P.P. (2009). Multiple levels of regulation determine the role of the receptor for AGE (RAGE) as common soil in inflammation, immune responses and diabetes mellitus and its complications. *Diabetologia* 52, 2251–2263.
- Bocchetta, S., Maillard, P., Yamamoto, M., Gondeau, C., Douam, F., Lebreton, S., Lagaye, S., Pol, S., Helle, F., Plengpanich, W., et al. (2014). Up-regulation of the ATP-binding cassette transporter A1 inhibits hepatitis C virus infection. *PLoS One* 9, e92140.
- Bojanic, D.D., Tarr, P.T., Gale, G.D., Smith, D.J., Bok, D., Chen, B., Nusinowitz, S., Lövgren-Sandblom, A., Björkhem, I., and Edwards, P.A. (2010). Differential expression and function of ABCG1 and ABCG4 during development and aging. *J. Lipid Res.* 51, 169–181.
- Boonstra, R., Timmer-Bosscha, H., van Echten-Arends, J., van der Kolk, D.M., van den Berg, A., de Jong, B., Tew, K.D., Poppema, S., and de Vries, E.G.E. (2004). Mitoxantrone resistance in a small cell lung cancer cell line is associated with ABCA2 upregulation. *Br. J. Cancer* 90, 2411–2417.
- Borst, P., and Schinkel, A.H. (1997). Genetic dissection of the function of mammalian P-glycoproteins. *Trends Genet. TIG* 13, 217–222.
- Bourasset, F., Cisternino, S., Tamsamani, J., and Scherrmann, J.-M. (2003). Evidence for an active transport of morphine-6-beta-d-glucuronide but not P-glycoprotein-mediated at the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 86, 1564–1567.
- Broccardo, C., Luciani, M., and Chimini, G. (1999). The ABCA subclass of mammalian transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 395–404.
- Bronger, H., König, J., Kopplow, K., Steiner, H.-H., Ahmadi, R., Herold-Mende, C., Keppler, D., and Nies, A.T. (2005). ABC drug efflux pumps and organic anion uptake transporters in human gliomas and the blood-tumor barrier. *Cancer Res.* 65, 11419–11428.
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O., et al. (1999). Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat. Genet.* 22, 336–345.
- Brouillette, J., Caillierez, R., Zommer, N., Alves-Pires, C., Benilova, I., Blum, D., De Strooper, B., and Buée, L. (2012). Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight

amyloid- $\beta$ 1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 7852–7861.

Brunden, K.R., Trojanowski, J.Q., and Lee, V.M.-Y. (2009). Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat. Rev. Drug Discov.* *8*, 783–793.

Cai, W., Zhang, K., Li, P., Zhu, L., Xu, J., Yang, B., Hu, X., Lu, Z., and Chen, J. (2016a). Dysfunction of the neurovascular unit in ischemic stroke and neurodegenerative diseases: An aging effect. *Ageing Res. Rev.*

Cai, Z., Liu, N., Wang, C., Qin, B., Zhou, Y., Xiao, M., Chang, L., Yan, L.-J., and Zhao, B. (2016b). Role of RAGE in Alzheimer's Disease. *Cell. Mol. Neurobiol.* *36*, 483–495.

Callaghan, R. (2015). Providing a molecular mechanism for P-glycoprotein; why would I bother? *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 995–1002.

Calpe-Berdiel, L., Zhao, Y., de Graauw, M., Ye, D., van Santbrink, P.J., Mommaas, A.M., Foks, A., Bot, M., Meurs, I., Kuiper, J., et al. (2012). Macrophage ABCA2 deletion modulates intracellular cholesterol deposition, affects macrophage apoptosis, and decreases early atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *Atherosclerosis* *223*, 332–341.

Candela, P., Gosselet, F., Saint-Pol, J., Sevin, E., Boucau, M.-C., Boulanger, E., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2010). Apical-to-basolateral transport of amyloid- $\beta$  peptides through blood-brain barrier cells is mediated by the receptor for advanced glycation end-products and is restricted by P-glycoprotein. *J. Alzheimers Dis. JAD* *22*, 849–859.

Candela, P., Saint-Pol, J., Kuntz, M., Boucau, M.-C., Lamartiniere, Y., Gosselet, F., and Fenart, L. (2015). In vitro discrimination of the role of LRP1 at the BBB cellular level: focus on brain capillary endothelial cells and brain pericytes. *Brain Res.* *1594*, 15–26.

Cecchelli, R., Berezowski, V., Lundquist, S., Culot, M., Renftel, M., Dehouck, M.-P., and Fenart, L. (2007). Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* *6*, 650–661.

Chapy, H., Goracci, L., Vayer, P., Parmentier, Y., Carrupt, P.-A., Declèves, X., Scherrmann, J.-M., Cisternino, S., and Cruciani, G. (2015). Pharmacophore-based discovery of inhibitors of a novel drug/proton antiporter in human brain endothelial hCMEC/D3 cell line. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 4888–4904.

Chaves, C., Shawahna, R., Jacob, A., Scherrmann, J.-M., and Declèves, X. (2014). Human ABC transporters at blood-CNS interfaces as determinants of CNS drug penetration. *Curr. Pharm. Des.* *20*, 1450–1462.

Chen, H., Rossier, C., Lalioti, M.D., Lynn, A., Chakravarti, A., Perrin, G., and Antonarakis, S.E. (1996). Cloning of the cDNA for a human homologue of the *Drosophila* white gene and mapping to chromosome 21q22.3. *Am. J. Hum. Genet.* *59*, 66–75.

Chen, Z.J., Vulevic, B., Ile, K.E., Soulika, A., Davis, W., Reiner, P.B., Connop, B.P., Nathwani, P., Trojanowski, J.Q., and Tew, K.D. (2004). Association of ABCA2 expression with determinants of Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *18*, 1129–1131.

- Chiu, C., Miller, M.C., Monahan, R., Osgood, D.P., Stopa, E.G., and Silverberg, G.D. (2015). P-glycoprotein expression and amyloid accumulation in human aging and Alzheimer's disease: preliminary observations. *Neurobiol. Aging* *36*, 2475–2482.
- Choi, Y.H., and Yu, A.-M. (2014). ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr. Pharm. Des.* *20*, 793–807.
- Cirrito, J.R., Deane, R., Fagan, A.M., Spinner, M.L., Parsadanian, M., Finn, M.B., Jiang, H., Prior, J.L., Sagare, A., Bales, K.R., et al. (2005). P-glycoprotein deficiency at the blood-brain barrier increases amyloid-beta deposition in an Alzheimer disease mouse model. *J. Clin. Invest.* *115*, 3285–3290.
- Cisternino, S., Mercier, C., Bourasset, F., Roux, F., and Scherrmann, J.-M. (2004). Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. *Cancer Res.* *64*, 3296–3301.
- Ciuculescu, E.-D., Mekmouche, Y., and Faller, P. (2005). Metal-binding properties of the peptide APP170-188: a model of the ZnII-binding site of amyloid precursor protein (APP). *Chem. Weinh. Bergstr. Ger.* *11*, 903–909.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, J.P., Boccia, J., Casals, D., Bertino, J.R., and Melamed, M.R. (1990). Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *38*, 1277–1287.
- Crow, J.M., Nelson, J.D., and Remington, S.G. (2009). Human lipocalin-1 association with 3H-testosterone and 3H-estradiol. *Curr. Eye Res.* *34*, 1042–1049.
- Cserepes, J., Szentpétery, Z., Seres, L., Ozvegy-Laczka, C., Langmann, T., Schmitz, G., Glavinas, H., Klein, I., Homolya, L., Váradi, A., et al. (2004). Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *320*, 860–867.
- Cummins, P.M. (2012). Occludin: one protein, many forms. *Mol. Cell. Biol.* *32*, 242–250.
- Da Costa Dias, B., Jovanovic, K., Gonsalves, D., and Weiss, S.F.T. (2011). Structural and mechanistic commonalities of amyloid- $\beta$  and the prion protein. *Prion* *5*, 126–137.
- Dagenais, C., Rousselle, C., Pollack, G.M., and Scherrmann, J.M. (2000). Development of an in situ mouse brain perfusion model and its application to mdr1a P-glycoprotein-deficient mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *20*, 381–386.
- Dahlin, A., Royall, J., Hohmann, J.G., and Wang, J. (2009). Expression profiling of the solute carrier gene family in the mouse brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *329*, 558–570.
- Dal Prà, I., Chiarini, A., Gui, L., Chakravarthy, B., Pacchiana, R., Gardenal, E., Whitfield, J.F., and Armato, U. (2015). Do astrocytes collaborate with neurons in spreading the “infectious”  $\alpha\beta$  and Tau drivers of Alzheimer's disease? *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* *21*, 9–29.
- Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A.A., and Barres, B.A. (2010). Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* *468*, 562–566.
- Daneschvar, H.L., Aronson, M.D., and Smetana, G.W. (2015). Do statins prevent Alzheimer's disease? A narrative review. *Eur. J. Intern. Med.* *26*, 666–669.

- Davis, W. (2011). The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) regulates cholesterol homeostasis and low-density lipoprotein receptor metabolism in N2a neuroblastoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1811*, 1152–1164.
- Davis, W. (2014). The ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) regulates esterification of plasma membrane cholesterol by modulation of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* *1841*, 168–179.
- Davis, T.P., Sanchez-Covarubias, L., and Tome, M.E. (2014). P-glycoprotein trafficking as a therapeutic target to optimize CNS drug delivery. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* *71*, 25–44.
- Davis, W., Boyd, J.T., Ile, K.E., and Tew, K.D. (2004). Human ATP-binding cassette transporter-2 (ABCA2) positively regulates low-density lipoprotein receptor expression and negatively regulates cholesterol esterification in Chinese hamster ovary cells. *Biochim. Biophys. Acta* *1683*, 89–100.
- De Strooper, B., and Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* *164*, 603–615.
- Deane, R.J. (2012). Is RAGE still a therapeutic target for Alzheimer's disease? *Future Med. Chem.* *4*, 915–925.
- Deane, R., Du Yan, S., Subramanian, R.K., LaRue, B., Jovanovic, S., Hogg, E., Welch, D., Manness, L., Lin, C., Yu, J., et al. (2003). RAGE mediates amyloid-beta peptide transport across the blood-brain barrier and accumulation in brain. *Nat. Med.* *9*, 907–913.
- Deane, R., Bell, R.D., Sagare, A., and Zlokovic, B.V. (2009). Clearance of amyloid-beta peptide across the blood-brain barrier: implication for therapies in Alzheimer's disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* *8*, 16–30.
- Deane, R., Singh, I., Sagare, A.P., Bell, R.D., Ross, N.T., LaRue, B., Love, R., Perry, S., Paquette, N., Deane, R.J., et al. (2012). A multimodal RAGE-specific inhibitor reduces amyloid  $\beta$ -mediated brain disorder in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Invest.* *122*, 1377–1392.
- Deo, A.K., Borson, S., Link, J.M., Domino, K., Eary, J.F., Ke, B., Richards, T.L., Mankoff, D.A., Minoshima, S., O'Sullivan, F., et al. (2014). Activity of P-Glycoprotein, a  $\beta$ -Amyloid Transporter at the Blood-Brain Barrier, Is Compromised in Patients with Mild Alzheimer Disease. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* *55*, 1106–1111.
- DeToma, A.S., Salamekh, S., Ramamoorthy, A., and Lim, M.H. (2012). Misfolded proteins in Alzheimer's disease and type II diabetes. *Chem. Soc. Rev.* *41*, 608–621.
- Di Paolo, G., and Kim, T.-W. (2011). Linking lipids to Alzheimer's disease: cholesterol and beyond. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 284–296.
- Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Madrid, J.F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., Martín-Vasallo, P., and Díaz-Flores, L. (2009). Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol. Histopathol.* *24*, 909–969.
- Ding, H., and Johnson, G.V.W. (2008). The last tangle of tau. *J. Alzheimers Dis. JAD* *14*, 441–447.
- Do, T.M., Ouellet, M., Calon, F., Chimini, G., Chacun, H., Farinotti, R., and Bourasset, F. (2011). Direct evidence of abca1-mediated efflux of cholesterol at the mouse blood-brain barrier. *Mol. Cell. Biochem.* *357*, 397–404.

- Do, T.M., Noel-Hudson, M.-S., Ribes, S., Besengez, C., Smirnova, M., Cisternino, S., Buyse, M., Calon, F., Chimini, G., Chacun, H., et al. (2012). ABCG2- and ABCG4-mediated efflux of amyloid- $\beta$  peptide 1-40 at the mouse blood-brain barrier. *J. Alzheimers Dis. JAD* *30*, 155–166.
- Do, T.M., Bedussi, B., Chasseigneaux, S., Dodacki, A., Yapo, C., Chacun, H., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R., and Bourasset, F. (2013). Oatp1a4 and an L-thyroxine-sensitive transporter mediate the mouse blood-brain barrier transport of amyloid- $\beta$  peptide. *J. Alzheimers Dis. JAD* *36*, 555–561.
- Do, T.M., Dodacki, A., Alata, W., Calon, F., Nolicic, S., Scherrmann, J.-M., Farinotti, R., and Bourasset, F. (2015). Age-Dependent Regulation of the Blood-Brain Barrier Influx/Efflux Equilibrium of Amyloid- $\beta$  Peptide in a Mouse Model of Alzheimer's Disease (3xTg-AD). *J. Alzheimers Dis. JAD* *49*, 287–300.
- Donahue, J.E., Flaherty, S.L., Johanson, C.E., Duncan, J.A., Silverberg, G.D., Miller, M.C., Tavares, R., Yang, W., Wu, Q., Sabo, E., et al. (2006). RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *112*, 405–415.
- Doria, M., Maugest, L., Moreau, T., Lizard, G., and Vejux, A. (2016). Contribution of cholesterol and oxysterols to the pathophysiology of Parkinson's disease. *Free Radic. Biol. Med.* *101*, 393–400.
- Doyle, L.A., Yang, W., Abruzzo, L.V., Krogmann, T., Gao, Y., Rishi, A.K., and Ross, D.D. (1998). A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15665–15670.
- Dyrna, F., Hanske, S., Krueger, M., and Bechmann, I. (2013). The blood-brain barrier. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. Neuroimmune Pharmacol.* *8*, 763–773.
- Efferth, T., Gillet, J.-P., Sauerbrey, A., Zintl, F., Bertholet, V., de Longueville, F., Remacle, J., and Steinbach, D. (2006). Expression profiling of ATP-binding cassette transporters in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mol. Cancer Ther.* *5*, 1986–1994.
- Eggensperger, S., and Tampé, R. (2015). The transporter associated with antigen processing: a key player in adaptive immunity. *Biol. Chem.* *396*, 1059–1072.
- Eisele, Y.S. (2013). From soluble  $a\beta$  to progressive  $a\beta$  aggregation: could prion-like templated misfolding play a role? *Brain Pathol. Zurich Switz.* *23*, 333–341.
- Elali, A., and Rivest, S. (2013). The role of ABCB1 and ABCA1 in beta-amyloid clearance at the neurovascular unit in Alzheimer's disease. *Front. Physiol.* *4*, 45.
- Engel, T., Lorkowski, S., Lueken, A., Rust, S., Schlüter, B., Berger, G., Cullen, P., and Assmann, G. (2001). The human ABCG4 gene is regulated by oxysterols and retinoids in monocyte-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *288*, 483–488.
- Engelhardt, B., and Sorokin, L. (2009). The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin. Immunopathol.* *31*, 497–511.
- Erickson, M.A., Hansen, K., and Banks, W.A. (2012). Inflammation-induced dysfunction of the low-density lipoprotein receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier: protection by the antioxidant N-acetylcysteine. *Brain. Behav. Immun.* *26*, 1085–1094.
- Farmer, D.G.S., Ewart, M.-A., Mair, K.M., and Kennedy, S. (2014). Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) attenuates haemodynamic changes to chronic hypoxia in the mouse. *Pulm. Pharmacol. Ther.* *29*, 7–14.

- Farris, W., Schütz, S.G., Cirrito, J.R., Shankar, G.M., Sun, X., George, A., Leissring, M.A., Walsh, D.M., Qiu, W.Q., Holtzman, D.M., et al. (2007). Loss of neprilysin function promotes amyloid plaque formation and causes cerebral amyloid angiopathy. *Am. J. Pathol.* *171*, 241–251.
- Favari, E., Zanotti, I., Zimetti, F., Ronda, N., Bernini, F., and Rothblat, G.H. (2004). Probucol inhibits ABCA1-mediated cellular lipid efflux. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *24*, 2345–2350.
- Fojo, A., Lebo, R., Shimizu, N., Chin, J.E., Roninson, I.B., Merlino, G.T., Gottesman, M.M., and Pastan, I. (1986). Localization of multidrug resistance-associated DNA sequences to human chromosome 7. *Somat. Cell Mol. Genet.* *12*, 415–420.
- Förster, C. (2008). Tight junctions and the modulation of barrier function in disease. *Histochem. Cell Biol.* *130*, 55–70.
- Frelet, A., and Klein, M. (2006). Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Lett.* *580*, 1064–1084.
- Friche, E., Jensen, P.B., and Nissen, N.I. (1992). Comparison of cyclosporin A and SDZ PSC833 as multidrug-resistance modulators in a daunorubicin-resistant Ehrlich ascites tumor. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *30*, 235–237.
- Fromm, M.F. (2002). The influence of MDR1 polymorphisms on P-glycoprotein expression and function in humans. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *54*, 1295–1310.
- Fromm, M.F. (2004). Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 423–429.
- Fu, A.L., Zhou, C.Y., and Chen, X. (2010). Thyroid hormone prevents cognitive deficit in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology* *58*, 722–729.
- Fukumoto, H., Deng, A., Irizarry, M.C., Fitzgerald, M.L., and Rebeck, G.W. (2002). Induction of the cholesterol transporter ABCA1 in central nervous system cells by liver X receptor agonists increases secreted Abeta levels. *J. Biol. Chem.* *277*, 48508–48513.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* *123*, 1777–1788.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell Biol.* *141*, 1539–1550.
- Furuse, M., Hata, M., Furuse, K., Yoshida, Y., Haratake, A., Sugitani, Y., Noda, T., Kubo, A., and Tsukita, S. (2002). Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J. Cell Biol.* *156*, 1099–1111.
- Gao, B., Hagenbuch, B., Kullak-Ublick, G.A., Benke, D., Aguzzi, A., and Meier, P.J. (2000). Organic anion-transporting polypeptides mediate transport of opioid peptides across blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *294*, 73–79.
- Gelissen, I.C., Harris, M., Rye, K.-A., Quinn, C., Brown, A.J., Kockx, M., Cartland, S., Packianathan, M., Kritharides, L., and Jessup, W. (2006). ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 534–540.

Gelissen, I.C., Cartland, S., Brown, A.J., Sandoval, C., Kim, M., Dinnes, D.L., Lee, Y., Hsieh, V., Gaus, K., Kritharides, L., et al. (2010). Expression and stability of two isoforms of ABCG1 in human vascular cells. *Atherosclerosis* 208, 75–82.

Georgieva, J.V., Hoekstra, D., and Zuhorn, I.S. (2014). Smuggling Drugs into the Brain: An Overview of Ligands Targeting Transcytosis for Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics* 6, 557–583.

Gerson, J.E., Mudher, A., and Kaye, R. (2016). Potential mechanisms and implications for the formation of tau oligomeric strains. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1–15.

Ghribi, O., Larsen, B., Schrag, M., and Herman, M.M. (2006). High cholesterol content in neurons increases BACE, beta-amyloid, and phosphorylated tau levels in rabbit hippocampus. *Exp. Neurol.* 200, 460–467.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Jakes, R., Rutherford, D., and Crowther, R.A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 3, 519–526.

Goedert, M., Spillantini, M.G., Cairns, N.J., and Crowther, R.A. (1992). Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8, 159–168.

Gosselet, F., Candela, P., Sevin, E., Berezowski, V., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2009). Transcriptional profiles of receptors and transporters involved in brain cholesterol homeostasis at the blood-brain barrier: use of an in vitro model. *Brain Res.* 1249, 34–42.

Gosselet, F., Candela, P., Cecchelli, R., and Fenart, L. (2011). [Role of the blood-brain barrier in Alzheimer's disease]. *Med. Sci.* MS 27, 987–992.

Graham, A. (2015). Mitochondrial regulation of macrophage cholesterol homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 982–992.

Grimm, A., Lim, Y.-A., Mensah-Nyagan, A.G., Götz, J., and Eckert, A. (2012). Alzheimer's disease, oestrogen and mitochondria: an ambiguous relationship. *Mol. Neurobiol.* 46, 151–160.

Gu, L., and Guo, Z. (2013). Alzheimer's A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 peptides form interlaced amyloid fibrils. *J. Neurochem.* 126, 305–311.

Gu, X., and Manautou, J.E. (2010). Regulation of hepatic ABC transporters by xenobiotics and in disease states. *Drug Metab. Rev.* 42, 482–538.

Guillozet, A.L., Weintraub, S., Mash, D.C., and Mesulam, M.M. (2003). Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch. Neurol.* 60, 729–736.

Hagenbuch, B., and Meier, P.J. (2003). The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim. Biophys. Acta* 1609, 1–18.

Hagenbuch, B., and Stieger, B. (2013). The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 396–412.

Hardy, J., and Selkoe, D.J. (2002). The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* 297, 353–356.



- Hardy, J.A., and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256, 184–185.
- Harrison, O.J., Jin, X., Hong, S., Bahna, F., Ahlsen, G., Brasch, J., Wu, Y., Vendome, J., Felsovalyi, K., Hampton, C.M., et al. (2011). The extracellular architecture of adherens junctions revealed by crystal structures of type I cadherins. *Struct. Lond. Engl.* 1993 19, 244–256.
- Hartz, A.M.S., Miller, D.S., and Bauer, B. (2010). Restoring blood-brain barrier P-glycoprotein reduces brain amyloid-beta in a mouse model of Alzheimer's disease. *Mol. Pharmacol.* 77, 715–723.
- Hartz, A.M.S., Zhong, Y., Wolf, A., LeVine, H., Miller, D.S., and Bauer, B. (2016). A $\beta$ 40 Reduces P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier through the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 1930–1941.
- Hawkins, B.T., and Davis, T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 57, 173–185.
- Hegy, Z., and Homolya, L. (2016). Functional Cooperativity between ABCG4 and ABCG1 Isoforms. *PLoS One* 11, e0156516.
- Herrup, K. (2015). The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat. Neurosci.* 18, 794–799.
- Heverin, M., Maioli, S., Pham, T., Mateos, L., Camporesi, E., Ali, Z., Winblad, B., Cedazo-Minguez, A., and Björkhem, I. (2015). 27-hydroxycholesterol mediates negative effects of dietary cholesterol on cognition in mice. *Behav. Brain Res.* 278, 356–359.
- Higgins, C.F., and Linton, K.J. (2004). The ATP switch model for ABC transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 918–926.
- Horse, A.J., Cox, M.H., Sarwat, S., and Kerr, I.D. (2016). The multidrug transporter ABCG2: still more questions than answers. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 824–830.
- Huang, Q., Zhao, M., and Zhao, K. (2014). Alteration of vascular permeability in burn injury. *MedicalExpress* 1, 62–76.
- Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702–705.
- Ile, K.E., Davis, W., Boyd, J.T., Soulika, A.M., and Tew, K.D. (2004). Identification of a novel first exon of the human ABCA2 transporter gene encoding a unique N-terminus. *Biochim. Biophys. Acta* 1678, 22–32.
- (Inserm), I. national de la santé et de la recherche médicale (2007). *Maladie d'Alzheimer : Enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux. Synthèse et recommandations.* (Les éditions Inserm).
- Iqbal, K., Liu, F., Gong, C.-X., Alonso, A.D.C., and Grundke-Iqbal, I. (2009). Mechanisms of tau-induced neurodegeneration. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 118, 53–69.
- Irvine, K., Laws, K.R., Gale, T.M., and Kondel, T.K. (2012). Greater cognitive deterioration in women than men with Alzheimer's disease: a meta analysis. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.* 34, 989–998.

Ito, S., Ohtsuki, S., and Terasaki, T. (2006). Functional characterization of the brain-to-blood efflux clearance of human amyloid-beta peptide (1-40) across the rat blood-brain barrier. *Neurosci. Res.* *56*, 246–252.

Ito, S., Ueno, T., Ohtsuki, S., and Terasaki, T. (2010). Lack of brain-to-blood efflux transport activity of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) for amyloid-beta peptide(1-40) in mouse: involvement of an LRP-1-independent pathway. *J. Neurochem.* *113*, 1356–1363.

Jaeger, L.B., Dohgu, S., Sultana, R., Lynch, J.L., Owen, J.B., Erickson, M.A., Shah, G.N., Price, T.O., Fleegal-Demotta, M.A., Butterfield, D.A., et al. (2009). Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. *Brain. Behav. Immun.* *23*, 507–517.

Jakob-Roetne, R., and Jacobsen, H. (2009). Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* *48*, 3030–3059.

Jani, M., Ambrus, C., Magnan, R., Jakab, K.T., Beéry, E., Zolnerciks, J.K., and Krajcsi, P. (2014). Structure and function of BCRP, a broad specificity transporter of xenobiotics and endobiotics. *Arch. Toxicol.* *88*, 1205–1248.

Jeynes, B., and Provias, J. (2008). Evidence for altered LRP/RAGE expression in Alzheimer lesion pathogenesis. *Curr. Alzheimer Res.* *5*, 432–437.

Jia, W., Martin, T.A., Zhang, G., and Jiang, W.G. (2013). Junctional adhesion molecules in cerebral endothelial tight junction and brain metastasis. *Anticancer Res.* *33*, 2353–2359.

Johansson, P., Almqvist, E.G., Johansson, J.-O., Mattsson, N., Hansson, O., Wallin, A., Blennow, K., Zetterberg, H., and Svensson, J. (2013). Reduced cerebrospinal fluid level of thyroxine in patients with Alzheimer's disease. *Psychoneuroendocrinology* *38*, 1058–1066.

de Jong, F.J., Masaki, K., Chen, H., Remaley, A.T., Breteler, M.M.B., Petrovitch, H., White, L.R., and Launer, L.J. (2009). Thyroid function, the risk of dementia and neuropathologic changes: the Honolulu-Asia aging study. *Neurobiol. Aging* *30*, 600–606.

Jonker, J.W., Merino, G., Musters, S., van Herwaarden, A.E., Bolscher, E., Wagenaar, E., Mesman, E., Dale, T.C., and Schinkel, A.H. (2005). The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat. Med.* *11*, 127–129.

Joshi, A.A., Vaidya, S.S., St-Pierre, M.V., Mikheev, A.M., Desino, K.E., Nyandege, A.N., Audus, K.L., Unadkat, J.D., and Gerck, P.M. (2016). Placental ABC Transporters: Biological Impact and Pharmaceutical Significance. *Pharm. Res.*

Juliano, R.L., and Ling, V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* *455*, 152–162.

Juvale, K., Gallus, J., and Wiese, M. (2013a). Investigation of quinazolines as inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Bioorg. Med. Chem.* *21*, 7858–7873.

Juvale, K., Stefan, K., and Wiese, M. (2013b). Synthesis and biological evaluation of flavones and benzoflavones as inhibitors of BCRP/ABCG2. *Eur. J. Med. Chem.* *67*, 115–126.

Kalliokoski, A., and Niemi, M. (2009). Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br. J. Pharmacol.* *158*, 693–705.

Kalmijn, S., Mehta, K.M., Pols, H.A., Hofman, A., Drexhage, H.A., and Breteler, M.M. (2000). Subclinical hyperthyroidism and the risk of dementia. The Rotterdam study. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* *53*, 733–737.

Kaminski, W.E., Piehler, A., Püllmann, K., Porsch-Ozcürümez, M., Duong, C., Bared, G.M., Büchler, C., and Schmitz, G. (2001). Complete coding sequence, promoter region, and genomic structure of the human ABCA2 gene and evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *281*, 249–258.

Kaminski, W.E., Piehler, A., and Wenzel, J.J. (2006). ABC A-subfamily transporters: structure, function and disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1762*, 510–524.

Kanekiyo, T., and Bu, G. (2014). The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 and amyloid- $\beta$  clearance in Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci.* *6*, 93.

Kania, K.D., Wijesuriya, H.C., Hladky, S.B., and Barrand, M.A. (2011). Beta amyloid effects on expression of multidrug efflux transporters in brain endothelial cells. *Brain Res.* *1418*, 1–11.

Kannan, P., Schain, M., Kretschmar, W.W., Weidner, L., Mitsios, N., Gulyás, B., Blom, H., Gottesman, M.M., Innis, R.B., Hall, M.D., et al. (2016). An automated method measures variability in P-glycoprotein and ABCG2 densities across brain regions and brain matter. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.*

Karasinska, J.M., Rinninger, F., Lütjohann, D., Ruddle, P., Franciosi, S., Kruit, J.K., Singaraja, R.R., Hirsch-Reinshagen, V., Fan, J., Brunham, L.R., et al. (2009). Specific loss of brain ABCA1 increases brain cholesterol uptake and influences neuronal structure and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 3579–3589.

Kathawala, R.J., Gupta, P., Ashby, C.R., and Chen, Z.-S. (2015). The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: a review of the past decade. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* *18*, 1–17.

Keaney, J., and Campbell, M. (2015). The dynamic blood-brain barrier. *FEBS J.* *282*, 4067–4079.

Kennedy, M.A., Venkateswaran, A., Tarr, P.T., Xenarios, I., Kudoh, J., Shimizu, N., and Edwards, P.A. (2001). Characterization of the human ABCG1 gene: liver X receptor activates an internal promoter that produces a novel transcript encoding an alternative form of the protein. *J. Biol. Chem.* *276*, 39438–39447.

Kennedy, M.A., Barrera, G.C., Nakamura, K., Baldán, A., Tarr, P., Fishbein, M.C., Frank, J., Francone, O.L., and Edwards, P.A. (2005). ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* *1*, 121–131.

Kerr, I.D., Haider, A.J., and Gelissen, I.C. (2011). The ABCG family of membrane-associated transporters: you don't have to be big to be mighty. *Br. J. Pharmacol.* *164*, 1767–1779.

Kim, W.S., Guillemin, G.J., Glaros, E.N., Lim, C.K., and Garner, B. (2006). Quantitation of ATP-binding cassette subfamily-A transporter gene expression in primary human brain cells. *Neuroreport* *17*, 891–896.

Kim, W.S., Weickert, C.S., and Garner, B. (2008). Role of ATP-binding cassette transporters in brain lipid transport and neurological disease. *J. Neurochem.* *104*, 1145–1166.

- Kim, W.S., Bhatia, S., Elliott, D.A., Agholme, L., Kågedal, K., McCann, H., Halliday, G.M., Barnham, K.J., and Garner, B. (2010a). Increased ATP-binding cassette transporter A1 expression in Alzheimer's disease hippocampal neurons. *J. Alzheimers Dis. JAD* 21, 193–205.
- Kim, W.S., Bhatia, S., Elliott, D.A., Agholme, L., Kågedal, K., McCann, H., Halliday, G.M., Barnham, K.J., and Garner, B. (2010b). Increased ATP-binding cassette transporter A1 expression in Alzheimer's disease hippocampal neurons. *J. Alzheimers Dis. JAD* 21, 193–205.
- Klucken, J., Büchler, C., Orsó, E., Kaminski, W.E., Porsch-Ozcürümez, M., Liebisch, G., Kapinsky, M., Diederich, W., Drobnik, W., Dean, M., et al. (2000). ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 817–822.
- Kodaira, H., Kusuhara, H., Ushiki, J., Fuse, E., and Sugiyama, Y. (2010). Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/Abcb1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 333, 788–796.
- Koldamova, R., Fitz, N.F., and Lefterov, I. (2010). The role of ATP-binding cassette transporter A1 in Alzheimer's disease and neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1801, 824–830.
- Koldamova, R., Fitz, N.F., and Lefterov, I. (2014). ATP-binding cassette transporter A1: from metabolism to neurodegeneration. *Neurobiol. Dis.* 72 Pt A, 13–21.
- Kooij, G., van Horssen, J., Bandaru, V.V.R., Haughey, N.J., and de Vries, H.E. (2012). The Role of ATP-Binding Cassette Transporters in Neuro-Inflammation: Relevance for Bioactive Lipids. *Front. Pharmacol.* 3, 74.
- Koshiba, S., An, R., Saito, H., Wakabayashi, K., Tamura, A., and Ishikawa, T. (2008). Human ABC transporters ABCG2 (BCRP) and ABCG4. *Xenobiotica Fate Foreign Compd. Biol. Syst.* 38, 863–888.
- Krishnamurthy, P., Xie, T., and Schuetz, J.D. (2007). The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol. Ther.* 114, 345–358.
- Krohn, M., Lange, C., Hofrichter, J., Scheffler, K., Stenzel, J., Steffen, J., Schumacher, T., Brüning, T., Plath, A.-S., Alfen, F., et al. (2011). Cerebral amyloid- $\beta$  proteostasis is regulated by the membrane transport protein ABCC1 in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 3924–3931.
- Krohn, M., Bracke, A., Avchalumov, Y., Schumacher, T., Hofrichter, J., Paarmann, K., Fröhlich, C., Lange, C., Brüning, T., von Bohlen Und Halbach, O., et al. (2015). Accumulation of murine amyloid- $\beta$  mimics early Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* 138, 2370–2382.
- Kuhla, A., Ludwig, S.C., Kuhla, B., Münch, G., and Vollmar, B. (2015). Advanced glycation end products are mitogenic signals and trigger cell cycle reentry of neurons in Alzheimer's disease brain. *Neurobiol. Aging* 36, 753–761.
- Kühnle, M., Egger, M., Müller, C., Mahringer, A., Bernhardt, G., Fricker, G., König, B., and Buschauer, A. (2009). Potent and selective inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) derived from the p-glycoprotein (ABCB1) modulator tariquidar. *J. Med. Chem.* 52, 1190–1197.
- Kullak-Ublick, G.A., Hagenbuch, B., Stieger, B., Schteingart, C.D., Hofmann, A.F., Wolkoff, A.W., and Meier, P.J. (1995). Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology* 109, 1274–1282.

- Kumar, A., Singh, A., and Ekavali, null (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol. Rep. PR* 67, 195–203.
- Kumasaka, T., Aritake, K., Ago, H., Irikura, D., Tsurumura, T., Yamamoto, M., Miyano, M., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2009). Structural basis of the catalytic mechanism operating in open-closed conformers of lipocalin type prostaglandin D synthase. *J. Biol. Chem.* 284, 22344–22352.
- Kuruva, C.S., and Reddy, P.H. (2016). Amyloid beta modulators and neuroprotection in Alzheimer's disease: a critical appraisal. *Drug Discov. Today*.
- Kusuhara, H., and Sugiyama, Y. (2007). ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 453, 735–744.
- Laing, N.M., Belinsky, M.G., Kruh, G.D., Bell, D.W., Boyd, J.T., Barone, L., Testa, J.R., and Tew, K.D. (1998). Amplification of the ATP-binding cassette 2 transporter gene is functionally linked with enhanced efflux of estramustine in ovarian carcinoma cells. *Cancer Res.* 58, 1332–1337.
- Lam, F.C., Liu, R., Lu, P., Shapiro, A.B., Renoir, J.M., Sharom, F.J., and Reiner, P.B. (2001). beta-Amyloid efflux mediated by p-glycoprotein. *J. Neurochem.* 76, 1121–1128.
- Langmann, T., Klucken, J., Reil, M., Liebisch, G., Luciani, M.F., Chimini, G., Kaminski, W.E., and Schmitz, G. (1999). Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 29–33.
- Lee, W., Glaeser, H., Smith, L.H., Roberts, R.L., Moeckel, G.W., Gervasini, G., Leake, B.F., and Kim, R.B. (2005). Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J. Biol. Chem.* 280, 9610–9617.
- Leissring, M.A., Farris, W., Chang, A.Y., Walsh, D.M., Wu, X., Sun, X., Frosch, M.P., and Selkoe, D.J. (2003). Enhanced proteolysis of beta-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death. *Neuron* 40, 1087–1093.
- Lemieux, S.K., Smith-Bell, C.A., Wells, J.R., Ezerioha, N.M., Carpenter, J.S., Sparks, D.L., and Schreurs, B.G. (2010). Neurovascular changes measured by time-of-flight MR angiography in cholesterol-fed rabbits with cortical amyloid beta-peptide accumulation. *J. Magn. Reson. Imaging JMRI* 32, 306–314.
- Leuthold, S., Hagenbuch, B., Mohebbi, N., Wagner, C.A., Meier, P.J., and Stieger, B. (2009). Mechanisms of pH-gradient driven transport mediated by organic anion polypeptide transporters. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 296, C570-582.
- Li, A.C., Binder, C.J., Gutierrez, A., Brown, K.K., Plotkin, C.R., Pattison, J.W., Valledor, A.F., Davis, R.A., Willson, T.M., Witztum, J.L., et al. (2004). Differential inhibition of macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J. Clin. Invest.* 114, 1564–1576.
- Li, K., Dai, D., Zhao, B., Yao, L., Yao, S., Wang, B., and Yang, Z. (2010). Association between the RAGE G82S polymorphism and Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Vienna Austria 1996* 117, 97–104.
- Li, L., Meier, P.J., and Ballatori, N. (2000). Oatp2 mediates bidirectional organic solute transport: a role for intracellular glutathione. *Mol. Pharmacol.* 58, 335–340.

- Li, W., Zhang, H., Assaraf, Y.G., Zhao, K., Xu, X., Xie, J., Yang, D.-H., and Chen, Z.-S. (2016). Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother.* 27, 14–29.
- Lin, L., Yee, S.W., Kim, R.B., and Giacomini, K.M. (2015). SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 543–560.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 46, 3–26.
- Liu, Y., Nusrat, A., Schnell, F.J., Reaves, T.A., Walsh, S., Pochet, M., and Parkos, C.A. (2000). Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J. Cell Sci.* 113 ( Pt 13), 2363–2374.
- Lo, E.H., and Rosenberg, G.A. (2009). The neurovascular unit in health and disease: introduction. *Stroke J. Cereb. Circ.* 40, S2-3.
- Locher, K.P. (2016). Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 487–493.
- Long, J., Basu Roy, R., Zhang, Y.J., Antrobus, R., Du, Y., Smith, D.L., Weekes, M.P., and Javid, B. (2016). Plasma Membrane Profiling Reveals Upregulation of ABCA1 by Infected Macrophages Leading to Restriction of Mycobacterial Growth. *Front. Microbiol.* 7, 1086.
- Lorkowski, S., Kratz, M., Wenner, C., Schmidt, R., Weitkamp, B., Fobker, M., Reinhardt, J., Rauterberg, J., Galinski, E.A., and Cullen, P. (2001). Expression of the ATP-binding cassette transporter gene ABCG1 (ABC8) in Tangier disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 821–830.
- Löscher, W., and Potschka, H. (2005). Blood-brain barrier active efflux transporters: ATP-binding cassette gene family. *NeuroRx J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2, 86–98.
- Luciani, M.F., and Chimini, G. (1996). The ATP binding cassette transporter ABC1, is required for the engulfment of corpses generated by apoptotic cell death. *EMBO J.* 15, 226–235.
- Luciani, M.F., Denizot, F., Savary, S., Mattei, M.G., and Chimini, G. (1994). Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. *Genomics* 21, 150–159.
- Luissint, A.-C., Artus, C., Glacial, F., Ganeshamoorthy, K., and Couraud, P.-O. (2012). Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS* 9, 23.
- Luthi, A.J., Lyssenko, N.N., Quach, D., McMahon, K.M., Millar, J.S., Vickers, K.C., Rader, D.J., Phillips, M.C., Mirkin, C.A., and Thaxton, C.S. (2015). Robust passive and active efflux of cellular cholesterol to a designer functional mimic of high density lipoprotein. *J. Lipid Res.* 56, 972–985.
- Macé, S., Cousin, E., Ricard, S., Génin, E., Spanakis, E., Lafargue-Soubigou, C., Génin, B., Fournel, R., Roche, S., Haussy, G., et al. (2005). ABCA2 is a strong genetic risk factor for early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* 18, 119–125.
- Mack, J.T., Townsend, D.M., Beljanski, V., and Tew, K.D. (2007a). The ABCA2 transporter: intracellular roles in trafficking and metabolism of LDL-derived cholesterol and sterol-related compounds. *Curr. Drug Metab.* 8, 47–57.

- Mack, J.T., Beljanski, V., Soulika, A.M., Townsend, D.M., Brown, C.B., Davis, W., and Tew, K.D. (2007b). "Skittish" Abca2 knockout mice display tremor, hyperactivity, and abnormal myelin ultrastructure in the central nervous system. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 44–53.
- Mack, J.T., Brown, C.B., and Tew, K.D. (2008). ABCA2 as a therapeutic target in cancer and nervous system disorders. *Expert Opin. Ther. Targets* *12*, 491–504.
- Mackic, J.B., Stins, M., McComb, J.G., Calero, M., Ghiso, J., Kim, K.S., Yan, S.D., Stern, D., Schmidt, A.M., Frangione, B., et al. (1998). Human blood-brain barrier receptors for Alzheimer's amyloid-beta 1-40. Asymmetrical binding, endocytosis, and transcytosis at the apical side of brain microvascular endothelial cell monolayer. *J. Clin. Invest.* *102*, 734–743.
- Mahringer, A., and Fricker, G. (2016). ABC transporters at the blood-brain barrier. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* *12*, 499–508.
- Maliepaard, M., Scheffer, G.L., Faneyte, I.F., van Gastelen, M.A., Pijnenborg, A.C., Schinkel, A.H., van De Vijver, M.J., Scheper, R.J., and Schellens, J.H. (2001). Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res.* *61*, 3458–3464.
- Mao, Q., and Unadkat, J.D. (2015). Role of the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in drug transport--an update. *AAPS J.* *17*, 65–82.
- Martín, M.G., Pfrieger, F., and Dotti, C.G. (2014). Cholesterol in brain disease: sometimes determinant and frequently implicated. *EMBO Rep.* *15*, 1036–1052.
- Martín-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., et al. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* *142*, 117–127.
- Marwarha, G., and Ghribi, O. (2015). Does the oxysterol 27-hydroxycholesterol underlie Alzheimer's disease-Parkinson's disease overlap? *Exp. Gerontol.* *68*, 13–18.
- Mathiisen, T.M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., and Ottersen, O.P. (2010). The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* *58*, 1094–1103.
- Matsuo, M. (2010). ATP-binding cassette proteins involved in glucose and lipid homeostasis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* *74*, 899–907.
- Mawuenyega, K.G., Sigurdson, W., Ovod, V., Munsell, L., Kasten, T., Morris, J.C., Yarasheski, K.E., and Bateman, R.J. (2010). Decreased clearance of CNS beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Science* *330*, 1774.
- Mehta, D.C., Short, J.L., and Nicolazzo, J.A. (2013). Altered brain uptake of therapeutics in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Pharm. Res.* *30*, 2868–2879.
- Melaine, N., Liénard, M.-O., Dorval, I., Le Goascogne, C., Lejeune, H., and Jégou, B. (2002). Multidrug resistance genes and p-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, Guinea pig, and human. *Biol. Reprod.* *67*, 1699–1707.

- Meraz-Ríos, M.A., Lira-De León, K.I., Campos-Peña, V., De Anda-Hernández, M.A., and Mena-López, R. (2010). Tau oligomers and aggregation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *112*, 1353–1367.
- Michaki, V., Guix, F.X., Vennekens, K. 'l, Munck, S., Dingwall, C., Davis, J.B., Townsend, D.M., Tew, K.D., Feiguin, F., De Strooper, B., et al. (2012). Down-regulation of the ATP-binding cassette transporter 2 (Abca2) reduces amyloid- $\beta$  production by altering Nicastrin maturation and intracellular localization. *J. Biol. Chem.* *287*, 1100–1111.
- Mikitsh, J.L., and Chacko, A.-M. (2014). Pathways for small molecule delivery to the central nervous system across the blood-brain barrier. *Perspect. Med. Chem.* *6*, 11–24.
- Miller, D.S. (2015). Regulation of ABC transporters blood-brain barrier: the good, the bad, and the ugly. *Adv. Cancer Res.* *125*, 43–70.
- Miller, B.C., Eckman, E.A., Sambamurti, K., Dobbs, N., Chow, K.M., Eckman, C.B., Hersh, L.B., and Thiele, D.L. (2003). Amyloid-beta peptide levels in brain are inversely correlated with insulin activity levels in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 6221–6226.
- Miners, J.S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L.E., Kehoe, P.G., and Love, S. (2008). Abeta-degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *18*, 240–252.
- Mizuno, T., Nakata, M., Naiki, H., Michikawa, M., Wang, R., Haass, C., and Yanagisawa, K. (1999). Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid beta-protein in cell culture. *J. Biol. Chem.* *274*, 15110–15114.
- Morelli, L., Llovera, R.E., Mathov, I., Lue, L.-F., Frangione, B., Ghiso, J., and Castaño, E.M. (2004). Insulin-degrading enzyme in brain microvessels: proteolysis of amyloid {beta} vasculotropic variants and reduced activity in cerebral amyloid angiopathy. *J. Biol. Chem.* *279*, 56004–56013.
- Morris, A.W.J., Carare, R.O., Schreiber, S., and Hawkes, C.A. (2014). The Cerebrovascular Basement Membrane: Role in the Clearance of  $\beta$ -amyloid and Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front. Aging Neurosci.* *6*, 251.
- Murphy, A.J., Bijl, N., Yvan-Charvet, L., Welch, C.B., Bhagwat, N., Rehemian, A., Wang, Y., Shaw, J.A., Levine, R.L., Ni, H., et al. (2013). Cholesterol efflux in megakaryocyte progenitors suppresses platelet production and thrombocytosis. *Nat. Med.* *19*, 586–594.
- Nagao, K., Tomioka, M., and Ueda, K. (2011). Function and regulation of ABCA1--membrane meso-domain organization and reorganization. *FEBS J.* *278*, 3190–3203.
- Nagao, K., Maeda, M., Mañucat, N.B., and Ueda, K. (2013). Cyclosporine A and PSC833 inhibit ABCA1 function via direct binding. *Biochim. Biophys. Acta* *1831*, 398–406.
- Narita, M., Holtzman, D.M., Schwartz, A.L., and Bu, G. (1997). Alpha2-macroglobulin complexes with and mediates the endocytosis of beta-amyloid peptide via cell surface low-density lipoprotein receptor-related protein. *J. Neurochem.* *69*, 1904–1911.
- Nazer, B., Hong, S., and Selkoe, D.J. (2008). LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid-beta peptide in a blood-brain barrier in vitro model. *Neurobiol. Dis.* *30*, 94–102.



- Neeper, M., Schmidt, A.M., Brett, J., Yan, S.D., Wang, F., Pan, Y.C., Elliston, K., Stern, D., and Shaw, A. (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* *267*, 14998–15004.
- Neufeld, E.B., Remaley, A.T., Demosky, S.J., Stonik, J.A., Cooney, A.M., Comly, M., Dwyer, N.K., Zhang, M., Blanchette-Mackie, J., Santamarina-Fojo, S., et al. (2001). Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J. Biol. Chem.* *276*, 27584–27590.
- Ni, Z., Bikadi, Z., Rosenberg, M.F., and Mao, Q. (2010). Structure and function of the human breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Curr. Drug Metab.* *11*, 603–617.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., and Tsukita, S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* *161*, 653–660.
- Noé, B., Hagenbuch, B., Stieger, B., and Meier, P.J. (1997). Isolation of a multispecific organic anion and cardiac glycoside transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 10346–10350.
- O’Brien, R.J., and Wong, P.C. (2011). Amyloid precursor protein processing and Alzheimer’s disease. *Annu. Rev. Neurosci.* *34*, 185–204.
- Ohtsuki, S., Watanabe, Y., Hori, S., Suzuki, H., Bhongsatiern, J., Fujiyoshi, M., Kamoi, M., Kamiya, N., Takanaga, H., and Terasaki, T. (2004). mRNA expression of the ATP-binding cassette transporter subfamily A (ABCA) in rat and human brain capillary endothelial cells. *Biol. Pharm. Bull.* *27*, 1437–1440.
- Ohtsuki, S., Ikeda, C., Uchida, Y., Sakamoto, Y., Miller, F., Glacial, F., Declèves, X., Scherrmann, J.-M., Couraud, P.-O., Kubo, Y., et al. (2013). 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.* *10*, 289–296.
- Oldendorf, W.H., Cornford, M.E., and Brown, W.J. (1977). The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. *Ann. Neurol.* *1*, 409–417.
- Oldfield, S., Lowry, C., Ruddick, J., and Lightman, S. (2002). ABCG4: a novel human white family ABC-transporter expressed in the brain and eye. *Biochim. Biophys. Acta* *1591*, 175–179.
- de Oliveira, J., Hort, M.A., Moreira, E.L.G., Glaser, V., Ribeiro-do-Valle, R.M., Prediger, R.D., Farina, M., Latini, A., and de Bem, A.F. (2011). Positive correlation between elevated plasma cholesterol levels and cognitive impairments in LDL receptor knockout mice: relevance of cortico-cerebral mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *Neuroscience* *197*, 99–106.
- Oram, J.F., and Heinecke, J.W. (2005). ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol. Rev.* *85*, 1343–1372.
- Oram, J.F., and Vaughan, A.M. (2000). ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.* *11*, 253–260.
- Orsó, E., Broccardo, C., Kaminski, W.E., Böttcher, A., Liebisch, G., Drobniak, W., Götz, A., Chambenoit, O., Diederich, W., Langmann, T., et al. (2000). Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice. *Nat. Genet.* *24*, 192–196.

- Ose, A., Kusuhara, H., Endo, C., Tohyama, K., Miyajima, M., Kitamura, S., and Sugiyama, Y. (2010). Functional characterization of mouse organic anion transporting peptide 1a4 in the uptake and efflux of drugs across the blood-brain barrier. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *38*, 168–176.
- Out, R., Hoekstra, M., Meurs, I., de Vos, P., Kuiper, J., Van Eck, M., and Van Berkel, T.J.C. (2007). Total body ABCG1 expression protects against early atherosclerotic lesion development in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *27*, 594–599.
- Ozvegy-Laczka, C., Hegedus, T., Várady, G., Ujhelly, O., Schuetz, J.D., Váradi, A., Kéri, G., Orfi, L., Német, K., and Sarkadi, B. (2004). High-affinity interaction of tyrosine kinase inhibitors with the ABCG2 multidrug transporter. *Mol. Pharmacol.* *65*, 1485–1495.
- Pahnke, J., Langer, O., and Krohn, M. (2014). Alzheimer's and ABC transporters--new opportunities for diagnostics and treatment. *Neurobiol. Dis.* *72 Pt A*, 54–60.
- Panza, F., Solfrizzi, V., Seripa, D., Imbimbo, B.P., Lozupone, M., Santamato, A., Tortelli, R., Galizia, I., Prete, C., Daniele, A., et al. (2016). Tau-based therapeutics for Alzheimer's disease: active and passive immunotherapy. *Immunotherapy* *8*, 1119–1134.
- Panzenboeck, U., Balazs, Z., Sovic, A., Hrzenjak, A., Levak-Frank, S., Wintersperger, A., Malle, E., and Sattler, W. (2002). ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 42781–42789.
- Pennock, G.D., Dalton, W.S., Roeske, W.R., Appleton, C.P., Mosley, K., Plezia, P., Miller, T.P., and Salmon, S.E. (1991). Systemic toxic effects associated with high-dose verapamil infusion and chemotherapy administration. *J. Natl. Cancer Inst.* *83*, 105–110.
- Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., and Attwell, D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* *443*, 700–704.
- Perrone, L., and Grant, W.B. (2015). Observational and ecological studies of dietary advanced glycation end products in national diets and Alzheimer's disease incidence and prevalence. *J. Alzheimers Dis. JAD* *45*, 965–979.
- Persidsky, Y., Ramirez, S.H., Haorah, J., and Kanmogne, G.D. (2006). Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* *1*, 223–236.
- Pfeifer, N.D., Hardwick, R.N., and Brouwer, K.L.R. (2014). Role of hepatic efflux transporters in regulating systemic and hepatocyte exposure to xenobiotics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *54*, 509–535.
- Picone, P., Nuzzo, D., Caruana, L., Scafidi, V., and Di Carlo, M. (2014). Mitochondrial dysfunction: different routes to Alzheimer's disease therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2014*, 780179.
- Piehler, A.P., Ozcürümez, M., and Kaminski, W.E. (2012). A-Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration. *Front. Psychiatry* *3*, 17.
- Pines, A. (2016). Alzheimer's disease, menopause and the impact of the estrogenic environment. *Climacteric J. Int. Menopause Soc.* *19*, 430–432.

- Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S.L., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G., and Blasig, I.E. (2008). Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *22*, 146–158.
- Plummer, S., Van den Heuvel, C., Thornton, E., Corrigan, F., and Cappai, R. (2016). The Neuroprotective Properties of the Amyloid Precursor Protein Following Traumatic Brain Injury. *Aging Dis.* *7*, 163–179.
- Poirier, J. (2003). Apolipoprotein E and cholesterol metabolism in the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* *9*, 94–101.
- Polli, J.W., Olson, K.L., Chism, J.P., John-Williams, L.S., Yeager, R.L., Woodard, S.M., Otto, V., Castellino, S., and Demby, V.E. (2009). An unexpected synergist role of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein on the central nervous system penetration of the tyrosine kinase inhibitor lapatinib (N-{3-chloro-4-[(3-fluorobenzyl)oxy]phenyl}-6-[5-{{[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl}-2-furyl]-4-quinazolinamine; GW572016). *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *37*, 439–442.
- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., and Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Dev. Camb. Engl.* *131*, 1619–1628.
- Potter, R., Patterson, B.W., Elbert, D.L., Ovod, V., Kasten, T., Sigurdson, W., Mawuenyega, K., Blazey, T., Goate, A., Chott, R., et al. (2013). Increased in Vivo Amyloid- $\beta$ 42 Production, Exchange, and Loss in Presenilin Mutation Carriers. *Sci. Transl. Med.* *5*, 189ra77-189ra77.
- Prasanthi, J.R., Huls, A., Thomasson, S., Thompson, A., Schommer, E., and Ghribi, O. (2009). Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27-hydroxycholesterol on beta-amyloid precursor protein levels and processing in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol. Neurodegener.* *4*, 1.
- Prasanthi, J.R.P., Larson, T., Schommer, J., and Ghribi, O. (2011). Silencing GADD153/CHOP gene expression protects against Alzheimer's disease-like pathology induced by 27-hydroxycholesterol in rabbit hippocampus. *PloS One* *6*, e26420.
- Provias, J., and Jeynes, B. (2014). The role of the blood-brain barrier in the pathogenesis of senile plaques in Alzheimer's disease. *Int. J. Alzheimers Dis.* *2014*, 191863.
- Qiu, Z., Strickland, D.K., Hyman, B.T., and Rebeck, G.W. (1999). Alpha2-macroglobulin enhances the clearance of endogenous soluble beta-amyloid peptide via low-density lipoprotein receptor-related protein in cortical neurons. *J. Neurochem.* *73*, 1393–1398.
- Qosa, H., Miller, D.S., Pasinelli, P., and Trotti, D. (2015). Regulation of ABC efflux transporters at blood-brain barrier in health and neurological disorders. *Brain Res.* *1628*, 298–316.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* *362*, 329–344.
- Rabindran, S.K., Ross, D.D., Doyle, L.A., Yang, W., and Greenberger, L.M. (2000). Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* *60*, 47–50.
- Rahgozar, S., Moafi, A., Abedi, M., Entezar-E-Ghaem, M., Moshtaghian, J., Ghaedi, K., Esmaeili, A., and Montazeri, F. (2014). mRNA expression profile of multidrug-resistant genes in acute lymphoblastic leukemia of children, a prognostic value for ABCA3 and ABCA2. *Cancer Biol. Ther.* *15*, 35–41.

- Ramanathan, A., Nelson, A.R., Sagare, A.P., and Zlokovic, B.V. (2015). Impaired vascular-mediated clearance of brain amyloid beta in Alzheimer's disease: the role, regulation and restoration of LRP1. *Front. Aging Neurosci.* 7, 136.
- Ramirez-Bermudez, J. (2012). Alzheimer's disease: critical notes on the history of a medical concept. *Arch. Med. Res.* 43, 595–599.
- Redzic, Z. (2011). Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS* 8, 3.
- Reese, T.S., and Karnovsky, M.J. (1967). Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34, 207–217.
- Reitz, C., Brayne, C., and Mayeux, R. (2011). Epidemiology of Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 7, 137–152.
- Remaley, A.T., Rust, S., Rosier, M., Knapper, C., Naudin, L., Broccardo, C., Peterson, K.M., Koch, C., Arnould, I., Prades, C., et al. (1999). Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 12685–12690.
- Repa, J.J., Turley, S.D., Lobaccaro, J.A., Medina, J., Li, L., Lustig, K., Shan, B., Heyman, R.A., Dietschy, J.M., and Mangelsdorf, D.J. (2000). Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 289, 1524–1529.
- Riordan, J.R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J., and Ling, V. (1985). Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature* 316, 817–819.
- Robey, R.W., To, K.K.K., Polgar, O., Dohse, M., Fetsch, P., Dean, M., and Bates, S.E. (2009). ABCG2: a perspective. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 61, 3–13.
- Rodrigues, S.F., and Granger, D.N. (2015). Blood cells and endothelial barrier function. *Tissue Barriers* 3, e978720.
- Ronaldson, P.T., Finch, J.D., Demarco, K.M., Quigley, C.E., and Davis, T.P. (2011). Inflammatory pain signals an increase in functional expression of organic anion transporting polypeptide 1a4 at the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336, 827–839.
- Roth, M., Obaidat, A., and Hagenbuch, B. (2012). OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br. J. Pharmacol.* 165, 1260–1287.
- Rubin, L.L., and Staddon, J.M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 11–28.
- Runz, H., Rietdorf, J., Tomic, I., de Bernard, M., Beyreuther, K., Pepperkok, R., and Hartmann, T. (2002). Inhibition of intracellular cholesterol transport alters presenilin localization and amyloid precursor protein processing in neuronal cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 1679–1689.
- Sagare, A., Deane, R., Bell, R.D., Johnson, B., Hamm, K., Pendu, R., Marky, A., Lenting, P.J., Wu, Z., Zarcone, T., et al. (2007). Clearance of amyloid-beta by circulating lipoprotein receptors. *Nat. Med.* 13, 1029–1031.

- Sagare, A.P., Bell, R.D., and Zlokovic, B.V. (2013). Neurovascular defects and faulty amyloid- $\beta$  vascular clearance in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD 33 Suppl 1*, S87-100.
- Saint-Pol, J., Vandenhaute, E., Boucau, M.-C., Candela, P., Dehouck, L., Cecchelli, R., Dehouck, M.-P., Fenart, L., and Gosselet, F. (2012). Brain pericytes ABCA1 expression mediates cholesterol efflux but not cellular amyloid- $\beta$  peptide accumulation. *J. Alzheimers Dis. JAD 30*, 489–503.
- Saito, T., Yamada, K., Wang, Y., Tanaka, Y., Ohtomo, K., Ishikawa, K., and Inagaki, N. (2007). Expression of ABCA2 protein in both non-myelin-forming and myelin-forming Schwann cells in the rodent peripheral nerve. *Neurosci. Lett. 414*, 35–40.
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., and Tsukita, S. (2000). Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell 11*, 4131–4142.
- Sakai, H., Tanaka, Y., Tanaka, M., Ban, N., Yamada, K., Matsumura, Y., Watanabe, D., Sasaki, M., Kita, T., and Inagaki, N. (2007). ABCA2 deficiency results in abnormal sphingolipid metabolism in mouse brain. *J. Biol. Chem. 282*, 19692–19699.
- Sala Frigerio, C., and De Strooper, B. (2016). Alzheimer's Disease Mechanisms and Emerging Roads to Novel Therapeutics. *Annu. Rev. Neurosci. 39*, 57–79.
- Salahuddin, P., Rabbani, G., and Khan, R.H. (2014). The role of advanced glycation end products in various types of neurodegenerative disease: a therapeutic approach. *Cell. Mol. Biol. Lett. 19*, 407–437.
- Sano, O., Tsujita, M., Shimizu, Y., Kato, R., Kobayashi, A., Kioka, N., Remaley, A.T., Michikawa, M., Ueda, K., and Matsuo, M. (2016). ABCG1 and ABCG4 Suppress  $\gamma$ -Secretase Activity and Amyloid  $\beta$  Production. *PLoS One 11*, e0155400.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spires, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., et al. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science 309*, 476–481.
- Sá-Pereira, I., Brites, D., and Brito, M.A. (2012). Neurovascular unit: a focus on pericytes. *Mol. Neurobiol. 45*, 327–347.
- Savelieff, M.G., Lee, S., Liu, Y., and Lim, M.H. (2013). Untangling amyloid- $\beta$ , tau, and metals in Alzheimer's disease. *ACS Chem. Biol. 8*, 856–865.
- Savettieri, G., Di Liegro, I., Catania, C., Licata, L., Pitarresi, G.L., D'Agostino, S., Schiera, G., De Caro, V., Giandalia, G., Giannola, L.I., et al. (2000). Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *Neuroreport 11*, 1081–1084.
- Schinkel, A.H., and Jonker, J.W. (2003). Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev. 55*, 3–29.
- Schinkel, A.H., Smit, J.J., van Tellingen, O., Beijnen, J.H., Wagenaar, E., van Deemter, L., Mol, C.A., van der Valk, M.A., Robanus-Maandag, E.C., and te Riele, H.P. (1994). Disruption of the mouse *mdr1a* P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. *Cell 77*, 491–502.

- Schmitz, G., Langmann, T., and Heimerl, S. (2001). Role of ABCG1 and other ABCG family members in lipid metabolism. *J. Lipid Res.* *42*, 1513–1520.
- Schrag, M., and Kirshner, H. (2016). Neuropsychological Effects of Cerebral Amyloid Angiopathy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *16*, 76.
- Seebacher, N., Lane, D.J.R., Richardson, D.R., and Jansson, P.J. (2016). Turning the gun on cancer: Utilizing lysosomal P-glycoprotein as a new strategy to overcome multi-drug resistance. *Free Radic. Biol. Med.* *96*, 432–445.
- Selkoe, D.J., and Wolfe, M.S. (2007). Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* *131*, 215–221.
- Seres, L., Cserepes, J., Elkind, N.B., Törocsik, D., Nagy, L., Sarkadi, B., and Homolya, L. (2008). Functional ABCG1 expression induces apoptosis in macrophages and other cell types. *Biochim. Biophys. Acta* *1778*, 2378–2387.
- Sharom, F.J. (2011). The P-glycoprotein multidrug transporter. *Essays Biochem.* *50*, 161–178.
- Sharpe, L.J., Wong, J., Garner, B., Halliday, G.M., and Brown, A.J. (2012). Is seladin-1 really a selective Alzheimer's disease indicator? *J. Alzheimers Dis. JAD* *30*, 35–39.
- Shawahna, R., Uchida, Y., Declèves, X., Ohtsuki, S., Yousif, S., Dauchy, S., Jacob, A., Chassoux, F., Daumas-Duport, C., Couraud, P.-O., et al. (2011). Transcriptomic and quantitative proteomic analysis of transporters and drug metabolizing enzymes in freshly isolated human brain microvessels. *Mol. Pharm.* *8*, 1332–1341.
- Shen, S., Callaghan, D., Juzwik, C., Xiong, H., Huang, P., and Zhang, W. (2010). ABCG2 reduces ROS-mediated toxicity and inflammation: a potential role in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* *114*, 1590–1604.
- Shibata, M., Yamada, S., Kumar, S.R., Calero, M., Bading, J., Frangione, B., Holtzman, D.M., Miller, C.A., Strickland, D.K., Ghiso, J., et al. (2000). Clearance of Alzheimer's amyloid-ss(1-40) peptide from brain by LDL receptor-related protein-1 at the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* *106*, 1489–1499.
- Silva, R., Vilas-Boas, V., Carmo, H., Dinis-Oliveira, R.J., Carvalho, F., de Lourdes Bastos, M., and Remião, F. (2015). Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy. *Pharmacol. Ther.* *149*, 1–123.
- Sims, D.E. (1986). The pericyte--a review. *Tissue Cell* *18*, 153–174.
- Singaraja, R.R., Brunham, L.R., Visscher, H., Kastelein, J.J.P., and Hayden, M.R. (2003). Efflux and atherosclerosis: the clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *23*, 1322–1332.
- Smit, J.W., Huisman, M.T., van Tellingen, O., Wiltshire, H.R., and Schinkel, A.H. (1999). Absence or pharmacological blocking of placental P-glycoprotein profoundly increases fetal drug exposure. *J. Clin. Invest.* *104*, 1441–1447.
- Sodani, K., Patel, A., Kathawala, R.J., and Chen, Z.-S. (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chin. J. Cancer* *31*, 58–72.

- Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 119, 7–35.
- Sparks, D.L., Scheff, S.W., Hunsaker, J.C., Liu, H., Landers, T., and Gross, D.R. (1994). Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp. Neurol.* 126, 88–94.
- Storck, S.E., Meister, S., Nahrath, J., Meißner, J.N., Schubert, N., Di Spiezio, A., Baches, S., Vandenbroucke, R.E., Bouter, Y., Prikulis, I., et al. (2016). Endothelial LRP1 transports amyloid- $\beta$ (1-42) across the blood-brain barrier. *J. Clin. Invest.* 126, 123–136.
- Strazielle, N., and Ghersi-Egea, J.F. (2013). Physiology of blood-brain interfaces in relation to brain disposition of small compounds and macromolecules. *Mol. Pharm.* 10, 1473–1491.
- Strazielle, N., and Ghersi-Egea, J.-F. (2015). Efflux transporters in blood-brain interfaces of the developing brain. *Front. Neurosci.* 9, 21.
- Sugihara, T., Munesue, S., Yamamoto, Y., Sakurai, S., Akhter, N., Kitamura, Y., Shiba, K., Watanabe, T., Yonekura, H., Hayashi, Y., et al. (2012). Endogenous secretory receptor for advanced glycation end-products inhibits amyloid- $\beta$ 1-42 uptake into mouse brain. *J. Alzheimers Dis. JAD* 28, 709–720.
- Szafraniec, M.J., Szczygieł, M., Urbanska, K., and Fiedor, L. (2014). Determinants of the activity and substrate recognition of breast cancer resistance protein (ABCG2). *Drug Metab. Rev.* 46, 459–474.
- Tachikawa, M., Watanabe, M., Hori, S., Fukaya, M., Ohtsuki, S., Asashima, T., and Terasaki, T. (2005). Distinct spatio-temporal expression of ABCA and ABCG transporters in the developing and adult mouse brain. *J. Neurochem.* 95, 294–304.
- Tai, L.M., Loughlin, A.J., Male, D.K., and Romero, I.A. (2009). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein restrict apical-to-basolateral permeability of human brain endothelium to amyloid-beta. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1079–1083.
- Takasato, Y., Rapoport, S.I., and Smith, Q.R. (1984). An in situ brain perfusion technique to study cerebrovascular transport in the rat. *Am. J. Physiol.* 247, H484-493.
- Takeuchi, M., Sato, T., Takino, J., Kobayashi, Y., Furuno, S., Kikuchi, S., and Yamagishi, S. (2007). Diagnostic utility of serum or cerebrospinal fluid levels of toxic advanced glycation end-products (TAGE) in early detection of Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses* 69, 1358–1366.
- Tam, S.-P., Mok, L., Chimini, G., Vasa, M., and Deeley, R.G. (2006). ABCA1 mediates high-affinity uptake of 25-hydroxycholesterol by membrane vesicles and rapid efflux of oxysterol by intact cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291, C490-502.
- Tan, B., Piwnica-Worms, D., and Ratner, L. (2000). Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr. Opin. Oncol.* 12, 450–458.
- Tan, Z.S., Beiser, A., Vasan, R.S., Au, R., Auerbach, S., Kiel, D.P., Wolf, P.A., and Seshadri, S. (2008). Thyroid function and the risk of Alzheimer disease: the Framingham Study. *Arch. Intern. Med.* 168, 1514–1520.
- Tarasoff-Conway, J.M., Carare, R.O., Osorio, R.S., Glodzik, L., Butler, T., Fieremans, E., Axel, L., Rusinek, H., Nicholson, C., Zlokovic, B.V., et al. (2015). Clearance systems in the brain-implications for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* 11, 457–470.

- Tarr, P.T., and Edwards, P.A. (2008). ABCG1 and ABCG4 are coexpressed in neurons and astrocytes of the CNS and regulate cholesterol homeostasis through SREBP-2. *J. Lipid Res.* *49*, 169–182.
- Tashima, T. (2015). Intriguing possibilities and beneficial aspects of transporter-conscious drug design. *Bioorg. Med. Chem.* *23*, 4119–4131.
- Terrisse, L., Poirier, J., Bertrand, P., Merched, A., Visvikis, S., Siest, G., Milne, R., and Rassart, E. (1998). Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J. Neurochem.* *71*, 1643–1650.
- Theodoulou, F.L., and Kerr, I.D. (2015). ABC transporter research: going strong 40 years on. *Biochem. Soc. Trans.* *43*, 1033–1040.
- Thiebaut, F., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I., and Willingham, M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7735–7738.
- Thomas, H., and Coley, H.M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control J. Moffitt Cancer Cent.* *10*, 159–165.
- Thompson, B.J., Sanchez-Covarrubias, L., Slosky, L.M., Zhang, Y., Laracuente, M., and Ronaldson, P.T. (2014). Hypoxia/reoxygenation stress signals an increase in organic anion transporting polypeptide 1a4 (Oatp1a4) at the blood-brain barrier: relevance to CNS drug delivery. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *34*, 699–707.
- Thomsen, M.S., Birkelund, S., Burkhart, A., Stensballe, A., and Moos, T. (2016). Synthesis and deposition of basement membrane proteins by primary brain capillary endothelial cells in a murine model of the blood-brain barrier. *J. Neurochem.*
- Tietz, S., and Engelhardt, B. (2015). Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. *J. Cell Biol.* *209*, 493–506.
- Tornavaca, O., Chia, M., Dufton, N., Almagro, L.O., Conway, D.E., Randi, A.M., Schwartz, M.A., Matter, K., and Balda, M.S. (2015). ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. *J. Cell Biol.* *208*, 821–838.
- Tu, S., Okamoto, S., Lipton, S.A., and Xu, H. (2014). Oligomeric A $\beta$ -induced synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* *9*, 48.
- Tulsyan, S., Mittal, R.D., and Mittal, B. (2016). The effect of ABCB1 polymorphisms on the outcome of breast cancer treatment. *Pharmacogenomics Pers. Med.* *9*, 47–58.
- Uchida, Y., Ohtsuki, S., Katsukura, Y., Ikeda, C., Suzuki, T., Kamiie, J., and Terasaki, T. (2011). Quantitative targeted absolute proteomics of human blood-brain barrier transporters and receptors. *J. Neurochem.* *117*, 333–345.
- Uehara, Y., Yamada, T., Baba, Y., Miura, S., Abe, S., Kitajima, K., Higuchi, M., Iwamoto, T., and Saku, K. (2008). ATP-binding cassette transporter G4 is highly expressed in microglia in Alzheimer's brain. *Brain Res.* *1217*, 239–246.
- Umeda, T., Tomiyama, T., Kitajima, E., Idomoto, T., Nomura, S., Lambert, M.P., Klein, W.L., and Mori, H. (2012). Hypercholesterolemia accelerates intraneuronal accumulation of A $\beta$  oligomers resulting in memory impairment in Alzheimer's disease model mice. *Life Sci.* *91*, 1169–1176.



- Urmoneit, B., Prikulis, I., Wihl, G., D'Urso, D., Frank, R., Heeren, J., Beisiegel, U., and Prior, R. (1997). Cerebrovascular smooth muscle cells internalize Alzheimer amyloid beta protein via a lipoprotein pathway: implications for cerebral amyloid angiopathy. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *77*, 157–166.
- Vanmierlo, T., Bloks, V.W., van Vark-van der Zee, L.C., Rutten, K., Kerksiek, A., Friedrichs, S., Sijbrands, E., Steinbusch, H.W., Kuipers, F., Lütjohann, D., et al. (2010). Alterations in brain cholesterol metabolism in the APPSLxPS1mut mouse, a model for Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis. JAD* *19*, 117–127.
- Vaughan, A.M., and Oram, J.F. (2006). ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J. Lipid Res.* *47*, 2433–2443.
- Velamakanni, S., Wei, S.L., Janvilisri, T., and van Veen, H.W. (2007). ABCG transporters: structure, substrate specificities and physiological roles : a brief overview. *J. Bioenerg. Biomembr.* *39*, 465–471.
- Vest, R.S., and Pike, C.J. (2013). Gender, sex steroid hormones, and Alzheimer's disease. *Horm. Behav.* *63*, 301–307.
- Villemagne, V.L., Pike, K.E., Chételat, G., Ellis, K.A., Mulligan, R.S., Bourgeat, P., Ackermann, U., Jones, G., Szoëke, C., Salvado, O., et al. (2011). Longitudinal assessment of A $\beta$  and cognition in aging and Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* *69*, 181–192.
- Vogelgesang, S., Cascorbi, I., Schroeder, E., Pahnke, J., Kroemer, H.K., Siegmund, W., Kunert-Keil, C., Walker, L.C., and Warzok, R.W. (2002). Deposition of Alzheimer's beta-amyloid is inversely correlated with P-glycoprotein expression in the brains of elderly non-demented humans. *Pharmacogenetics* *12*, 535–541.
- de Vries, N.A., Zhao, J., Kroon, E., Buckle, T., Beijnen, J.H., and van Tellingen, O. (2007). P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 6440–6449.
- Vulevic, B., Chen, Z., Boyd, J.T., Davis, W., Walsh, E.S., Belinsky, M.G., and Tew, K.D. (2001). Cloning and characterization of human adenosine 5'-triphosphate-binding cassette, sub-family A, transporter 2 (ABCA2). *Cancer Res.* *61*, 3339–3347.
- Wan, W., Cao, L., Liu, L., Zhang, C., Kalionis, B., Tai, X., Li, Y., and Xia, S. (2015). A $\beta$ (1-42) oligomer-induced leakage in an in vitro blood-brain barrier model is associated with up-regulation of RAGE and metalloproteinases, and down-regulation of tight junction scaffold proteins. *J. Neurochem.* *134*, 382–393.
- Wang, S., and Smith, J.D. (2014). ABCA1 and nascent HDL biogenesis. *BioFactors Oxf. Engl.* *40*, 547–554.
- Wang, N., Lan, D., Chen, W., Matsuura, F., and Tall, A.R. (2004). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cellular cholesterol efflux to high-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 9774–9779.
- Wang, N., Ranalletta, M., Matsuura, F., Peng, F., and Tall, A.R. (2006). LXR-induced redistribution of ABCG1 to plasma membrane in macrophages enhances cholesterol mass efflux to HDL. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 1310–1316.

- Wang, N., Yvan-Charvet, L., Lütjohann, D., Mulder, M., Vanmierlo, T., Kim, T.-W., and Tall, A.R. (2008). ATP-binding cassette transporters G1 and G4 mediate cholesterol and desmosterol efflux to HDL and regulate sterol accumulation in the brain. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *22*, 1073–1082.
- Wang, S., Wang, R., Chen, L., Bennett, D.A., Dickson, D.W., and Wang, D.-S. (2010). Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *J. Neurochem.* *115*, 47–57.
- Wang, T., Agarwal, S., and Elmquist, W.F. (2012). Brain distribution of cediranib is limited by active efflux at the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *341*, 386–395.
- Ward, S.M., Himmelstein, D.S., Lancia, J.K., and Binder, L.I. (2012). Tau oligomers and tau toxicity in neurodegenerative disease. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 667–671.
- Watkins, null (1997). The barrier function of CYP3A4 and P-glycoprotein in the small bowel. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *27*, 161–170.
- Weber, C., Fraemohs, L., and Dejana, E. (2007). The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 467–477.
- Weidner, L.D., Zoghbi, S.S., Lu, S., Shukla, S., Ambudkar, S.V., Pike, V.W., Mulder, J., Gottesman, M.M., Innis, R.B., and Hall, M.D. (2015). The Inhibitor Ko143 Is Not Specific for ABCG2. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *354*, 384–393.
- Weingarten, M.D., Lockwood, A.H., Hwo, S.Y., and Kirschner, M.W. (1975). A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 1858–1862.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., and Couraud, P.-O. (2009). The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim. Biophys. Acta* *1788*, 842–857.
- Wellington, C.L., Walker, E.K.Y., Suarez, A., Kwok, A., Bissada, N., Singaraja, R., Yang, Y.-Z., Zhang, L.-H., James, E., Wilson, J.E., et al. (2002). ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *82*, 273–283.
- Westerterp, M., Bochem, A.E., Yvan-Charvet, L., Murphy, A.J., Wang, N., and Tall, A.R. (2014). ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circ. Res.* *114*, 157–170.
- Wiese, M. (2015). BCRP/ABCG2 inhibitors: a patent review (2009-present). *Expert Opin. Ther. Pat.* *25*, 1229–1237.
- Wijesuriya, H.C., Bullock, J.Y., Faull, R.L.M., Hladky, S.B., and Barrant, M.A. (2010). ABC efflux transporters in brain vasculature of Alzheimer's subjects. *Brain Res.* *1358*, 228–238.
- Wilkens, S. (2015). Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000prime Rep.* *7*, 14.
- Wisniewski, T., Newman, K., and Javitt, N.B. (2013). Alzheimer's disease: brain desmosterol levels. *J. Alzheimers Dis. JAD* *33*, 881–888.
- Wojcik, A.J., Skafien, M.D., Srinivasan, S., and Hedrick, C.C. (2008). A critical role for ABCG1 in macrophage inflammation and lung homeostasis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *180*, 4273–4282.
- Wolf, A., Bauer, B., and Hartz, A.M.S. (2012). ABC Transporters and the Alzheimer's Disease Enigma. *Front. Psychiatry* *3*, 54.

- Wollmer, M.A., Kapaki, E., Hersberger, M., Muntwyler, J., Brunner, F., Tsolaki, M., Akatsu, H., Kosaka, K., Michikawa, M., Molyva, D., et al. (2006). Ethnicity-dependent genetic association of ABCA2 with sporadic Alzheimer's disease. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* *141B*, 534–536.
- Wolozin, B., Kellman, W., Ruosseau, P., Celesia, G.G., and Siegel, G. (2000). Decreased prevalence of Alzheimer disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arch. Neurol.* *57*, 1439–1443.
- Woodward, O.M. (2015). ABCG2: the molecular mechanisms of urate secretion and gout. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *309*, F485–488.
- Xiong, H., Callaghan, D., Jones, A., Bai, J., Rasquinha, I., Smith, C., Pei, K., Walker, D., Lue, L.-F., Stanimirovic, D., et al. (2009). ABCG2 is upregulated in Alzheimer's brain with cerebral amyloid angiopathy and may act as a gatekeeper at the blood-brain barrier for Abeta(1-40) peptides. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 5463–5475.
- Xu, J., Peng, H., Chen, Q., Liu, Y., Dong, Z., and Zhang, J.-T. (2007). Oligomerization domain of the multidrug resistance-associated transporter ABCG2 and its dominant inhibitory activity. *Cancer Res.* *67*, 4373–4381.
- Xu, R., Feng, X., Xie, X., Zhang, J., Wu, D., and Xu, L. (2012). HIV-1 Tat protein increases the permeability of brain endothelial cells by both inhibiting occludin expression and cleaving occludin via matrix metalloproteinase-9. *Brain Res.* *1436*, 13–19.
- Xue-shan, Z., Juan, P., Qi, W., Zhong, R., Li-hong, P., Zhi-han, T., Zhi-sheng, J., Gui-xue, W., and Lu-shan, L. (2016). Imbalanced cholesterol metabolism in Alzheimer's disease. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *456*, 107–114.
- Yan, S.D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., Slattery, T., Zhao, L., Nagashima, M., Morser, J., et al. (1996). RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* *382*, 685–691.
- Yates, E.A., Owens, S.L., Lynch, M.F., Cucco, E.M., Umbaugh, C.S., and Legleiter, J. (2013). Specific domains of A $\beta$  facilitate aggregation on and association with lipid bilayers. *J. Mol. Biol.* *425*, 1915–1933.
- Yong-Hong, L., Xiao-Dong, P., Chang-Quan, H., Bo, Y., and Qing-Xiu, L. (2013). Hypothalamic-pituitary-thyroid axis in patients with Alzheimer disease (AD). *J. Investig. Med. Off. Publ. Am. Fed. Clin. Res.* *61*, 578–581.
- Yoon, S.-S., and Jo, S.A. (2012). Mechanisms of Amyloid- $\beta$  Peptide Clearance: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease. *Biomol. Ther.* *20*, 245–255.
- Young, A.M., Allen, C.E., and Audus, K.L. (2003). Efflux transporters of the human placenta. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *55*, 125–132.
- Yu, S.L., Wong, C.K., Szeto, C.C., Li, E.K., Cai, Z., and Tam, L.S. (2015). Members of the receptor for advanced glycation end products axis as potential therapeutic targets in patients with lupus nephritis. *Lupus* *24*, 675–686.

- Yvan-Charvet, L., Ranalletta, M., Wang, N., Han, S., Terasaka, N., Li, R., Welch, C., and Tall, A.R. (2007). Combined deficiency of ABCA1 and ABCG1 promotes foam cell accumulation and accelerates atherosclerosis in mice. *J. Clin. Invest.* *117*, 3900–3908.
- Zenaro, E., Piacentino, G., and Constantin, G. (2016). The blood-brain barrier in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.*
- Zerenturk, E.J., Sharpe, L.J., Ikonen, E., and Brown, A.J. (2013). Desmosterol and DHCR24: unexpected new directions for a terminal step in cholesterol synthesis. *Prog. Lipid Res.* *52*, 666–680.
- Zhang, D.-D., Yu, H.-L., Ma, W.-W., Liu, Q.-R., Han, J., Wang, H., and Xiao, R. (2015). 27-Hydroxycholesterol contributes to disruptive effects on learning and memory by modulating cholesterol metabolism in the rat brain. *Neuroscience* *300*, 163–173.
- Zhang, H., Lamon, B.D., Moran, G., Sun, T., Gotto, A.M., and Hajjar, D.P. (2016). Pitavastatin Differentially Modulates MicroRNA-Associated Cholesterol Transport Proteins in Macrophages. *PLoS One* *11*, e0159130.
- Zhang, W., Xiong, H., Callaghan, D., Liu, H., Jones, A., Pei, K., Fatehi, D., Brunette, E., and Stanimirovic, D. (2013). Blood-brain barrier transport of amyloid beta peptides in efflux pump knock-out animals evaluated by in vivo optical imaging. *Fluids Barriers CNS* *10*, 13.
- Zhao, Z., Sagare, A.P., Ma, Q., Halliday, M.R., Kong, P., Kisler, K., Winkler, E.A., Ramanathan, A., Kanekiyo, T., Bu, G., et al. (2015). Central role for PICALM in amyloid- $\beta$  blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat. Neurosci.* *18*, 978–987.
- Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., et al. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* *7*, 1028–1034.
- Zhou, Y., Yuan, J., Li, Z., Wang, Z., Cheng, D., Du, Y., Li, W., Kan, Q., and Zhang, W. (2015). Genetic polymorphisms and function of the organic anion-transporting polypeptide 1A2 and its clinical relevance in drug disposition. *Pharmacology* *95*, 201–208.
- Zlokovic, B.V. (2004). Clearing amyloid through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* *89*, 807–811.
- Zlokovic, B.V. (2011). Neurovascular pathways to neurodegeneration in Alzheimer's disease and other disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* *12*, 723–738.
- Zlokovic, B.V., Deane, R., Sagare, A.P., Bell, R.D., and Winkler, E.A. (2010). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide elimination from the brain. *J. Neurochem.* *115*, 1077–1089.