# UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE

and the first second

# THESE DE DOCTORAT DEL'UNIVERSITE

## présentée par

# **Bénédicte DEHOUCK**

# UNE NOUVELLE FONCTION DU LDL RECEPTEUR : TRANSCYTOSE DES LDL AU TRAVERS DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE



Soutenue et présentée le 24 Février 1995 devant le jury composé de:

Président	Verbert A.	Université de Lille I
Rapporteurs	Fruchart J.C. Frelin C.	Université de lille II Institut de Pharmacologie Moléculaire et cellulaire, Sophia Antipolis
Examinateurs	Cecchelli R. Joo F. Lemaire M.	Université de Lille I Biological Research Center, Hongrie Sandoz Pharma, Basel, Switzerland

# SOMMAIRE

.

		pages
Résumé		1
Abstract		2
INTRODUCTION	•	5
ETUDE BIBLIO	GRAPHIQUE	9
1 BARRIERI	E HEMATO-ENCEPHALIQUE	10
1.1 Impermé	abilité de la barrière hémato-encéphalique:	
l'endothe	élium des capillaires cérébraux	10
1.1.1	Jonctions intercellulaires	11
	1.1.1.1 Structure et rôle	11
	1.1.1.2 Etanchéité des jonctions serrées	14
1.1.2	Pinocytose, endocytose	15
1.1.3	Barrière métabolique	17
	1.1.3.1 Monoamine oxydase	17
	1.1.3.2 P-glycoprotéine	18
1.1.4	Conclusion	21
1.2 Processu	s de transports à travers la barrière hémato-	
encépha	lique	23
1.2.1	Différents processus de transports au travers de	
	la barrière hémato-encéphalique	23
1.2.2	Transport des ions, du glucose, des acides	
	aminés	24
	1.2.2.1 Transport des ions	24
	1.2.2.1.1 Potassium	24
	1.2.2.1.2 Sodium et chlore	25
	1.2.2.2 Transport du glucose	26

2

27

1.2.3 Transport des peptides, des protéines et des	
lipoprotéines	29
1.2.3.1 Transferrine	29
1.2.3.2 Facteurs de croissance "insulin-like"(IGF-I	
et IGF-II)	30
1.2.3.3 <u>Insuline</u>	31
1.2.3.4 Lipoprotéines	32
1.2.4 Conclusion	33
INDUCTION DES PROPRIETES DE LA BARRIERE	
HEMATO-ENCEPHALIQUE	34
2.1 Influence de l'environnement sur les propriétés structu-	
rales et métaboliques des capillaires cérébraux	34
2.2 Situation stratégique des astrocytes	35
2.3 Influence des astrocytes sur les propriétés de la barrière	
hémato-encéphalique	37
2.3.1 Etudes in vivo	37
2.3.2 Etudes in vitro	38
2.3.2.1 Milieu conditionné par les astrocytes	38
2.3.2.1.1 Induction des jonctions serrées	38
2.3.2.1.2 Induction des propriétés métaboliques	
des cellules endothéliales	41
2.3.2.2 Coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes	43
2.3.2.2.1 Induction des jonctions serrées	43
2.3.2.2.2 Induction des propriétés métaboliques	
des cellules endothéliales	44
2.4 Influence des cellules endothéliales sur les astrocytes	46

•

## 2.5 Conclusion

3 CERVEAU, LIPIDES ET LIPOPROTEINES	48
3.1 Homéostasie des lipides au niveau des organes périphériques	48
3.1.1 Structure et métabolisme des lipoprotéines	48
3.1.1.1 Classification des lipoprotéines	49
3.1.1.2 Apolipoprotéines	50
3.1.1.3 Métabolisme des lipoprotéines	51
3.1.1.3.1 Métabolisme des lipoprotéines transportant	
les lipides alimentaires	51
3.1.1.3.2 Métabolisme des lipoprotéines synthétisées	
par le foie	52
3.1.2 Récepteurs cellulaires des lipoprotéines	53
3.1.2.1 <u>Récepteur apo (B, E)</u>	53
3.1.2.1.1 Structure et métabolisme du récepteur	
apo(B, E)	53
3.1.2.1.2 Biosynthèse du récepteur apo (B, E)	55
3.1.2.1.3 Spécificité du récepteur apo (B, E)	56
3.1.2.2 Autres récepteurs	57
3.1.2.2.1 LPR : "LDL receptor related protein"	57
3.1.2.2.2 Récepteur HDL	58
3.1.2.2.3 Récepteur aux lipoprotéines modifiées	58
3.2 Homéostasie des lipides cérébraux	59
3.3 Echanges de cholestérol sang <-> cerveau	61
3.3.1 Origine du cholestérol cérébral	61
3.3.1.1 Synthèse de novo	61
3.3.1.2 Captation cérébrale du cholestérol plasmatique	62
3.3.2 Captation des lipoprotéines	62

3.4 Conclusion

63

4 CONCLU	SION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	65
TRAVAUX PE	RSONNELS	67
Article 1 :	Modèle de barrière hémato-encéphalique in vitro.	68
Article 2 :	Transport de médicaments vers le cerveau : comparaison entre des modèles d'étude de la barrière hémato-encéphalique in vi- tro et in vivo.	86
Article 3 :	Régulation de l'expression du récepteur aux lipoprotéines de basse densité au niveau de la barrière hémato-encéphalique : intercommunications entre les cellules endothéliales de capil-laires cérébraux.	114
Article 4 :	Transcytose des lipoprotéines de basse densité au travers de la barrière hémato-encéphalique.	127
DISCUSSION I	ET CONCLUSION GENERALE	161
1 Intercon	nmunications cellules endothéliales-astrocytes	161
2 Récepteu	r LDL des capillaires cérébraux	163
3 Perspect	ives	166
BIBLIOGRAPH	HE	168

•

•

# **DOCUMENTS**

pages

•

1 -	In vitro reconstituted blood-brain barrier. Dehouck M.P., Méresse S., Dehouck B., Fruchart J.C. and Cecchelli R. Journal of Controlled Release (1992).	74
2 -	Drug transport to the brain : comparaison between in vitro and in vivo models of the blood-brain barrier. Dehouck M.P., Schluep C., Dehouck B., Fruchart J.C., Lemaire M. and Cecchelli R. Soumis : European L of Pharmaceutical Sciences	89
	Soumis : European J. of Pharmaceutical Sciences.	
3 -	Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. Dehouck B., Dehouck M.P., Fruchart J.C. and Cecchelli R. J. Cell Biol. (1994), 126, 465-473.	117
4 -	A new function for the LDL receptor transcytosis of LDL across the blood- brain barrier.	129
	Dehouck B., Torpier G., Dehouck M.P., Fruchart J.C. and Cecchelli R.	

Soumis : J. Cell Biol.

# **ILLUSTRATIONS**

		pages
Figure 1 :	Structure des capillaires cérébraux (d'après Lentz pour la paroi vasculaire et d'après Delorme pour les structures sous-endothéliales).	10
Figure 2 :	Comparaison des capillaires cérébraux et non cérébraux (d'après Cornford, 1988).	11
Figure 3 :	Hypothétique cascade d'événements déclenchés par le contact cellulaire et provoquant la formation de jonctions serrées (d'après Anderson et al., 1993).	13
Figure 4 :	Schéma représentant les feuillets membranaires impliqués dans une jonction serrée, après cryofracture (d'après Hirsch et al., 1985).	14
Figure 5 :	Schéma représentant les différents processus de transports intervenant dans la perméabilité d'un capillaire continu (d'après Schnitzer, 1993).	16
Figure 6 :	Synthèse et dégradation des neurotransmetteurs monoaminergiques (d'après Hardebo et Owman, 1980).	17
Figure 7 :	Structure de la P-glycoprotéine humaine ; insertion dans la membrane plasmique (daprès Juranka et al., 1989).	18
Figure 8 :	Modèle de transport : "Flippase model" (d'après Higgins 1994).	20
Figure 9 :	Différents mécanismes de transport des lipides au travers des membranes (d'après Higgins 1994).	21
Figure 10 :	Transport des ions au travers de la barrière hémato-encéphalique (d'après Golstein et Betz 1983).	24

Figure 11 : Modèle de transport des ions potassium au travers de la BHE (d'après Vigne et al., 1994).

25

Figure 12 : Transport et métabolisme du glucose au niveau de la barrière hémato-

	encéphalique (d'après Pardridge 1993).	26
Figure 13 :	Transport du glucose et des acides aminés (système-L et système-A) (d'après Golstein et Betz 1986).	27
Figure 14 :	Hypothèses de transport de la transferrine au travers de la barrière hémato-encéphalique.	30
Figure 15 :	Transcytose de l'insuline au travers de la barrière hémato-encéphalique (d'après Pardridge 1986).	31
Figure 16 :	Résumé des expériences de transplantations réalisées par Stewart et Wiley (1981).	34
Figure 17 :	Prolongements pédiculés des astrocytes formant un manchon autour des capillaires cérébraux (d'après Ganong 1989).	36
Figure 18 :	Situation stratégique et rôle des astrocytes dans le maintien d'un environnement adéquat au fonctionnement des neurones (d'après Kimelberg 1983).	36
Figure 19 :	Modèle d'expression de gènes spécifiques de la barrière hémato- encéphalique (d'après Pardridge 1991).	45
Figure 20 :	Modèle de lipoprotéine (d'après Yang et al., 1990).	49
Figure 21 :	Caractéristiques des différentes apolipoprotéines (d'après Luc et al., 1991).	50
Figure 22 :	Schéma général du métabolisme des lipoprotéines (d'après Luc et al., 1991).	52
Figure 23 :	Structure du récepteur apo(B,E) (d'après Esser et al., 1988).	53
Figure 24 :	Métabolisme des complexes LDL-récepteurs apo(B,E) (d'après Brown et Golstein 1985).	54
Figure 25 :	Représentation schématique du récepteur LDL et du LRP (LDL receptor Related Protein) (d'après Brown et al., 1991).	57

Participation hypothétique des astrocytes et de l'apo E dans la régénération de synapses et la prolifération de dendrites (d'après Poirier 1994).	60
Schéma de la coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes de part et d'autre d'un filtre.	69
Réalisation de la coculture	70
Schéma de coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes. Les astrocytes sont ensemencés sur le plastique d'une boîte de Pétri.	86
Intercommunication entre les cellules endothéliales et les astrocytes lors de la coculture.	163
Schéma récapitulatif des informations concernant le métabolisme des LDL dans l'endothélium des organes périphériques et des capillaires de la BHE (d'après Méresse, 1988).	164
Transport des LDL au travers de la BHE et rôle hypothétique des astrocytes dans la recomposition et la distribution des lipides aux cellules du système nerveux central.	165
	Participation hypothétique des astrocytes et de l'apo E dans la régénération de synapses et la prolifération de dendrites (d'après Poirier 1994). Schéma de la coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes de part et d'autre d'un filtre. Réalisation de la coculture Schéma de coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes. Les astrocytes sont ensemencés sur le plastique d'une boîte de Pétri. Intercommunication entre les cellules endothéliales et les astrocytes lors de la coculture. Schéma récapitulatif des informations concernant le métabolisme des LDL dans l'endothélium des organes périphériques et des capillaires de la BHE (d'après Méresse, 1988). Transport des LDL au travers de la BHE et rôle hypothétique des astrocytes dans la recomposition et la distribution des lipides aux cellules du système nerveux central.

•

## Résumé

Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux, support de la barrière hématoencéphalique (BHE), présentent des caractéristiques morphologiques et biochimiques qui restreignent les échanges entre le sang et le cerveau. Le transport du glucose, des acides aminés, de l'insuline et d' autres molécules sont aujourd'hui connus. Par contre les modalités de transfert des lipides du sang au cerveau sont encore inconnues.

Au contraire de l'endothélium des autres organes, l'endothélium des capillaires cérébraux présente un récepteur LDL. Nos travaux ont pour but d'étudier le rôle de ce récepteur. Ils sont effectués sur un modèle in vitro de BHE, consistant en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes. Les études d'interactions entre ces deux types cellulaires montrent que lorsque les astrocytes sont déprimés en cholestérol, l'expression du récepteur LDL au niveau de l'endothélium cérébral est multipliée par 6. Cet effet est médié par un(des) facteur(s) soluble(s) exclusivement sécrété(s) par les astrocytes préalablement cultivés avec les cellules endothéliales cérébrales. Le facteur obtenu dans ces conditions permet l'induction du récepteur LDL au niveau de l'endothélium cérébral est univeau d'autres cellules. Ces résultats montrent que le récepteur LDL au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux est l'une des caractéristiques de la BHE.

L'étude du transport des LDL au travers de l'endothélium cérébral, montre que le transfert des LDL du sang vers le cerveau est spécifique et est inhibé par l'anticorps C-7 connu pour bloquer la fixation des LDL à leur récepteur. Ainsi le récepteur LDL au niveau de l'endothélium cérébral permet le transport des LDL au travers de la BHE. La transcytose des LDL est régulée en fonction des besoins lipidiques du parenchyme cérébral. Ces résultats confirment que la BHE est biologiquement active, et établissent un rôle nouveau du récepteur LDL, le transport des lipides au travers de la BHE.

### Abstract

The passage of substances across the blood-brain barrier (BBB) is regulated by cerebral capillaries which possess certain distinctly different morphological and enzymatic properties compared to capillaries of other organs. Carrier mediated transport systems that facilitate the uptake of hexoses, amino acids, have also been revealed in the cerebral endothelium. But, until now, little information has come to light regarding the cerebral uptake of lipids.

In contrast to the endothelial cells in large vessels where LDL receptors are downregulated, brain capillary endothelial cells in vivo express an LDL receptor. Investigations of the fonction of this receptor has been facilited by the use of a cell culture model of the blood-brain barrier consisting of a coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. We have shown that the lipid requirement of astrocytes increases the expression of endothelial cell LDL receptors. This effect is mediated by a soluble factor(s), exclusively secreted by astrocytes cocultured with brain capillary endothelial cells, but it also upregulates the LDL receptor on other cell types. This study confirms the notion that the final fine tuning of cell differentiation is under local control and shows that the LDL receptor expression is one of the functional characteristics of the blood-brain barrier.

The function of this receptor at the BBB is investigated by studying the transport of LDL through the cerebral endothelium. This transport is specific and totally inhibited by the C7 monoclonal antibody, known to interact with the LDL receptor binding domain. These results show that transcytosis is mediated by the LDL receptor and suggest that plasma LDL is involved in delivery of lipids through the BBB. Lipid requirement of astrocytes regulates LDL transcytosis, confirming that the BBB is an active barrier and the lipid transport through the BBB could be considered as a new function for the LDL receptor.

## **ABREVIATIONS**

Α	adrénaline
AAD	aromatic L-aminoacid decarboxylase
аро	apolipoprotéine
BHE	barrière hémato-encéphalique
BUI	brain uptake index
CI	complexity index
DA	dopamine
DOPA	3,4 dihydroxyphénylalanine
Ео	extraction cérébrale au temps zéro
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
FGF	fibroblast growth factor
γ-GT	gamma-glutamyl transpeptidase
HDL	high density lipoprotein
HMG CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A
5-HT	5-hydroxytryptamine
5-HTP	5-hydroxytryptophane
IDL	intermediate density lipoprotein
IGF	insulin like growth factor
LCR	liquide céphalo-rachidien
LCAT	lecithin cholesterol acyl transferase
LDL	low density lipoprotein
Lp	lipoprotéine
LPL	lipoprotéine lipase
LRP	LDL receptor related protein
MAO	monoamine oxydase
MDR	multidrug resistance
ME	mobilité électrophorétique
NA	noradrénaline
NGF	nerve growth factor
OAP	orthogonal arrays of particles
PDGF	platelet derived growth factor
Pe	coefficient de perméabilité endothéliale
PFA	plasmatic face association
PS	perméabilité x surface
SNC	système nerveux central
VHDL	very high density lipoprotein

.

.

very low density lipoprotein
zonula adherens
zonula occludentes

•

.

•

# INTRODUCTION

### INTRODUCTION

L'homéostasie du liquide interstitiel qui baigne les neurones est un élément crucial du bon fonctionnement du système nerveux central. La composition de ce milieu est différente de celle du plasma. Cette dernière varie en fonction de l'activité physique, hormonale ou digestive. Pour éviter que ces modifications influent sur le cerveau, ce qui perturberait l'activité nerveuse et provoquerait des troubles du comportement, l'évolution a doté les organismes d'une barrière entre le sang et le cerveau : "la barrière hémato-encéphalique".

Le support anatomique de la barrière hémato-encéphalique (BHE) est l'endothélium des capillaires cérébraux. Cet endothélium possède des caractéristiques structurales et enzymatiques différentes de celles des endothélia des autres organes. Ces propriétés restreignent très fortement les échanges non spécifiques entre le sang et le parenchyme cérébral. En conséquence, le passage des nutriments constitutifs et énergétiques aux travers de la BHE fait appel à des phénomènes spécifiques.

Le transport du glucose, des acides aminés, de l'insuline et de quelques autres molécules sont aujourd'hui connus. Par contre, les modalités de transfert des lipides du sang au cerveau sont inconnues.

Ces lipides constituent plus de la moitié du poids sec du cerveau. Ils participent à l'élaboration des membranes cellulaires du système nerveux et en particulier des gaines de myéline. Certains de ces lipides ont aussi un rôle important dans les phénomènes de transduction.

Les lipides plasmatiques sont véhiculés dans le tissu sanguin par les lipoprotéines. Pour atteindre le cerveau ils doivent donc traverser la BHE. La mise en évidence d'un récepteur fixant ces lipoprotéines à la surface de l'endothélium des capillaires cérébraux, permet d'envisager son intervention dans le transport des lipides au travers de la BHE.

Notre travail s'inscrit dans l'un des thèmes développés par le SERLIA (Service d'Etudes et de Recherches sur les Lipoprotéines et l'Athérosclérose. Directeur : J.C. Fruchart) : lipoprotéines et BHE. Il fait suite aux travaux de Stéphane Méresse qui a montré l'existence d'un récepteur aux LDL (pour Low Density Lipoprotein) in vivo sur des capillaires cérébraux de bœuf. Afin d'étudier le rôle de ce récepteur, il met au point une culture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et montre que ces cellules fixent, internalisent les LDL, mais ne les dégradent pas.

La mise au point, par Marie-Pierre Dehouck, d'un modèle in vitro de BHE, consistant en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes de part et d'autre d'un filtre, permet de recréer les conditions in vivo. En présence d'astrocytes, les cellules endothéliales in vitro présentent toutes les caractéristiques de l'endothélium cérébral in vivo.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que ce modèle pouvait servir à l'étude du passage des substances au travers de la BHE. Ces études comparent les résultats obtenus avec le modèle in vitro et ceux obtenus avec une méthode d'étude in vivo. Elles montrent que le passage d'un bon nombre de médicaments, du sang vers le cerveau, s'effectue de la même façon in vitro et in vivo.

Puis, après avoir vérifié l'existence d'un récepteur aux LDL à la surface des cellules endothéliales en coculture, nous avons étudié la modulation de l'expression de ce récepteur par les astrocytes.

Enfin, nous avons étudié le passage des LDL au travers de la cellule endothéliale de capillaires cérébraux.

Nos recherches ont fait l'objet des publications suivantes :

- In vitro reconstituted blood-brain barrier.
   Dehouck M.P., Méresse S., Dehouck B., Fruchart J.C. and Cecchelli R.
   Journal of Controlled Release (1992).
- 2 Drug transport to the brain : comparaison between in vitro and in vivo models of the blood-brain barrier.
   Dehouck M.P., Schluep C., Dehouck B., Fruchart J.C., Lemaire M. and Cecchelli R.
   Soumis : European J. of Pharmaceutical Sciences.
- 3 Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier
  : intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes.
  Dehouck B., Dehouck M.P., Fruchart J.C. and Cecchelli R.
  J. Cell Biol. (1994), 126, 465-473.
- A new fonction for the LDL receptor : transcytosis of LDL across the bloodbrain barrier.
   Dehouck B., Torpier G., Dehouck M.P., Fruchart J.C. and Cecchelli R.

J. Cell Biol. Soumis.

5 - Barrière hémato-encéphalique "in vitro"
Dehouck M.P., Dehouck B., Fruchart J.C. et Cecchelli R.
Science technique technologie (1993), 23, 10-15.

Les posters suivants ont été présentés :

- Intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes : upregulation of the LDL receptor at the BBB.
   Cecchelli R., Dehouck B., Dehouck M.P. and Fruchart J.C.
   European Society for Neurochemistry, Dublin, Ireland, August 16-21, 1991.
- 2 Upregulation of the low density lipoprotein receptor on brain capillary endothelial cells by astrocytes.
  Cecchelli R., Dehouck B., Méresse S., Dehouck M.P., and Fruchart J.C. European Atherosclerosis Society, Nice, France, May 17-21, 1992.
- 3 Expression of the LDL receptor in brain capillary endothelial cells is stimulated by a soluble factor(s) secreted from astrocytes.
  Dehouck B., Dehouck M.P., Fruchart J.C. and Cecchelli R.
  Molecular mechanisms regulating the permeability of the blood-brain barrier, Szeged, Hungary, July 23-24, 1993.
- 4 A new function of the LDL receptor : transcytosis of LDL through the bloodbrain barrier.
  Dehouck B., Dehouck M.P., Fruchart J.C. and Cecchelli R.
  New concepts of a blood-brain barrier, London, UK, July 4-6, 1994.

Les communications orales suivantes ont été présentées :

 Intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes : induction of LDL receptor at the blood-brain barrier.
 Présentée par Cecchelli R.
 Growth, differentiation and pathology of vascular endothelium, castle of Ringberg, München, October 16-19, 1991.

- 2 Upregulation of the LDL receptor activity in brain capillary endothelial cells is mediated by a soluble factor(s) secreted from astrocytes.
   Dehouck B., Dehouck M.P., Fruchart J.C. and Cecchelli R.
   Présentée par Cecchelli R.
   American Heart Association, November 16-19, 1992.
- 3 Lipoproteins and blood-brain barrier.
  Présentée par Cecchelli R.
  Joint meeting german and dutch societies, for Cell Biology, Münster, March 28- April 1, 1993.
- 4 A new function for the LDL receptor : transcytosis of LDL through the blood-brain barrier.
  Dehouck B., Dehouck M.P., Fruchart J.C. and Cecchelli R.
  Présentée par Cecchelli R.
  American Heart Association, November 8-11, 1993.
- 5 Transcytose des LDL à travers la BHE.
  Présentée par Dehouck B.
  Club de la BHE, Paris, France, le 17 décembre 1993.

Une conférence a été présentée :

Transcytose of LDL through the BBB. Présentée par Dehouck B. EISAI London Research Laboratories, le 12 juillet 1994.

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le début de nos connaissances sur la BHE remonte à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, époque où paraissent les travaux de Ehrlich (1885). Il remarque que la coeruleïne S injectée par voie intraveineuse, colore tous les organes sauf le cerveau. Il en conclut que le colorant n'est pas affine pour le cerveau.

Quelques années plus tard, Roux et Borrel (1898), constatent que l'antitoxine tétanique injectée par voie sanguine ne protège pas contre les effets de la toxine injectée par voie intra-cérébrale et en concluent que l'antitoxine ne parvient pas à l'encéphale.

La même année, Biedl et Kraus, remarquent que l'injection intraveineuse ou même intracarotidienne de sels biliaires (substance neurotoxique) ne provoque pas les troubles graves déclenchés par leur introduction directe dans le cerveau ou dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Ils en déduisent que les vaisseaux sanguins cérébraux sont imperméables aux sels biliaires. Lewandowsky (1900) obtient les mêmes résultats avec le ferrocyanure de sodium.

En 1913, Goldmann reprend les travaux de Ehrlich (1885) et montre que lorsque l'injection de bleu trypan est réalisée directement dans le LCR, seul le cerveau est coloré.

Ces nombreux travaux évoquent l'existence d'une barrière qui sépare le sang et le cerveau ; barrière qui restreint les échanges entre ces deux compartiments:

En 1900, Lewandowsky, à la suite de travaux sur l'action de la strychnine et du ferrocyanate de sodium sur le système nerveux central (SNC), conclut qu'une substance injectée par voie sanguine ne peut pénétrer dans le SNC que s'il atteint, par le biais des plexus choroïdes, le LCR. L'idée selon laquelle le LCR représente un intermédiaire indispensable pour le passage des substances du sang au parenchyme du SNC est reprise par Hauptmann qui parle de "Barrière Hémato-liquidienne".

Le terme de BHE est utilisé pour la première fois en 1922 par Stern et Gautier. Ils le définissent comme : "un mécanisme spécial réglant le passage de diverses substances du sang dans le liquide céphalo-rachidien et dans les centres nerveux cérébro-spinaux".

A cette époque, si les échanges entre le sang et le cerveau s'avéraient possibles, ils devaient toutefois s'effectuer par l'intermédiaire du LCR.

Il faut attendre les travaux de Walter et ceux de Spatz, pour que la place du LCR perde sa prédominence dans les mécanismes de passage entre le sang et le SNC. Ils montrent que cette barrière se compose de 3 entités :

- La barrière hémato-liquidienne : barrière entre le sang et le LCR, située au niveau des plexus choroïdes.

- La barrière liquido-tissulaire : barrière entre le LCR et le parenchyme nerveux, située au niveau de l'épendyme ou de la pie-mère. Cette interface très perméable mérite en fait peu son qualitatif de "barrière". - La barrière hémato-tissulaire ou hémato-encéphalique : barrière entre le sang et le parenchyme cérébral, située au niveau des capillaires cérébraux.

La surface vasculaire qui constitue cette dernière est cinq mille fois plus importante que celle de la barrière hémato-liquidienne. C'est donc la voie principale d'entrée de la plupart des solutés dans le système nerveux central.

## **1 BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE (BHE)**

Les vaisseaux sanguins du cerveau ont longtemps été le siège hypothétique de la BHE.

Les travaux de Reese et Karnovsky (1967), Brightman et Reese (1969) et Delorme et al. (1970, 1975) ont permis d'établir le siège précis de la BHE. Utilisant des traceurs visualisables en microscopie électronique, qu'ils injectent soit par voie intraveineuse, soit directement dans le LCR, ils établissent que l'endothélium de capillaires cérébraux constitue l'élément anatomique de la BHE. Cet endothélium est responsable de la restriction des échanges entre le sang et le cerveau.

# 1.1 Imperméabilité de la BHE : l'endothélium des capillaires cérébraux

Les capillaires (Fig. 1) sont formés d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale et par endroits, enchassé dans cette lame basale, d'un deuxième type cellulaire : les péricytes.

Les capillaires sont enveloppés d'un manchon ininterrompu de pieds astrocytaires.



Figure 1 : Structure des capillaires cérébraux (d'après Lentz pour la paroi vasculaire et d'après Delorme pur les structures sous-endothéliales).

Les caractéristiques morphologiques liées à l'imperméabilité de l'endothélium des capillaires cérébraux et qui les différencient des capillaires des autres organes, sont la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales, la rareté des vésicules de pinocytose et l'absence de fenestration (Fig. 2). D'autres facteurs tels que l'expression de la monoamine oxydase (MAO) et la P-glycoprotéine participent aussi à l'imperméabilité de l'endothélium cérébral. Ils constituent la barrière métabolique.



CAPILLAIRE CEREBRAL

CAPILLAIRE EXTRACEREBRAL

Figure 2 : Comparaison des capillaires cérébraux et non cérébraux :

1 - Les jonctions serrées sont caractéristiques des capillaires cérébraux,

2 - La résistance électrique des capillaires cérébraux est très élevée,

3 - Les vésicules de pinocytose sont rares dans les capillaires cérébraux,

4 - Les fenestrations n'existent pas dans les capillaires cérébraux,

5 - Les mitochondries sont plus nombreuses dans les capillaires cérébraux, (d'après Cornford, 1988).

1.1.1 Jonctions intercellulaires

1.1.1.1 Structure et rôle

Les jonctions interendothéliales des capillaires cérébraux chez l'adulte correspondent à des "zonula occludentes". Elles relient de facon continue chacune des cellules endothéliales à ses voisines (Reese et Karnovsky, 1967 ; Brightman et Reese, 1969 ; Delorme et al, 1970).

En microscopie électronique à transmission, les feuillets externes de la membrane plasmique de chacune des cellules adjacentes fusionnent et l'espace extracellulaire disparaît, donnant ainsi l'aspect pentalaminaire caractéristique de ces jonctions. Ainsi l'endothélium des capillaires cérébraux est de type "continu". Les substances ne peuvent passer entre les cellules endothéliales, les jonctions étanches restreignent considérablement la diffusion des molécules tels que les ions (Hansen et al., 1977) et les substances hydrophiles non électrolytes (Oldendorf, 1971). L'imperméabilité de la BHE aux ions explique la très forte résistance électrique des capillaires cérébraux. Mesurée "in vivo" chez la grenouille, elle est d'environ 2000  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> (Crone et Olesen, 1982). C'est une valeur très proche de celle des épithélia de vessie dont l'imperméabilité est une des caractéristiques.

Les jonctions serrées, dans les endothélia comme dans les épithélia, participent à l'élaboration et au maintien de la polarité des cellules, en séparant les membranes basales et apicales. Ainsi, le déplacement d'une face à l'autre des protéines contenues dans les membranes est stoppé. La distribution asymétrique des protéines, dans les membranes apicales et basales a été décrite par Betz et al. (1980), Lidinsky et Drewes (1983). Lorsque les jonctions serrées d'un épithélium sont rompues, la polarité des cellules est perdue (Pisam et Ripoche, 1976 ; U Hs et Evans-Laung, 1983).

Récemment plusieurs protéines associées aux jonctions serrées ont été décrites :

- La ZO-1 (pour Zonula Occludentes) (Stevenson et al., 1986), isolée dans un premier temps dans le foie de souris, est une protéine de poids moléculaire compris entre 210 et 225 kD. Au niveau des jonctions serrées, elle est située dans le feuillet cytoplasmique de la membrane cellulaire.

- La cinguline (Citi et al., 1988) est une protéine de poids moléculaire 140 kD, isolée dans un premier temps chez le poulet, au niveau de la bordure en brosse intestinale. Elle se trouve dans les cellules MDCK (Stevenson et al., 1989) et dans les cellules épithéliales de colon humain (Citi et al., 1991). C'est une protéine cytoplasmique.

- La ZO-2 est une protéine de poids moléculaire 160 kD, isolée à partir des cellules MDCK (Gumbiner et al., 1991). Sa localisation est à déterminer.

Zhong et al. (1993) mettent en évidence une protéine reconnue par l'anticorps
7H6. Cette protéine est associée aux jonctions serrées. Son poids moléculaire est de 155 kD chez le rat et de 175 kD dans les cellules MDCK. Elle diffère de la ZO-1, de la ZO-2 et de la Cinguline de part son poids moléculaire et de son immunoréactivité (Zhong et al., 1993).

- La protéine **Rab 13** fixant le GTP est associée aux jonctions serrées. Elle permettrait la transduction des signaux lors de la mise en place et le maintien des jonctions serrées (Anderson et al., 1993).

- Une protéine de poids moléculaire 130 kD, la **p130**, semble aussi participer à la structure des jonctions serrées. Elle serait associée à d'autres protéines impliquées dans la jonction telles que la ZO-1 et/ou la ZO-2 ; ceci reste à déterminer (Balda et al., 1993).

- Furuse et al. (1993) isole une protéine intramembranaire, l'occludine, située aux points de contact entre les membranes cellulaires impliquées dans les jonctions serrées.

Toutes ces protéines semblent être impliquées dans la structure des jonctions serrées.

Anderson et al. (1993) décrivent une hypothétique cascade d'évènements déclenchant la formation de jonctions serrées (Fig. 3). Dans un premier temps, le calcium permet l'association des cadhérines de deux cellules, permettant le rapprochement des membranes cellulaires. Cette association déclenche un signal intracellulaire provoquant une élévation du calcium cytoplasmique. L'association des cadhérines et le calcium intracellulaire vont activer plusieurs protéines telles que la PKC, la protéine kinase A et la calmoduline. Cette activation aura pour conséquence l'assemblage des protéines ZO-1, ZO-2 et p130 au niveau de la membrane. La cinguline, les protéines Rab 13 et 7H6 ainsi que les filaments d'actine vont se répartir dans le cytoplasme proche des jonctions serrées.



Figure 3 : Hypothétique cascade d'événements déclenchés par le contact cellulaire et provoquant la formation de jonctions serrées ; rôle du calcium. (ZO) "Zonula Occludentes", (ZA) Zonula Adherens. D'après Anderson et al. (1993).

La mise en place des jonctions serrées fait intervenir de nombreuses protéines spécifiques de ces jonctions, ainsi que des protéines classiquement retrouvées dans le cytoplasme cellulaire et dans les processus de transduction. Anderson et al. (1993) montrent l'importance du calcium extracellulaire dans la formation des jonctions serrées (Fig. 3). D'autres facteurs extracellulaires semblent nécessaires dans la formation des jonctions serrées. Au niveau de l'endothélium cérébral, une intercommunication entre les cellules endothéliales et les astrocytes apparait être indispensable à la mise en place et au maintien des jonctions serrées (cf chapitre 2).

### 1.1.1.2 Etanchéité des jonctions serrées

L'étanchéité des jonctions serrées peut être évaluée de plusieurs manières :

- Par mesure de la résistance électrique.

Celle-ci est proportionnelle à l'imperméabilité des endothélia aux ions qui est ellemême directement associée à l'expression de jonctions serrées.

- Par mesure de l'imperméabilité des endothélia à des substances non actives et diffusant entre les cellules endothéliales (saccharose, inuline).

Ces deux techniques sont principalement appliquées in vitro, sur des cellules endothéliales de capillaires cérébraux mises en culture et formant une monocouche.

- Par étude en cryofracture.

Ces études ont été dans un premier temps appliquées aux épithélia présentant des jonctions serrées. En cryofracture la cassure s'effectue entre les feuillets membranaires interne et externe d'une cellule impliquée par la jonction (Fig. 4). Les feuillets présentent des stries ou des crêtes formées par les jonctions serrées. La continuité, ainsi que la complexité de ces stries seraient proportionnelles à l'imperméabilité des jonctions serrées.



Figure 4 : Schéma représentant les feuillets membranaires impliqués dans une jonction serrée, après cryofracture. (PF) face protoplasmique, (EF) face exoplasmique, (IS) espace intercellulaire. D'après Hirsch et al. (1985).

Claude et Goodenough (1973), montrent en cryofracture, que la complexité des jonctions serrées varie en fonction du rôle physiologique et donc de l'imperméabilité de l'épithélium. La cryofracture permet d'étudier les jonctions serrées sur une grande surface

membranaire et donc d'établir la continuité de ces jonctions. Plus les jonctions sont continues, plus elles sont imperméables (Molggard et al., 1976).

Wolburg et al. (1994) définissent un indice de complexité (CI : Complexity Index) proportionnel au nombre d'interconnections des stries formées par les jonctions serrées en cryofacture. De même ils s'intéressent au nombre de particules associées au feuillet membranaire côté cytoplasmique (PFA : Plasmatic Face Association) après cryofracture. Ces deux facteurs sont proportionnels à la complexité des jonctions serrées et à leur étanchéité.

### - Par étude du cytosquelette.

De nombreux auteurs montrent que les jonctions serrées sont associées au cytosquelette, qui semble jouer un rôle important dans la régulation de la perméabilité paracellulaire. (Madara, 1987 ; Madara et Pappenheimer, 1987 ; Drenckhahn and Dermietzel, 1988).

Rubin et al. (1991) étudient l'organisation de l'actine filamenteuse marquée à la rhodamine phalloïdine au niveau des cellules endothéliales mises en culture. L'augmentation de la résistance électrique est associée à la redistribution de la F-actine. En l'absence de jonctions serrées, l'actine filamenteuse est diffuse et répartie dans tout le cytoplasme de la cellule endothéliale. Au contraire, lorsque les cellules endothéliales présentent des jonctions serrées, la F-actine est localisée principalement au niveau de la membrane plasmique. Le marquage au niveau du cytoplasme est nettement atténué.

L'expression des protéines ZO-1, ZO-2 et de la cinguline au niveau des épithélia et de l'endothélium cérébral n'indique pas l'étanchéité des jonctions serrées. Cependant leurs modifications, telle que la phosphorylation, pourraient intervenir dans la modulation de la perméabilité (Stevenson et al., 1989; Nigam et al., 1991).

### 1.1.2 Pinocytose, endocytose

Les vésicules jouent un rôle très important dans la perméabilité vasculaire en permettant, par transcytose, le transfert de solutés d'un côté à l'autre de la cellule endothéliale. Le transport est plus ou moins spécifique. Ainsi deux processus de transport sont décrits (Fig. 5) :

- <u>transport par "fluid phase"</u> : le transport par "fluid phase" est décrit pour les molécules hydrosolubles ne se fixant pas à la membrane plasmique. Les vésicules formées ne sont pas recouvertes. Elles peuvent fusionner pour former des canaux transendothéliaux (Simionescu et al., 1988). Ce transport est constitutif, non spécifique et aléatoire. Il représente cependant, le principal mode d'échanges au travers des endothélia. - transport médié par un récepteur (Simionescu, M et Simionescu, N, 1988) : il nécessite la présence de récepteurs spécifiques à la surface des cellules endothéliales. Ces récepteurs sont généralement regroupés dans des puits, puis endocytosés dans des vésicules recouvertes.



Figure 5 : Schéma représentant les différents processus de transports intervenant dans la perméabilité d'un capillaire continu. (PV) vésicules non recouvertes, (TC) canal transendothélial, (TJ) jonction serrée, (LDL) lipoprotéine de basse densité. D'après Schnitzer, 1993.

Contrairement à ce qui est observé dans les autres organes, les vésicules sont très rares et les canaux transendothéliaux sont inexistants dans les capillaires du système nerveux central (Reese et Karnovsky, 1967 ; Delorme et al., 1970). Le transport par "fluid phase" est réduit et seuls les transports faisant intervenir des mécanismes spécifiques, tels que ceux médiés par un récepteur, ont lieu au travers de la BHE. Le transport spécifique de certaines molécules est détaillé dans le chapitre 1.2.

Dans certaines conditions expérimentales ou pathologiques telles que l'hypertension, le transport non spécifique peut être considérablement augmenté (Westergaard, 1977). L'activation du processus de pinocytose dans ces conditions semble liée à l'augmentation des taux d'AMPc (Joó, 1972; Joó et al., 1975) et de GMPc (Joó et al., 1983).

#### 1.1.3 Barrière métabolique

### 1.1.3.1 Monoamine oxydase (MAO)

Bertler et al. (1964) montrent que les neurotransmetteurs monoaminergiques (dopamine (DA), 5-hydroxytryptamine (5-HT ou sérotonine), noradrénaline (NA) et adrénaline (A)) sont plus rapidement métabolisés qu'ils ne sont transportés par les capillaires cérébraux. Ceci est dû à la présence, dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux et dans les péricytes, d'une enzyme : la monoamine oxydase (MAO) (Bertler et al., 1966 ; Lai et al., 1975 ; Hardebo et al., 1980).

En fait, la dopamine, la 5-hydroxytryptamine, la noradrénaline et l'adrénaline sont hydrosolubles et n'ont pas de transporteur spécifique dans les membranes luminales des capillaires cérébraux. Leur pénétration dans la cellule endothéliale se limite à une simple diffusion (Oldendorf, 1971). 3 à 5 % seulement des neurotransmetteurs monoaminergiques circulant pénètrent dans les cellules endothéliales et y sont inactivés par la MAO (Fig. 6).





Par contre, les précurseurs de ces neurotransmetteurs, c'est-à-dire le 5hydroxytryptophane (5-HTP) et la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) pénètrent, dans les cellules endothéliales, en empruntant le transporteur des acides aminés neutres (cf chapitre 1.2.2.3) (Oldendorf et Szabo, 1976 ; Pardridge, 1977). L'enzyme impliquée dans la synthèse des neurotransmetteurs (la décarboxylase des acides aminés aromatiques ou AAD) est présente dans les capillaires cérébraux (Bertler et al., 1966 ; Hardebo et al., 1979). L'AAD transforme la DOPA et le 5-HTP respectivement en dopamine et sérotonine dans les cellules endothéliales où elles sont ensuite dégradées par la MAO. La MAO, présente dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, empêche donc les amines circulantes de pénétrer dans le cerveau, mais elle inactive aussi les neurotransmetteurs libérés par les neurones dans le liquide interstitiel cérébral. Les neurotransmetteurs monoaminergiques sont activement prélevés du côté abluminal puis métabolisés dans les capillaires cérébraux (Meyer et al., 1973 ; Spatz et al., 1981).

La monoamine oxydase des cellules endothéliales des capillaires cérébraux participe à ce que Betz a appelé la "barrière métabolique", empêchant les échanges transcellulaires des neurotransmetteurs monoaminergiques et de leurs précurseurs.

1.1.3.2 P-glycoprotéine

La P-glycoprotéine est une protéine membranaire. Chez l'homme elle est composée de 1280 acides aminés, qui s'organisent en deux séquences symétriques (Fig. 7).



Figure 7 : Structure de la P-glycoprotéine humaine ; insertion dans la membrane plasmique. Chaque cercle représente un acide aminé. (C219, C32, C494) épitopes de 3 différents anticorps monoclonaux, (P7) épitope d'un anticorps polyclonal. D'après Juranka et al. (1989).

L'existence de 12 régions hydrophobes transmembranaires lui donne une configuration caractéristique de protéine assurant un transport membranaire. La partie intracytoplasmique contient deux sites de liaison à l'ATP, suggérant que l'activité de cette protéine nécessite de l'énergie. Une boucle située à la surface externe possède des sites de glycosylation.

Le gène codant pour la P-glycoprotéine fait partie d'une famille multigénique dont les séquences sont hautement conservées au cours de l'évolution (Juranka et al., 1989).

La P-glycoprotéine a été découverte à la surface de cellules de lignées tumorales rendues résistantes à des cytostatiques de mode d'action différent. Ces cellules tumorales présentent un phénotype de cellules "multi-résistantes" (MDR, pour multidrug resistance). La pharmacocinétique des cytostatiques a montré que ceux-ci entraient normalement dans les cellules MDR, mais que leur rétention intracellulaire était significativement diminuée par rapport à celle de la lignée parentale sensible. Cet efflux est actif, dépendant de la présence d'ATP. Il est associé à l'expression de la P-glycoprotéine.

La P-glycoprotéine, codée par le gène MDR 1 chez l'homme, a un rôle de pompe. Chassant hors de la cellule les cytostatiques, elle réduit ainsi leur concentration cytoplasmique et donc leur toxicité.

La P-glycoprotéine est aussi localisée dans plusieurs tissus normaux. En 1989, Cordon-Cardo et al. localisent la P-glycoprotéine au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et testiculaires. Cette protéine pourrait participer à l'effet de barrière de ces endothélia.

De nombreux médicaments anticancéreux, susceptibles de traverser la BHE, n'atteignent pas le parenchyme cérébral. La P-glycoprotéine, exprimée à la surface des cellules endothéliales serait responsable de ce phénomène. Elle fixerait de nombreux médicaments, tels que la vinblastine, l'actinomycine D, l'adriamycine, la doxorubicine ainsi que la cyclosporine. Cette fixation provoque leur expulsion de la cellule endothéliale et de ce fait limite leur transfert dans le cerveau (Tsuji et al., 1993 ; Yamashima et al., 1993). Par ailleurs, la P-glycoprotéine de l'endothélium cérébral réduirait l'arrivée au cerveau des médicaments lipophiles comme la prazosine, le vérapamil et la nifédipine ainsi que des hormones stéroïdes et que de la dexaméthasone (Greenberger et al., 1990). Des mutations du gène mdr-1-a codant pour la P-glycoprotéine chez la souris, conduisent à augmenter la perméabilité de la BHE et à prolonger la durée d'action des anticancéreux (Schinkel et al., 1994).

L'existence d'une liaison physique entre la P-glycoprotéine et les substrats a été démontré par des expériences de photoaffinité, mais les zones de liaison avec les substrats expulsés ne sont pas connues. Certains médicaments semblent avoir un site de liaison commun. Ils rentrent en compétition pour se fixer sur la P-glycoprotéine. Ainsi l'administration de la cyclosporine supprime la résistance à la vincristine et potentialise la toxicité de la vinblastine (Tamai et Safa, 1990). De même l'injection de vérapamil sensibilise les cellules cancéreuses ovariennes à l'action de l'adriamycine (Rogan et al., 1984). Le phénotype MDR peut donc être modulé. Le mécanisme d'action est une inhibition compétitive de l'expulsion du cytostatique.

Le mode d'action de la P-glycoprotéine permettant l'expulsion du médicament de la cellule reste a déterminer.

Selon Higgins (1994), l'interaction entre le substrat lipophile et la P-glycoprotéine nécessite, dans un premier temps, la pénétration du substrat dans la double couche lipidique (Fig. 8). Une fois intégré, il peut se fixer à la P-glycoprotéine et peut être alors transporté, grâce à cette protéine, du feuillet membranaire interne au feuillet externe, pour être ensuite libéré dans le liquide extracellulaire. Afin de maintenir l'équilibre entre le cytoplasme et le feuillet interne, le substrat transporté est très vite remplacé par une autre molécule cytoplasmique. Celle-ci, intégrée dans le feuillet interne de la membrane, intéragit à son tour avec la P-glycoprotéine. Ainsi progressivement, le substrat est chassé de la cellule.



Figure 8 : Modèle de transport : "Flippase model" : (A) Processus de transport au travers des membranes généralement décrit : les protéines transmembranaires forment des canaux qui préviennent le contact entre la molécule et la double couche lipidique. (B) "Flipase model" : dans ce cas la molécule est intégrée dans le feuillet lipidique. La protéine transmembranaire permet son transfert d'un feuillet à l'autre de la double couche lipidique. La molécule est intégrée ou relarguée de la membrane suivant un gradient de concentration. D'après Higgins (1994).

La P-glycoprotéine de l'endothélium cérébral participerait ainsi, aux processus permettant de restreindre les échanges entre le sang et le cerveau. Elle contribuerait à l'imperméabilité de la BHE.

Récemment, Higgins (1994), suggère l'intervention de la P-glycoprotéine exprimée dans les tissus sains, dans le transport des lipides au travers des membranes cellulaires. Ce même rôle est décrit pour une protéine codée par le gène mdr 2. Cette protéine a 90% d'homologie avec la P-glycoprotéine. Elle n'est pas responsable du phénotype MDR, mais elle est impliquée dans le transport des phospholipides au travers des membranes (Ruetz et Gros, 1994) (Fig. 9).



Figure 9 : Différents mécanismes de transport des lipides au travers des membranes. D'après Higgins (1994).

La localisation et la conservation de la structure au cours de l'évolution de la Pglycoprotéine suggère l'importance physiologique de cette protéine. La P-glycoprotéine dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux empêche les anticancéreux de pénétrer dans le cerveau. Cette propriété pourrait être une dérivative de son rôle physiologique, celui de réguler le transport des lipides au travers de la BHE.

### 1.1.4 Conclusion

La présence de jonctions serrées, la rareté des vésicules de pinocytose et l'absence de fenestration empêchent tous phénomènes de diffusion non spécifiques au travers de l'endohélium cérébral. De plus, l'existence de protéines capables de reconnaître, puis de dégrader ou d'expulser certaines molécules entrées dans la cellule endothéliale, permet de restreindre activement les échanges entre le sang et le cerveau. Cependant, malgré ses importantes capacités de synthèse, le cerveau ne peut être autonome ; les échanges entre le compartiment sanguin et le compartiment cérébral sont indispensables au bon fonctionnement du système nerveux central. Ces échanges s'effectuent au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux.

Comme nous l'avons vu précédemment, la présence de jonctions serrées élimine l'espace paracellulaire et empêche tout passage entre les cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

Pour passer du sang à l'espace extracellulaire cérébral, une substance doit donc franchir successivement la membrane luminale, le cytoplasme et la membrane abluminale de la cellule endothéliale.

### **1.2 Processus de transport à travers la BHE**

### 1.2.1 Les différents processus de transport aux travers de la BHE

Le CO<sub>2</sub>, l'O<sub>2</sub> ainsi que les substances très liposolubles, telles que la nicotine, l'éthanol, l'héroïne, traversent très facilement la BHE. Seul un gradient de concentration de la molécule de part et d'autre de la membrane est nécessaire au franchissement de l'endothélium cérébral.

Au contraire, le transport des substances peu liposolubles et de haut poids moléculaire nécessite le plus souvent un transporteur protéique.

Deux modes de transport sont décrits utilisant,

- soit <u>des transporteurs protéiques</u> : c'est le cas des protéines qui permettent le passage du glucose, des ions et des acides aminés de part et d'autre de la BHE. Enchassées dans la membrane de la cellule endothéliale, elles facilitent les échanges entre le sang et le cerveau ou participent activement au transport des molécules au travers de la BHE. Ces transporteurs peuvent être multiples. Leur répartition est diverse : ils se trouvent face luminale et/ou face abluminale de l'endothélium cérébral.

- soit <u>les voies du trafic intracellulaire</u> : c'est le cas du transport des protéines et des peptides (tels que la transferrine, l'insuline, l' IGF) et des lipoprotéines. Ce transport est décrit sous le nom de transcytose médié via un récepteur. Celle-ci se déroule en trois étapes :

\* l'endocytose : elle s'effectue après fixation de la molécule à un récepteur spécifique situé dans la membrane plasmique. Le complexe molécule-récepteur est endocytosé.

\* transport du complexe à travers le cytoplasme : le complexe moléculerécepteur est véhiculé dans le cytoplasme dans une vésicule. Différentes étapes peuvent être nécessaires au cours de la traversée, notamment le passage au niveau du Golgi et/ou du compartiment endosomal et/ou lysosomal.

\* l'exocytose : la vésicule ayant traversé le cytoplasme, se trouve côté abluminal de la cellule endothéliale. La membrane de la vésicule fusionne avec celle de la cellule et la molécule est relachée dans le parenchyme cérébral.

La transcytose est spécifique (la substance est reconnue spécifiquement par un récepteur) et saturable (dépendant du nombre de récepteurs fonctionnels à la surface des cellules endothéliales). Si plusieurs molécules reconnaissent un même récepteur, elles seront en compétition lors du transport. Plus l'affinité de la substance pour le récepteur sera élevée, plus le transport sera important.

Pour beaucoup de peptides, ces trois étapes sont hypothétiques. Seuls sont décrits, la présence du récepteur au niveau de l'endothélium cérébral, l'endocytose de la molécule et la présence dans le cerveau de la molécule injectée par voie intraveineuse. La traversée du cytoplasme, l'exocytose ainsi que le devenir du récepteur restent inconnus.

## 1.2.2 Transport des ions, du glucose, des acides aminés

### 1.2.2.1 Transport des ions



Figure 10 : Transport des ions au travers de la barrière hémato-encéphalique. D'après Golstein et Betz (1983).

### 1.2.2.1.1 Potassium

Les ions potassium jouent un rôle très important dans la transmission de l'influx nerveux. Leur concentration dans le liquide interstitiel cérébral est maintenue à 2,8 mM (Bradbury et Kleeman, 1967), alors qu'elle peut varier de 3 à 5 mM dans le sang. Le transport du potassium du cerveau vers le sang est donc plus important que le transport dans le sens sang-cerveau. Bradbury et Stulcova (1970) montrent que l'efflux de potassium se fait par un système de transport saturable dont le Km est environ 3mM. Le transport est inhibé par l'ouabaïne. Ceci suggère l'intervention d'un transport actif et donc d'une ATPase Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> dépendante. Puisque le passage du potassium, du sang au cerveau, est très faible (Hansen et al., 1977), l'ATPase serait localisée sur la face abluminale des cellules endothéliales (Fig. 10). Goldstein (1979), Einsenberg et Suddith (1979) mettent en évidence cette enzyme. Sa distribution dans les membranes luminales et abluminales est asymétrique (Betz et al., 1980). Cependant, elle n'est pas complétement absente dans la membrane luminale (Vorbrodt et al., 1982) où son activité est plus faible (Spatz, 1984). Une fois dans la cellule endothéliale, les ions potassium peuvent atteindre le compartiment sanguin grâce à des canaux potassiques sensibles à l'amiloride, décrits par Vigne et al. (1989).

Un autre transporteur, différent de l'ATPase Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> dépendante, interviendrait dans le transport des ions potassium au travers de la BHE : il s'agit du cotransporteur des ions Na<sup>+</sup>- K<sup>+</sup>- Cl<sup>-</sup>, récemment mis en évidence au niveau de cellules endothéliales de capillaires cérébraux mises en culture (Vigne et al., 1994). Ce transporteur, comme l'ATPase Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> dépendante, permettrait le transport des ions potassium du cerveau au cytoplasme des cellules endothéliales (Fig. 11).



# Figure 11 : Modèle de transport des ions potassiums au travers de la BHE. D'après Vigne et al. (1994).

### 1.2.2.1.2 Sodium et chlore

Il existe deux systèmes de transport du sodium sur la face luminale des cellules endothéliales (Betz, 1983). Le premier, inhibé par l'amiloride, est probablement équivalent aux canaux sodiques des cellules épithéliales. Le second, inhibé par le furoméside, est un cotransporteur Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>. Par ces deux systèmes, le sodium pénètre de la lumière du capillaire dans la cellule endothéliale suivant un gradient de concentration (Fig. 10). Le sodium intracellulaire est extrait de la cellule endothéliale dans le liquide interstitiel cérébral contre un gradient de concentration par l'ATPase Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>
dépendante. L'anion chlore permet de maintenir la neutralité (Smith et Rapoport, 1984) tandis que l'eau suit le flux net de NaCl du sang vers le cerveau et maintient l'isotonocité.

#### 1.2.2.2 Transport du glucose

En 1965, Crone est le premier à émettre l'hypothèse d'un transport facilité du glucose à travers la BHE. Depuis, de nombreux travaux confirment la présence d'un transfert saturable, stéréospécifique et non-actif du glucose à travers l'endothélium cérébral.

Ainsi, le glucose traverse la cellule suivant le gradient de concentration créé par l'oxydation de ce substrat par les cellules nerveuses. La mesure des constantes cinétiques donne pour le Km, des valeurs allant de 5 à 9 mM, c'est-à-dire proche de la concentration plasmatique en glucose (Lund -Andersen, 1979). Cremer et al. (1981) calculent que 65% du glucose est renouvelé chaque minute. Le chiffre explique la mauvaise tolérance cérébrale à l'hypoglycémie.



Figure 12 : Transport et métabolisme du glucose au niveau de la barrière hématoencéphalique. (G) glucose, (GT-1) transporteur du glucose de type 1, (G-6P) glucose 6-phosphatase, (HK) hexokinase, (ISF) fluide interstitiel, (GT-X) différents transporteurs du glucose au niveau des neurones et des astrocytes. D'après Pardridge (1993).

La protéine impliquée dans le transport facilité apparaît être le transporteur de type 1, Glut 1, déjà décrit sur les érythrocytes humains (Birnbaum et al., 1986). Ces transporteurs existent sur les faces luminales et abluminales (Betz et al., 1979) des cellules endothéliales. Leurs répartitions semblent asymétriques (Fig. 12). Le nombre de transporteurs face abluminale est supérieur à celui trouvé face luminale (Farrel et Pardridge, 1991 ; Pardridge et al., 1990a). Le glucose ayant traversé la face luminale de la cellule, sera vite dirigé vers les neurones et les cellules gliales grâce aux transporteurs abluminaux. En effet, les cellules endothéliales ne consomment qu'une très faible partie du glucose qu'elles transportent. Elles utilisent préférentiellement les acides gras et les corps cétoniques comme source d'énergie (Betz et Goldstein, 1981). Leur rôle est donc de transférer ce glucose au système nerveux central.

Le taux de mRNA codant pour la protéine Glut 1 au niveau des capillaires cérébraux (Boado et Pardridge 1991, 1993), ainsi que le transport du glucose à travers la BHE (Harik et La Manna, 1988 ; Duckrow, 1988 ; Pardridge et al., 1990), varient suivant la glycémie plasmatique. L'expression du transporteur du glucose au niveau des cellules endothéliales est augmentée après incubation en présence d'un homogénat de cerveau, indiquant que des facteurs dérivant du cerveau sont aussi responsables de l'expression du transporteur du glucose au niveau des le BHE (Boado et Pardridge 1993).



## 1.2.2.3 Transport des acides aminés (Fig. 13)

Figure 13 : Transport du glucose et des acides aminés (système-L et système-A). D'après Golstein et Betz (1986).

Le passage des acides aminés neutres à travers la BHE met en jeu trois principaux systèmes de transport (Christensen 1975) :

- système A ; - système ASC ; - système L

- Le système A (alanine), découvert par Betz et Goldstein (1978) est décrit comme un système de transport des petits acides aminés neutres. Situé face abluminale des cellules endothéliales, il transporte les petits acides aminés neutres du cerveau vers le sang ceci contre un gradient de concentration : il nécessite donc de l'énergie.

L'énergie provient du déplacement des ions sodium selon un gradient de concentration du cerveau dans les cellules endothéliales. Le système A est donc un système sodium dépendant. Il est absent des membranes luminales des cellules endothéliales. C'est un transport asymétrique. Il permet aussi le passage de la glycine du cerveau au sang. La glycine est un neuromédiateur inhibiteur de l'activité neuronale. Sa concentration autour des cellules nerveuses doit rester inférieure à sa concentration sanguine.

- Le système ASC (alanine, sérine, cystéine) est un autre système de transport des acides aminés neutres. Il se trouve face abluminale de la cellule endothéliale (Tayarani et al. 1987 ; Wade et Brady 1981). C'est un système sodium dépendant. Il semble être associé comme le système A, à l' Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase (Betz et al., 1980).

- Système L (leucine) : il permet le transport des grands acides aminés neutres, tels que les acides aminés essentiels : phenylalanine, leucine, isoleucine, méthionine, histidine, tyrosine, tryptophane et les précurseurs des neuro-transmetteurs (DOPA et  $\alpha$ -hydroxytryptophane).

Comme il n'y a qu'un seul récepteur pour un grand nombre d'acides aminés, il existe une compétition entre toutes ces substances. Ainsi l'influx cérébral d'un acide aminé est déterminé par sa concentration plasmatique, son affinité pour le transporteur, mais aussi par la concentration plasmatique et l'affinité pour ce même transporteur des autres acides aminés neutres (Pardridge 1977). Chez les malades atteints de phénylcétonurie, l'accumulation dans la circulation sanguine de phénylalanine limite, par compétition, le transport des autres acides aminés par le système L, provoquant une grave carence chez les jeunes enfants.

Ce système est présent, non seulement sur la face luminale des cellules endothéliales, mais aussi sur leur face abluminale, de sorte que les gros acides aminés neutres traversent la cellule endothéliale (Fig. 13). Betz et Goldstein (1978) ont montré que le système L est aussi actif dans le sens cerveau-sang. Le système L est un transport symétrique. De plus, Orlowski et Meister (1970) suggère l'intervention de la  $\gamma$ -GT dans le transport des acides aminés. Au niveau de l'épithélium du tube proximal du rein, elle se situe principalement sur la face abluminale, proche des sites où est décrit le transport des acides aminés.

#### Conclusion :

De nombreuses protéines impliquées dans le transport au travers de la BHE ne sont pas isolées et caractérisées. Seule la cinétique du transport est connue.

La répartition asymétrique des transporteurs face luminale et abluminale, ainsi que l'inhibition de nombreux processus par l'ouabaïne relate l'importance des échanges entre le sang et le cerveau et permet de comprendre l'importance des mitochondries dans la cellule endothéliale cérébrale.

## 1.2.3 Transport des peptides et des lipoprotéines

## 1.2.3.1 Transferrine

La transferrine est une protéine de poids moléculaire 80 kDa qui transporte le fer dans le sang. Le fer joue un rôle important dans le métabolisme cellulaire. Pour atteindre le cerveau, il doit traverser la BHE.

En 1984, Jefferies et al. mettent en évidence chez l'homme et le rat la présence d'un récepteur spécifique à la transferrine au niveau des capillaires cérébraux. L'expression élevée de ce récepteur sur l'arbre vasculaire cérébral comparée aux autres organes (excepté le foie), évoque son intervention dans le transport du fer à travers la BHE. La transferrine permettrait le passage du fer du sang vers le cerveau. Cependant, le transport de la transferrine au travers de la BHE est discuté (Fig. 14).

Certains auteurs n'observent pas de corrélation entre le transport du fer et celui de la transferrine au travers de la BHE (Taylor et al., 1991 ; Morris et al., 1992 ; Banks et al., 1988). La séparation fer-transferrine se ferait dans la cellule endothéliale et seul le fer serait libéré dans le cerveau, la transferrine serait recyclée vers le sang (Taylor et al., 1991). D'autres auteurs montrent au contraire le passage de la transferrine au travers de la BHE. Après injection carotidienne de la transferrine marquée, Fishman et al. (1987), observent la présence de cette molécule dans le parenchyme cérébral. Pardridge et al. (1991a), Friden et al. (1991) utilisent un anticorps monoclonal spécifique du récepteur de la transferrine (OX26) couplé à des molécules biologiquement actives (NGF, méthotrexate) et montrent qu'après injection dans la circulation sanguine, ces molécules et l'anticorps sont retrouvés dans le cerveau.



Figure 14 : Hypothèses de transport de la transferrine au travers de la barrière hématoencéphalique.

Des travaux, effectués in vitro, confirment le passage de la transferrine à travers la BHE. Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux en culture fixent et internalisent spécifiquement la transferrine (Raub et Newton, 1991 ; Descamps et al., 1994, soumis). La transferrine doublement marquée, déposée face luminale des cellules endothéliales est internalisée spécifiquement, puis libérée en partie (Raub et Newton, 1991) ou principalement (Descamps et al., 1994, soumis) côté abluminal. Ces travaux montrent que le complexe fer-transferrine traverse la BHE. De plus, Descamps et al., observent que pour deux atomes de fer retrouvés dans le compartiment abluminal, une molécule de transferrine est aussi retrouvée, démontrant que les deux molécules de fer fixées à une molécule de transferrine traversent la BHE sous forme d'un complexe fer-transferrine.

#### 1.2.3.2 Facteurs de croissance "insulin-like" (IGF-I et IGF-II)

IGF-I et IGF-II sont des polypeptides d'environ 7 000 Daltons, de structure voisine de celle de l'insuline. Ces facteurs de croissance sont présents dans le sang et le cerveau. Leur rôle au niveau du parenchyme cérébral n'est pas encore tout à fait défini.

Ils interviendraient lors du développement du cerveau. En effet, dans certains cas de déficience mentale (Syndrome de Down), le taux des facteurs de croissance "insulinelike" est faible (Sara et al., 1981). La présence de mRNA codant pour les peptides IGF-I (Werther et al., 1990) et IGF-II (Tseng et al., 1989) au niveau du cerveau, indique une synthèse de novo de ces facteurs de croissance. La synthèse de l'IGF-II au niveau des plexus choroïdes expliquerait la présence de ce peptide dans le LCR (Tseng et al., 1989). Cependant Frank et al. (1986), montrent une fixation spécifique ainsi qu'une internalisation de l'IGF-I et l'IGF-II au niveau des capillaires cérébraux, l'internalisation étant plus importante pour l'IGF-II. Ces travaux évoquent le transport de l'IGF-I et l'IGF-II et l'IGF-II et de l'IGF-II au travers de la BHE.

Chez le rat et le boeuf, les récepteurs décrits au niveau des capillaires cérébraux sont les récepteurs de type I et II déjà décrits dans le reste de l'organisme (Rosenfeld et al., 1987). Chez l'homme, les études de fixation montrent l'existence d'un seul récepteur ayant une grande affinité pour les deux types d'IGF (Duffy et al., 1988). Ce récepteur a été initialement décrit au niveau du placenta (Casella et al., 1986).

#### 1.2.3.3 Insuline

Van Houten et Posner (1979), Frank et Pardridge (1981) mettent en évidence des récepteurs à l'insuline sur les faces luminales et abluminales des capillaires cérébraux (Fig. 15). L'hypothèse est alors faite que ce récepteur ferait partie d'un système de transport hémato-encéphalique. Ce modèle pourrait être analogue au modèle de transcytose décrit par Bar et al. (1983) pour les capillaires non cérébraux. Pardridge et al. (1985), Duffy et al. (1986) montrent que l'insuline traverse la BHE par transcytose. Après formation d'un complexe insuline-récepteur, l'insuline est endocytée face luminale et sort par exocytose de la même manière.



Figure 15 : Transcytose de l'insuline au travers de la barrière hémato-encéphalique. D'après Pardridge (1986).

L'insuline ne modifie pas le transport du glucose à travers la BHE (Lund-Andersen, 1979). L'insuline jouerait un rôle dans le développement du cerveau et la maturation des neurones (Sara et al., 1983 ; Puro et Agardh, 1984). Cette hypothèse expliquerait pourquoi les taux d'insuline dans le cerveau sont plus élevés chez le nouveau-né que chez l'adulte et que le nombre de récepteurs est trois fois plus important dans les capillaires de nouveaux-nés (Frank et al., 1985). Une déficience du récepteur à l'insuline chez les enfants s'accompagne toujours d'un retard mental (Pardridge, 1986).

## 1.2 3.4 Lipoprotéines

En 1989, Méresse et al. montrent l'existence d'un récepteur apo(B,E) au niveau des capillaires cérébraux. Ce récepteur diffère du récepteur "scavenger" qui lie les LDL modifiées. L'expression du récepteur apo(B,E) est spécifique de l'endothélium cérébral. En effet, au niveau de l'endothélium des autres organes, l'expression de ce récepteur est inhibée par la présence dans le plasma de LDL et par la confluence des cellules endothéliales (Kenagy et al., 1984).

Le récepteur aux LDL, isolé à partir de capillaires cérébraux, présente les mêmes caractéristiques que le récepteur apo(B,E) des fibroblastes humains (Méresse et al., 1989). Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux mises en culture, fixent, internalisent les LDL via le récepteur apo(B,E) exprimé à leur surface. Ces résultats sont en accord avec ceux de Brightman (1989) qui montre en microscopie électronique que les LDL marquées à l'or colloïdal sont endocytées par les cellules endothéliales in vivo. In vitro, les LDL internalisées ne sont pas dégradées, indiquant que la cellule endothéliale n'utilise pas les lipides portés par la lipoprotéine. Elle aurait pour rôle, grâce au récepteur apo(B,E), de transférer les LDL plasmatiques dans le cerveau.

Vlodavsky et al. (1978) ainsi que Voyta est al. (1984) montrent que la fixation et l'internalisation des LDL acétylées est une caractéristique des cellules endothéliales in vivo. Depuis, de nombreux auteurs utilisent les LDL acétylées comme marqueur endothélial dans les études de la BHE in vitro.

Martin-Nizard et al. (1989) suggèrent l'existence d'un site de fixation spécifique des HDL.

## 1.2.4 Conclusion

L'endothélium des capillaires cérébraux présente des propriétés différentes de l'endothélium des autres organes. Ces caractéristiques structurales et biochimiques permettent de réduire les phénomènes de diffusion non spécifiques et d'établir des processus de transports spécifiques au travers de la BHE.

Des études in vivo montrent que la mise en place des propriétés spécifiques de la BHE est en relation avec le développement de l'environnement cérébral. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés, dans le prochain chapitre, à l'induction des propriétés de la BHE par l'environnement cérébral et plus principalement par les astrocytes proches voisins des cellules endothéliales.

## 2. INDUCTION DES PROPRIETES DE LA BHE

# 2.1 Influence de l'environnement sur les propriétés structurales et métaboliques des capillaires cérébraux

Svendgaard et al. (1975) sont les premiers à montrer que le parenchyme cérébral est à l'origine de la barrière métabolique dans les capillaires cérébraux. Ils réalisent une transplantation de tissu cérébral dans la chambre antérieure de l'oeil. Les capillaires de l'iris vascularisent le greffon cérébral et présentent alors les activités MAO et DOPAdécarboxylase caractéristiques de la BHE et absentes normalement dans les capillaires de l'iris. Tandis que dans un fragment d'iris transplanté dans le cerveau et revascularisé par des capillaires d'origine cérébrale, la MAO et la DOPA-décarboxydase disparaissent. Ces deux expériences montrent que c'est le milieu environnant et non l'origine des capillaires, qui induit les caractéristiques de la BHE.

Stewart et Wiley (1981) réalisent des transplantations entre la caille et le poulet et étudient d'autres propriétés de la BHE : l'imperméabilité des capillaires cérébraux, la présence de phosphatase alcaline et de cholinestérase. Les cellules endothéliales des capillaires de caille et de poulet peuvent être distinguées par une différence morphologique au niveau du nucléole, ce qui permet de connaître avec certitude l'origine des capillaires qui envahissent le greffon. Un fragment de tissu cérébral de caille âgée de trois jours et non encore vascularisé, est transplanté dans la cavité coelomique de poulets embryonnaires (Fig. 16). Les cellules endothéliales de poulet qui envahissent le greffon cérébral présentent des jonctions serrées, des activités phosphatase alcaline et cholinestérase. Au contraire, les vaisseaux du cerveau de poulet qui vascularisent le greffon de tissu mésodermique de caille sont dépourvus des propriétés de la BHE.



Figure 16 : Résumé des expériences de transplantations réalisées par Stewart et Wiley (1981).

Risau et al. (1986) montrent, par des expériences de greffes, la réinduction de la glycoprotéine HT7. Cette glycoprotéine est spécifique des cellules endothéliales de capillaires cérébraux qui constituent la BHE. Elle est absente des capillaires des régions du cerveau n'ayant pas de BHE (contrairement à la  $\gamma$ -GT présente dans l'endothélium des plexus choroïdes). Cette protéine pourrait participer à des processus de transports par endocytose et jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire (Seulberger, 1990). Albrecht et al. (1990) montrent que cette protéine HT7 et le transporteur du glucose ne sont exprimés que dans les cellules présentant des jonctions serrées (BHE ; épithélia des plexus choroïdes). La neurothéline étudiée par Schosshauer et Herzog (1990) est identique à la glycoprotéine HT7.

Ces expériences confirment l'importance de l'environnement cérébral dans le développement de la BHE. Cependant, elles ne permettent pas de connaître avec certitude quelles cellules dans le système nerveux central sont responsables de l'induction des propriétés de la BHE. Les astrocytes dont les prolongements pédiculés entourent les capillaires sont les mieux placés.

## 2.2 Situation stratégique des astrocytes

Les astrocytes constituent la moitié de la population des cellules gliales (l'autre moitié étant constituée par les oligodentrocytes et la microglie). Deux types d'astrocytes sont décrits : les astrocytes fibrillaires situés principalement dans la substance blanche et les astrocytes protoplasmiques situés dans la matière grise. Cette classification est basée, au départ, sur des différences anatomiques. Des différences fonctionnelles sont observées depuis peu de temps (Wilkin et al., 1990). Les astrocytes protoplasmiques sont généralement en contact avec les capillaires cérébraux. Leurs prolongements pédiculés forment une gaine autour de la membrane basale des cellules endothéliales des capillaires cérébraux (Fig. 17). Les prolongements des astrocytes entourent aussi les synapses, forment les couches sous-piales et sous-épendymaires (Fig. 18). Ils couvrent toutes les surfaces libres des neurones (surfaces non couvertes par d'autres neurones ou par les prolongements des oligodentrocytes). Les astrocytes sont reliés entre eux par des jonctions de type "gap" (Peter et al., 1976) permettant des échanges d'ions et de métabolites entre ces cellules.



Figure 17 : Prolongement pédiculés des astrocytes (1) formant un manchon autour des capillaires cérébraux (2). D'après Ganong (1989).

Les contacts qu'ils établissent avec de nombreuses surfaces font penser qu'ils occupent une situation stratégique. Que connaît-on de leurs fonctions ?



Figure 18 : Situation stratégique et rôle des astrocytes dans le maintien d'un environnement adéquat au fonctionnement des neurones. (BM) membrane basale, (CAP) capillaire cérébral, (GLIAL FIL) filaments gliaux, (SYN) synapse, (NT) neurotransmetteur, (METAB) métabolisme, (CSF) liquide céphalo-rachidien, (Pia) Pie-mère, (AsP) prolongements astrocytaires, (GAP) jonctions de type "gap", (CA) anhydrase carbonique. D'après Kimelberg (1983).

Les astrocytes maintiennent le pH du liquide extracellulaire cérébrale en prélevant le CO<sub>2</sub> provenant du métabolisme des neurones (Kimelberg et al., 1979), (Fig. 18). Ils éliminent l'excés d'ions potassium libérés dans l'espace extracellulaire au cours de l'activité neuronale (Pour revue, voir Kimelberg, 1983). Au niveau des synapses, ils inactivent les neurotransmetteurs libérés en les prélevant et en les métabolisant (Varon et Somjen, 1979). Les astrocytes assurent ainsi aux neurones un environnement adéquat. Ces cellules interviennent également lors du développement cérébral, en guidant la migration des neurones au cours du développement embryonnaire et en libérant de nombreux facteurs de croissance des neurones.

Les astrocytes possèdent des récepteurs de la plupart des neuromédiateurs, mais leur rôle est encore inconnu (Kimelberg et Norenberg, 1989).

## 2.3 Influence des astrocytes sur les propriétés de la BHE

Le rôle des astrocytes dans l'induction des propriétés de la BHE a été envisagé par un certain nombre d'auteurs. Delorme et al. (1968), Wolff et Bär (1972) observent que l'établissement de la BHE au cours du développement, coïncide avec la formation des "manchons astrocytaires" et de la membrane basale autour des capillaires cérébraux. Depuis, de nombreuses expériences réalisées "in vivo" et "in vitro" renforcent l'hypothèse que les astrocytes participent à l'induction de la BHE.

#### 2.3.1 Etudes in vivo

Janzer et Raff (1987) injectent une suspension d'astrocytes de type I (qui, d'après Miller et Raff (1984), correspondent aux astrocytes protoplasmiques) dans la chambre antérieure d'un oeil de rat adulte. Ces astrocytes forment, à la surface de l'iris, des agrégats vascularisés en quarante-huit heures. Deux semaines après l'injection des astrocytes, une solution de bleu Evans est administrée par voie intraveineuse. Tous les organes se colorent alors en bleu, tandis que les agrégats restent blancs, suggérant la présence de jonctions serrées dans les capillaires et les veinules qui vascularisent les agrégats astrocytaires.

Si des cellules provenant des méninges sont injectées à la place des astrocytes, celles-ci forment aussi des agrégats vascularisés à la surface de l'iris, mais se colorent lors de l'administration du bleu Evans. Les capillaires et les veinules sont cette fois-ci perméables. Des coupes réalisées dans les agrégats astrocytaires montrent que les capillaires sont entourés de pieds astrocytaires.

Après une lésion créée par le froid, détruisant les microvaisseaux cérébraux, les cellules endothéliales se divisent et colonisent la lésion afin de recréer la confluence. Cette régénération de l'endothélium précède la formation du manchon astrocytaire. Cancilla et al. (1990) observent que les cellules endothéliales nouvellement formées n'expriment pas la  $\gamma$ -GT. Ils expliquent ceci, par le fait que ces cellules ne sont pas en contact avec les astrocytes et en concluent que seul l'endothélium associé aux astrocytes exprime la  $\gamma$ -GT.

## Ces expériences précisent l'origine astrocytaire de l'induction des propriétés de l'endothélium cérébral.

Quelle est la nature de ce signal d'induction, une substance diffusible ou un contact cellulaire ? Est-il produit par les astrocytes isolés ou par les astrocytes seulement lorsqu'ils sont en présence de cellules endothéliales ? ceci reste à déterminer.

Les études réalisées in vitro vont permettre d'apporter certains éléments de réponses.

#### 2.3.2 Etudes in vitro

Les études in vitro sont effectuées sur des cellules endothéliales de capillaires cérébraux mises en culture. Ces cellules, isolées de leur environnement cérébral, perdent certaines de leurs caractéristiques et notamment la présence de jonctions serrées.

L'influence des astrocytes sur les propriétés de la BHE est étudiée après incubation des cellules endothéliales dans du milieu conditionné par les astrocytes ou après coculture des deux types cellulaires.

## 2.3.2.1 Milieu conditionné par les astrocytes

Le milieu conditionné par les astrocytes est en fait leur milieu de culture. Il contient tous les facteurs sécrétés par ces cellules.

L'influence du milieu conditionné par les astrocytes est étudié sur l'expression des jonction serrées et le métabolisme des cellules endothéliales.

#### 2.3.2.1.1 Induction des jonctions serrées

Arthur et al. (1987) constatent la disparition des jonctions serrées dans les cultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux, à partir du quatrième passage. Ils les réinduisent en faisant pousser les cellules endothéliales sur une matrice extracellulaire

produite par des cellules endothéliales (Extracell, laboratoires Cedarlane) et en ajoutant à leur milieu de culture du milieu conditionné par les astrocytes. L'utilisation de milieu conditionné seul n'est pas suffisant pour permettre l'apparition de nouvelles jonctions serrées, la matrice est absolument nécessaire. Arthur et al (1987) montrent que le profil en cryofacture, des cellules endothéliales cultivées sur plastique en présence de milieu conditionné par les astrocytes, est similaire à celui décrit lors de la néogénèse des jonctions serrées (Shivers et al., 1984).

Rutten et al. (1987) étudient l'effet du milieu conditionné par des astrocytes sur des cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux ensemencées sur un gel de collagène. La résistance électrique de la monocouche de cellules endothéliales s'élève de  $157,4\pm4,5$   $\Omega.cm^2$ , sans milieu conditonné, à 783,2  $\pm$  7  $\Omega.cm^2$  en milieu conditionné. La monocouche ayant une résistance élevée présente en microscopie électronique des jonctions serrées.

Pardridge et al. (1990b) étudient l'effet du milieu conditionné par les astrocytes de souris sur le passage du saccharose au travers d'une monocouche de cellules endothéliales de capillaires cérébraux de bœuf. Cette molécule de faible poids moléculaire diffuse entre les cellules endothéliales.

Les cellules endothéliales sont ensemencées sur une membrane recouverte de vitrogène et de fibronectine humaine. Après 12 à 14 jours de culture dans du milieu contenant 10% de sérum de cheval, le filtre est intégré dans une chambre de diffusion. La perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales pour le saccharose (PSe) est calculée suivant la formule décrite par van Bree et al.(1988) et Martin et al. (1983) :

1/PSe = 1/PSt - 1/PSf

où PSf est la perméabilité du filtre pour le saccharose, effectuée sur un filtre sans cellule et PSt la perméabilité totale : perméabilité du filtre et de la monocouche de cellules endothéliales. Pardridge et al. (1990b) montrent que la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales de capillaires cérébraux pour le saccharose est diminuée de 30%, après une incubation de 72 heures en présence de milieu conditionné par les astrocytes. Ce phénomène serait associé à une différenciation des jonctions serrées entre les cellules endothéliales en présence de milieu conditionné par les astrocytes.

Rubin et al. (1991) étudient l'effet du milieu conditionné par les astrocytes sur la résistance électrique d'une monocouche de cellules endothéliales de capillaires cérébraux de bœuf. Ces cellules sont dès leur isolement incubées en présence ou non de milieu conditionné par les astrocytes. Ce milieu conditionné est obtenu à partir d'astrocytes matures (isolés depuis 3 à 4 semaines) incubés pendant 48 heures dans du milieu frais. Il

est ensuite ajouté au milieu de culture des cellules endothéliales (1 volume de milieu conditionné pour 1 volume de milieu de culture).

Les mesures de résistance électrique sont effectuées sur une monocouche de cellules endothéliales cultivées sur filtre. Ces filtres sont préalablement recouverts de collagène et de fibronectine.

En présence de milieu conditionné par les astrocytes, ils observent une faible augmentation de la résistance électrique (contrôle :  $61 \pm 2 \Omega.cm^2$ , + milieu conditionné :  $115 \pm 11 \Omega.cm^2$ ).

Cependant lorsque le milieu de culture est additionné de milieu conditionné et d'une forte concentration d'AMPc la résistance électrique s'élève à  $625 \pm 82 \ \Omega.cm^2$ . Ils comparent ces résultats aux effets du milieu conditionné seul ( $115 \pm 11 \ \Omega.cm^2$ ) et de l'AMPc seul ( $305 \pm 50 \ \Omega.cm^2$ ).

Ils en déduisent qu'il existe un effet cumultatif du milieu conditionné par ces astrocytes et de l'AMPc. L'AMPc jouerait le rôle de second messager démontrant l'importance de la phosphorylation de certaines protéines associées aux jonctions serrées dans l'imperméabilité de la BHE (Rubin et al 1991).

L'élévation de la résistance électrique est accompagnée d'une diminution de la perméabilité au saccharose de la monocouche de cellules endothéliales.

Lors de l'apparition de jonctions serrées de nombreux changements morphologiques au niveau des cellules endothéliales apparaissent. Rubin et al. (1991) étudient l'organisation de l'actine filamenteuse (F-actine) marquée à la rhodamine phalloïdine au niveau des cellules endothéliales mises en culture. L'augmentation de la résistance électrique est associée à la redistribution de la F-actine. En l'absence de jonctions serrées, la F-actine est diffuse et répartie dans tout le cytoplasme de la cellule endothéliale. Après traitement en présence de milieu conditionné par les astrocytes et de forte concentration d'AMPc, la F-actine est localisée principalement au niveau de la membrane plasmique. Le marquage au niveau du cytoplasme est nettement atténué.

Dans ces expériences la présence du milieu conditionné par les astrocytes n'est pas suffisante, mais est indispensable à la redistribution de la F-actine.

Le facteur sécrété par les astrocytes n'a pas été isolé. Son activité est sensible à la température.

Wolburg et al. (1994) étudient les jonctions serrées en cryofacture. Ils définissent un indice de complexité (CI : Complexity Index) proportionnel au nombre d'interconnections des stries formées par les jonctions serrées en cryofacture. De même ils s'intéressent au nombre de particules associées au feuillet membranaire côté cytoplasmique (PFA : Plasmatic Face Association) après cryofracture. Ces deux facteurs (CI et PFA), élevés dans les capillaires cérébraux, diminuent dans les cellules endothéliales mises en culture. Le CI et PFA augmentent lorsque les cellules endothéliales sont cultivées en présence de milieu conditionné par les astrocytes et de forskoline (induisant une forte élévation d'AMPc). Dans ces mêmes conditions, Wolburg et al. (1994) observent une augmentation de la résistance électrique, ainsi qu'une diminution de la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales pour l'inuline.

Si le milieu conditionné par les astrocytes seul n'influe que très peu sur l'expression des jonctions serrées, il permet cependant d'augmenter considérablement l'effet de la forskoline sur la résistance électrique et l'imperméabilité à l'inuline de la monocouche de cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

Ces travaux montrent que les astrocytes sécrètent un ou des facteur(s) influençant l'expression des jonctions serrées. Cependant, in vitro, l'utilisation de milieu conditionné par les astrocytes est indispensable mais non suffisante pour permettre l'apparition de nouvelles jonctions serrées. D'autres facteurs interviendraient donc dans la mise en place des jonctions serrées.

2.3.2.1.2 Induction des propriétés métaboliques des cellules endothéliales de capillaires cérébraux

## \* Le transport du glucose

Le transport du glucose du sang au cerveau s'effectue par diffusion facilitée. La protéine impliquée semble être le transporteur de type 1, GLUT 1 (Birnbaum et al., 1986). Maxwell et al. (1989) observent une augmentation de 23% ou 50% de l'internalisation de glucose par les capillaires cérébraux incubés en milieu conditionné par les astrocytes sains ou néoplasiques respectivement. Cet effet est proportionnel au temps d'incubation des capillaires isolés avec le milieu conditionné. Il est inhibé par la présence d'inhibiteurs de synthèse lors de l'obtention du milieu conditionné et par des protéases. Le milieu conditionné par des cellules de muscle lisse ou par des oligodendrocytes n'a pas d'effet sur l'internalisation du glucose par les capillaires cérébraux.

Ces travaux indiquent l'effet spécifique des astrocytes sur l'expression du récepteur au glucose à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

Ces résultats sont confirmés par Boado et Pardridge (1993). Ils montrent une augmentation d'ARNm codant pour le transporteur de glucose au niveau de cellules endothéliales après incubation avec un homogénat de cerveau.

### \* L'activité γ-GT

L'activité  $\gamma$ -GT, présente dans l'endothélium cérébral "in situ", disparaît souvent dans les cellules en culture dès qu'elles migrent ou prolifèrent à partir des capillaires ensemencés (DeBault et al., 1981 ; Diglio et al., 1982 ; Goetz et al., 1985).

L'influence du milieu conditionné par les astrocytes sur l'expression de la  $\gamma$ -GT dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux est discutée.

DeBault et Cancilla (1980) montrent qu'en présence de milieu conditionné par les cellules gliales C6 provenant d'un gliome de rat, l'activité  $\gamma$ -GT n'est pas réinduite. La réinduction de la  $\gamma$ -GT nécessiterait un contact étroit entre les cellules endothéliales et les astrocytes (DeBault, 1981).

Au contraire, Maxwell et al. (1987) montrent que des milieux conditionnés par des cellules C6 ou des cultures primaires d'astrocytes contiennent un (des) facteurs(s) soluble(s) permettant la réinduction de la  $\gamma$ -GT dans les cellules endothéliales "ME-LY". La nature de ce facteur n'est pas identifié.

Ces travaux montrent l'influence de facteurs diffusibles sécrétés par les astrocytes sur l'expression des protéines impliquées dans le métabolisme des cellules endothéliales et le transport au travers de la BHE.

Takemoto et al. (1994) montrent que le milieu conditionné par des cellules gliales humaines induit l'expression de la phosphatase alcaline, enzyme spécifiquement exprimée dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, au niveau de cellules endothéliales d'artère de poumon. Le facteur d'induction sécrété par les cellules gliales serait l'interleukine-6.

Les astrocytes sécrètent des facteurs indispensables à l'établissement des propriétés de la BHE. Cependant le milieu conditionné par les astrocytes est, dans certaines conditions, insuffisant pour le rétablissement des propriétés de la BHE perdues lors de la mise en culture des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Une autre technique est utilisée pour étudier l'influence des astrocytes sur l'endothélium cérébral. Elle consiste en une coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes.

#### 2.3.2.2 Coculture de cellules endothéliales et astrocytes

Les cocultures de cellules endothéliales et d'astrocytes sont établies afin de recréer les conditions décrites in vivo.

#### 2.3.2.2.1 Induction des jonctions serrées

Tao-Cheng et Brightman (1988), Brightman (1989) réalisent des cultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux de boeuf selon la technique de Bowman et al. (1981). Ils réalisent plusieurs passages et constatent que les jonctions serrées deviennent plus rares, courtes et discontinues au fur et à mesure des passages. De nombreuses jonctions de type "gap", absentes in vivo dans les capillaires matures, s'intercalent entre les jonctions serrées ou apparaissent éloignées de celles-ci. Les jonctions de type "gap", étant donné leur grand nombre, ne peuvent être dues à une contamination par des cellules provenant de plus gros vaisseaux. Elles semblent être dues à une adaptation aux conditions in vitro ou à une dédifférenciation. En effet, à certaines périodes du développement cérébral, Delorme et al. (1970, 1972) montrent chez le poulet la présence à la fois de jonctions serrées et de jonctions de type "gap". Ces dernières disparaissent au cours de la maturation.

Tao-Cheng et Brightman (1988) étudient l'influence des astrocytes sur l'expression des jonctions serrées au niveau de l'endothélium cérébral. Ils réalisent une coculture en retournant sur les astrocytes, des lamelles ensemencées de cellules endothéliales (DeBault, 1981) ou en ensemençant les cellules endothéliales directement sur les astrocytes confluents. Lorsque les cellules endothéliales sont cultivées en présence d'astrocytes, les jonctions serrées deviennent plus nombreuses, plus longues, plus larges et plus complexes, les zones de jonctions de type "gap" sont très réduites. Ainsi, les jonctions ressemblent à celles de la BHE mature.

Dehouck et al. (1990) réalisent une coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes de part et d'autre d'un filtre. Pour recréer les conditions physiologiques, les astrocytes se trouvent face abluminale des cellules endothéliales. En présence d'astrocytes, la résistance électrique de la monocouche de cellules endothéliales augmente de 50% (416 ± 57,6  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> sans astrocytes ; 661 ± 48  $\Omega$ .cm<sup>2</sup> avec astrocytes). Cette augmentation est accompagnée d'une diminution de la perméabilité au saccharose et à l'inuline de la monocouche de cellules.

Raub et al. (1992) utilisent des cultures primaires de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux de bœuf. Ils les ensemencent sur des filtres recouverts de

collagène de queue de rats. Après 8 jours, les cellules endothéliales sont confluentes. Le filtre est alors transféré sur une culture de cellules gliales C6. Dans ces conditions, les cellules gliales se trouvent côté abluminal des cellules endothéliales, recréant ainsi la situation décrite in vivo. En coculture, ces auteurs observent une augmentation de 200 à 400 % de la résistance électrique qui coïncide avec une diminution de 50% de la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales au saccharose. Les fibroblastes transformés et les péricytes n'ont aucun effet sur les cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Le ou les facteur(s) responsable(s) de l'induction des propriétés de la BHE serai(en)t sécrété(s) par les cellules C6. Il est sensible à la chaleur et éliminé après filtration (pore de 10 KDa).

Ces travaux montrent qu'en coculture avec des astrocytes les cellules endothéliales présentent des jonctions serrées ressemblant à celles de la BHE mature. L'ajout dans le millieu de culture, de substances telles que l'AMPc, n'apparaît pas nécessaire dans ces conditions.

## 2.3.2.2.2 Induction des propriétés métaboliques des cellules endothéliales de capillaires cérébraux

Beck et al. (1984) réalisent des cocultures de cellules endothéliales ME-2, provenant de capillaires isolés de souris ou ME-LY et de cellules gliales (cellules C6) en les cultivant de part et d'autre de filtres de polycarbonate. Beck et al. (1984) étudient, dans ces conditions, le transport de l'acide méthylaminoisobutyrique qui emprunte le transporteur des petits acides aminés neutres (Système A) présent sur la face abluminale des cellules endothéliales. Ils montrent que l'endothélium cultivé seul n'est pas polarisé. Par contre, en présence de cellules C6, le transport au travers des cellules endothéliales est plus important dans le sens cerveau -> sang que dans le sens inverse : les cellules sont polarisées. Ces travaux confirment les études de Betz et al. (1978, 1980), montrant l'influence des cellules gliales sur le transport des petits acides aminés neutres (Système A).

Beck et al. (1986) étudient la localisation de deux enzymes, la phosphatase alcaline et l'ATPase Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> dépendante. Dans les cellules endothéliales en coculture la distribution de ces enzymes est réinduite dans les membranes basales et apicales. Elles est similaire à celle observée "in vivo", c'est-à-dire apicale pour la phosphatase alcaline et basale pour l'ATPase. DeBault et Cancilla (1980) montrent que la  $\gamma$ -GT peut être induite dans les cellules endothéliales en réalisant des cocultures de cellules endothéliales ME-2 provenant de capillaires isolés de souris et de cellules gliales C6.

Dehouck et al. (1990) montrent que l'activité de la  $\gamma$ -GT est multipliée par douze dans les cellules endothéliales en coculture avec des astrocytes, par rapport à l'activité enzymatique mesurée dans les cellules endothéliales cultivées seules. Cependant, cette activité réinduite ne représente que le dixième de l'activité enzymatique associée aux capillaires cérébraux isolés. Des travaux récents montrent qu'une grande partie de la  $\gamma$ -GT est concentrée dans les péricytes, les cellules endothéliales cérébrales n'ayant qu'une faible activité  $\gamma$ -GT (Risau et al., 1992).

De même, Raub et al. (1992) montrent que la présence de cellules C6 induit une augmentation de 48% de l'activité  $\gamma$ -GT dans les cellules endothéliales de bœuf.

Les études effectuées in vivo et in vitro montrent que les astrocytes sont capables d'induire l'expression de jonctions serrées et de protéines caractéristiques de l'endothélium cérébral. Ainsi ils participent directement à l'élaboration des propriétés de la BHE. Pardridge (1991b) décrit un modèle de régulation de l'expression des protéines spécifiques de la BHE (Fig. 19).



Figure 19 : Modèle d'expression de gènes spécifiques de la barrière hématoencéphalique. Des facteurs dérivant du cerveau, et plus principalement sécrétés par les astrocytes, provoqueraient l'expression des protéines spécifiques de la barrière hémato-encéphalique (BSP), soit en agissant sur des facteurs de transcription (TAF), soit en régulant la traduction des ARNm de ces protéines, ceci à l'aide de facteurs cytosoliques (CF). D'après Pardridge (1991).

La coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes semble recréer les conditions décrites in vivo et établir un endothélium ayant les caractéristiques de la BHE. Au contraire, l'utilisation de milieu conditionné par les astrocytes apparaît parfois insuffisant pour le rétablissement des propriétés de la BHE.

Les études en milieu conditionné par les astrocytes tiennent compte de l'influence des astrocytes sur les cellules endothéliales. L'influence des cellules endothéliales sur les astrocytes n'est-elle pas aussi à considérer ? Cette influence peut avoir lieu lorsque les cellules endothéliales et les astrocytes sont en coculture. Elle expliquerait qu'en coculture les auteurs obtiennent une meilleure induction des caractéristiques de la BHE.

## 2.4 Influence des cellules endothéliales sur les astrocytes

Tao-Cheng et Brightman (1988), Tao-Cheng et al. (1990) observent une influence des cellules endothéliales sur les astrocytes. En présence de cellules endothéliales, les membranes astrocytaires présentent des assemblages de particules très nombreux comparés aux cultures "in solo". En coculture, ces assemblages de particules forment des agrégats ressemblant aux OAPs observés in vivo (Dorovini-Zis et al., 1980 ; Risau et Wolburg, 1990). Dans les astrocytes, ces OAPs présentent la même distribution que celle des sites de conductance au potassium (Wolburg et Berg, 1988) et pourraient jouer un rôle dans l'homéostasie du potassium dans le cerveau.

Estrada et al. (1990) étudient l'effet de milieu conditionné par des cellules endothéliales de capillaires cérébraux sur une culture d'astrocytes isolés de souris nouveau-nés. Ils isolent un facteur de poids moléculaire 50000 Da. Ce facteur est différent du FGF, de la transferrine, de la fibronectine de bœuf et du PDGF. Il stimule la synthèse d'ADN dans les astrocytes et les péricytes, mais n'a pas d'effet sur les oligodendrocytes. Son activité est dépendante de sa concentration et du temps d'incubation en présence des astrocytes. Elle est inhibée par des protéases.

Après une lésion créée par le froid au niveau du cerveau, détruisant les microvaisseaux cérébraux, la régénération de l'endothélium précède la formation du manchon astrocytaire (Cancilla et al., 1990). Une fois rétablis, les capillaires auraient le pouvoir d'attirer les astrocytes pour recréer ce manchon.

Le chimiotactisme des cellules endothéliales envers les astrocytes est confirmé par des études effectuées in vitro. Les cellules endothéliales ensemencées sur gélatine et recouvertes d'une fine couche de vitrogène se réorganisent en "microvaisseaux" (tubelike structure) (Minakawa et al., 1991). Les astrocytes ensemencés au hasard sur cette culture vont préférentiellement migrer et établir un contact avec ces microvaisseaux. Au bout de 24 heures, 71,5% des astrocytes ensemencés interagissent avec les tubes. Ces études ne sont plus valables lorsque les cellules endothéliales sont éparses. Le facteur chimiotactique ne serait sécrété que par les cellules endothéliales formant un vaisseau (Cancilla et al., 1990).

L'influence du milieu conditionné par les astrocytes sur les cellules endothéliales et inversement, l'effet du milieu conditionné par les cellules endothéliales sur les astrocytes, démontre l'existence d'échanges réciproques entre les astrocytes et les cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Ces échanges sont indispensables à l'élaboration des propriétés de la BHE. In vitro, ces échanges existent lors d'une coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes.

## 2.5 Conclusion

La BHE présente des caractéristiques structurales et biochimiques qui restreignent les échanges non spécifiques entre le sang et le cerveau. Le transport au travers de la BHE fait appel à des mécanismes et transporteurs spécifiques. Ainsi la BHE contrôle et régule les échanges entre les compartiments sanguin et cérébral. Ces propriétés sont induites par l'environnement cérébral et résultent d'échanges réciproques entre les cellules endothéliales de capillaires cérébraux et les astrocytes.

Cependant, si le passage à travers la BHE de certaines molécules telles que les acides aminés et le glucose sont bien connus, les modalités de transport des lipides reste à déterminer.

Que sait-on du passage des lipides vers le cerveau ?

## **3 CERVEAU, LIPIDES ET LIPOPROTEINES**

Exception faite des tissus adipeux, le cerveau est l'organe qui présente la plus forte concentration en lipides. Ils constituent plus de la moitié de son poids sec. Le cholestérol constitue 25 % de ces lipides. Il participe à l'élaboration des membranes cellulaires du système nerveux et est l'un des principaux constituants des gaines de myéline.

Bien qu'il possède les enzymes nécessaires à la synthèse du cholestérol et des acides gras saturés et monoinsaturés, le cerveau a besoin d'un apport plasmatique de ces composés et d'acides gras essentiels. Les modalités de transport des lipides au travers de la BHE sont cependant inconnues.

Nous aborderons dans ce chapitre les données sur l'homéostasie des lipides, au niveau des organes périphériques ainsi qu'au niveau cérébral. Nous étudierons ensuite les informations concernant les échanges du cholestérol entre le sang et le cerveau.

# 3.1 Homéostasie des lipides au niveau des organes périphériques

Les lipides de notre organisme sont soit synthétisés in situ soit apportés par l'alimentation. L'homéostasie de ces lipides est basée sur les échanges entre les tissus, le métabolisme et le stockage de ces lipides par les différents types cellulaires. Elle fait intervenir les lipoprotéines, des récepteurs cellulaires et de nombreuses enzymes. Une déficience ou un mauvais fonctionnement de l'un de ces participants peut provoquer de graves troubles lipidiques.

#### 3.1.1 Structure et métabolisme des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont des assemblages macromoléculaires, composés d'une partie protéique, les apolipoprotéines, et de lipides (Fig. 20).

Le noyau central de ces complexes est constitué de lipides apolaires, esters de cholestérol et triglycérides, alors que les constituants de surface sont le cholestérol libre, les phospholipides et les apolipoprotéines.

Le rôle des lipoprotéines est multiple. Elles assurent d'une part le transport, sous forme soluble, des lipides dans le compartiment plasmatique et d'autre part, maintiennent l'équilibre lipidique des différents compartiments de l'organisme.



Figure 20 : Modèle de lipoprotéine d'après Yang et al. (1990).

### 3.1.1.1 Classification des lipoprotéines

Les lipoprotéines sont historiquement classées en fonction de leurs propriétés physico-chimiques : densité ou mobilité électrophorétique (ME). On distingue ainsi cinq classes majeures de lipoprotéines :

- les chylomicrons, d < 0.94, ME nulle

- les lipoprotéines de très basse densité : VLDL ; 0.94 < d < 1.006 ; ME pré- $\beta$
- les lipoprotéines de densité intermédiaire : IDL ; 1,006 < d < 1,019 ; ME  $\beta$
- les lipoprotéines de basse densité : LDL ; 1,019 < d < 1,063 ; ME ß

- les lipoprotéines de haute densité : HDL2, HDL3 ; ME  $\alpha$ 

Il existe deux autres classes de lipoprotéines quantitativement mineures :

- les lipoprotéines de très haute densité : VHDL ; 1,21 < d < 1,25

- la lipoprotéine (a) : Lp(a) ; 1,05 < d < 1,12 ; ME pré- $\beta$ 

-49-

Les apoliprotéines sont classées selon la nomenclature "ABC". Il existe sept apolipoprotéines majeures : les apo AI, AII, B, CI, CII, CIII et E. Elles sont déterminantes dans le métabolisme des lipoprotéines et des lipides. Elles interviennent dans le transport, la régulation des enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique ainsi que dans les interactions entre les lipoprotéines et leurs récepteurs tissulaires (Polonovski et Beucler, 1983) (Fig. 21).

Apolipo- protéine	LIPOPROTÉINE PRINCIPALE	Masse (kDa)	Concentration (g/l)	FONCTION
A-I	HDL	28,5	0,80-1,50	Activateur LCAT Liaison récepteur HDL
				Transport inverse du cholestérol
A-II	HDL	17	0,30-0,60	Activateur Lipase Hépatique ?
A-IV	Chylomicrons HDL	46	0,10-0,30	Liaison récepteur HDL Transport inverse du cholestérol
B-100	VLDL LDL	550	0,60-1,20	Liaison récepteur des LDL
B-48	Chylomicrons	265	< 0,05	Absorption lipides alimentaires
C-I	Chylomicrons VLDL	6,5	0,05-0,08	Activateur LCAT?
C-II	Chylomicrons VLDL	8,8	0,03-0,07	Activateur LPL
C-III	Chylomicrons VLDL	8,9	0,02-0,06	Régulation liaison récepteur des LDL? Inhibition LPL?
D	HDL	29	0,08-0,10	Transfert cholestérol estérifié
E	Chylomicrons VLDL HDL	34	0,01-0,06	Liaison récepteur des LDL et récepteur de l'apo E Transport inverse du cholestérol
F	HDL	30	< 0.05	?
G	VHDL	72	< 0.05	7
н	Chylomicrons	55	0,15-0,30	Régulation activité procoagulante
(a)	Lp(a)	300-700*	0-1,20	Interaction fibrinolyse?

· Variable selon les individus.

Figure 21 : Caractéristiques des différentes apolipoprotéines. D'après Luc et al. (1991).

Il existe pour certaines d'entre elles un polymorphisme qui est à l'origine de certaines dyslipoprotéinémies. C'est le cas de l'apo E qui existe sous trois formes : E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, E<sub>4</sub>. Ces isomorphes possèdent des charges nettes différentes dues aux substitutions d'acides aminés, le plus souvent du type arginine-cystéine. Ces substitutions entraînent une modification de l'affinité de l'apo E pour son récepteur tissulaire (Mahley et Innerarity, 1983). Récemment l'expression de l'apo E4 est mis en relation avec la formation de dépôts extracellulaires et vasculaires d'amyloïde et la dégénérécence neurofibrillaire dans la maladie d'Alzheimer. Elle est génétiquement associée aux formes familiales tardives (Saunders et al., 1993) et aux formes sporadiques (Strittmatter et al., 1993) de cette maladie.

Etant donnée l'hétérogénéité structurale et fonctionnelle des lipoprotéines regroupées en fonction de critères physico-chimiques, une nouvelle classification, basée sur la composition en apolipoprotéines est apparue (Alaupovic et al., 1972). Dans cette dernière, les lipoprotéines sont considérées comme un ensemble de particules composées de lipides associés à une ou plusieurs apolipoprotéines et peuvent être classées en deux groupes :

-les lipoprotéines simples qui contiennent une seule apolipoprotéine (ex : Lp B, Lp AI)

-les lipoprotéines complexes composées de deux ou plusieurs apolipoprotéines (ex : Lp B-CIII, Lp AI-AII)

Cette classification chimique des lipoprotéines remplace celles précédemment utilisées. En effet, comme le montre la spécificité des particules Lp AI et non Lp AI-AII dans le transport inverse du cholestérol (Barbaras et al., 1987), les particules simples et complexes pourraient représenter l'unité de base du métabolisme lipidique.

## 3.1.1.3 Métabolisme des lipoprotéines

Les lipides de notre organisme sont soit synthétisés in situ soit apportés par l'alimentation (Fig. 22).

#### 3.1.1.3.1 Métabolisme des lipoprotéines transportant les lipides alimentaires

Dans les cellules de l'intestin, les lipides hydrolysés par les enzymes digestives et ingérés, sont associés à l'apolipoprotéine B-48 ainsi qu'à d'autres apolipoprotéines (A-I, A-II, A-IV, C). Ils sont sécrétés dans la lymphe puis dans le sang sous forme de chylomicrons. Lorsque les chylomicrons très riches en lipides et pauvres en protéines, pénètrent dans le plasma, ils subissent l'action de la lipoprotéine lipase (LPL) attachée à l'endothélium vasculaire. Celle-ci hydrolyse les triglycérides en mono- et diglycérides qui peuvent être utilisés pour une production immédiate d'énergie ou être stockés. L'action de la LPL n'est possible qu'en présence de l'apo C-II son cofacteur indispensable. L'apo C-II des chylomicrons, ainsi que d'autres apolipoprotéines (apo E) proviennent des HDL. Après lipolyse, les édifices appelés "remnants" sont captés par les hépatocytes, puis dégradés.



Figure 22 : Schéma général du métabolisme des lipoprotéines. D'après Luc et al. (1991).

#### 3.1.1.3.2 Métabolisme des lipoprotéines synthétisées par le foie

En dehors des périodes postprandiales, les VLDL contenant l'apo B-100 remplacent les chylomicrons dans le rôle de transporteur des triglycérides. Comme les chylomicrons, ces VLDL subissent l'action de la lipoprotéine lipase, activée par l'apo C-II. Elles s'enrichissent en cholestérol estérifié acquis par échange avec les HDL, tandis qu'elles leur transfèrent leurs apo C et des triglycérides. Ainsi, elles acquièrent progressivement une densité IDL puis LDL. Ces lipoprotéines sont alors principalement des particules simples, ne contenant que l'apo B.

Les LDL apportent le cholestérol aux cellules qui les captent par l'intermédiaire du récepteur apo(B,E). Elles sont internalisées, les apolipoprotéines dégradées et le cholestérol libéré dans le cytoplasme cellulaire.

Les HDL sont essentiellement synthétisées par le foie. Elles peuvent aussi être formées à partir des apolipoprotéines et des constituants lipidiques relargués lors de la lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides. Elles interviennent dans le catabolisme des chylomicrons et des VLDL en leur fournissant l'apo C-II. Leur rôle essentiel est d'assurer le retour du cholestérol tissulaire au foie, seul organe capable de le métaboliser. Elles ont pour ces raisons un rôle antiathérogène.

## 3.1.2 Récepteurs cellulaires des lipoprotéines

Les récepteurs cellulaires des lipoprotéines jouent un rôle primordial dans leur métabolisme. Le récepteur des LDL, récepteur apo(B,E), est aujourd'hui le mieux caractérisé. Cependant plusieurs autres récepteurs ont été décrits (pour revue : Lestavel et Fruchart, 1994).

## 3.1.2.1 Récepteur apo(B,E)

3.1.2.1.1 Structure et métabolisme du récepteur apo(B,E)



Figure 23 : Structure du récepteur apo(B,E). D'après Esser et al. (1988).

Le récepteur apo(B,E) est une chaîne glycoprotéinique composée principalement de trois domaines : un domaine externe à la membrane plasmatique qui inclue le site de fixation du ligand, un domaine membranaire permettant l'internalisation du récepteur et un domaine cytoplasmique (Fig. 23).



## Figure 24 : Métabolisme des complexes LDL-récepteurs apo(B,E). D'après Brown et Golstein (1985).

Le récepteur apo(B,E) migre spontanément vers les puits recouverts qui s'invaginent pour former des vésicules d'endocytose recouvertes (Fig. 24). De multiples vésicules d'endocytose fusionnent pour donner naissance aux endosomes, dont le pH est maintenu à 6,5 grâce à une pompe à protons. A ce pH acide, les LDL se dissocient de leur récepteur. Ce dernier retourne à la surface cellulaire où il peut immédiatement fixer une nouvelle LDL. L'endosome fusionne avec un lysosome primaire. Les composants protéiques des LDL sont hydrolysés en acides aminés et sous l'action de lipases acides, les esters de cholestérol sont hydrolysés libérant le cholestérol (Brown et Goldstein, 1986).

Le récepteur apo(B,E) est recyclé toutes les 10 à 20 minutes, qu'il soit ou non occupé par une LDL. Grâce à sa très grande stabilité de structure, il peut supporter 150 passages dans les endosomes acides sans perdre ses fonctions.

Le cholestérol libéré est utilisé par les cellules pour la synthèse des membranes. Il régule trois processus intracellulaires en une action coordonnée qui stabilise le contenu cellulaire en cholestérol (Fig. 24) :

- il inhibe l'activité et la transcription du gène de l'HMG CoA réductase (la 3-Hydroxy-3-Méthylglutaryl Coenzyme A réductase), enzyme clef de sa synthèse et accélère sa dégradation.

- le cholestérol active l'enzyme d'estérification du cholestérol, l'Acyl Coenzyme A Cholesterol Acyltransférase (ACAT), permettant le stockage, dans le cytoplasme, du cholestérol en excès.

- le cholestérol réprime la synthèse des récepteurs aux LDL.

Ainsi, grâce à ces mécanismes de régulation, la cellule garde constante sa concentration en cholestérol non estérifié.

### 3.1.2.1.2 Biosynthèse du récepteur apo(B,E)

Le gène humain du récepteur apo(B,E) se situe sur le chromosome 19. Sa longueur est d'environ 45 kilobases. Il est composé de 18 exons et 17 introns (Sudhoft et al., 1985). Le récepteur apo(B,E) est synthétisé dans le réticulum endoplasmique sous forme de précurseur. Sa masse moléculaire apparente est de 120 kDa. Dans les 30 minutes qui suivent sa synthèse, sa masse moléculaire augmente et passe à 160 kDa du fait de l'élongation des chaînes O-glycosylées (Cummings et al., 1983) dans le Golgi. Quarante cinq minutes après le début de leur synthèse, les récepteurs LDL apparaissent à la surface cellulaire au niveau des puits recouverts de clathrine où ils peuvent fixer chacun une LDL par son apo B (Brown et Golstein, 1986).

Comme nous l'avons vu précédemment, au niveau de la cellule périphérique la synthèse des récepteurs apo(B,E) est réprimée par le cholestérol libre en excés. L'expression du récepteur apo(B,E) est régulée par la concentration en lipoprotéine dans le milieu de culture. Elle est élevée dans un milieu dépourvu de lipoprotéine et, au contraire, réduite en présence d'une forte concentration de LDL.

Dès 1987, la région promotrice du gène a été partiellement caractérisée. Il existe, au niveau du promoteur, des séquences qui fixeraient des facteurs de transcription positifs de type SP1 et qui assureraient, en absence de stérol, l'activité basale de ce promoteur. D'autres séquences consensus permettraient quant à elles la répression de la transcription du gène en présence du cholestérol et de ses dérivés.

La régulation de la synthèse du récepteur apo(B,E) se fait aussi par d'autres composés non directement liés au pool intracellulaire de stérols régulateurs. Le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), l'insuline et la phytohémagglutinine activant la croissance cellulaire produisent une augmentation rapide de la transcription. Les cellules en phase de croissance, ayant besoin de cholestérol pour la synthèse de leurs membranes, expriment le récepteur apo(B,E). Au contraire, les cellules qui ne se divisent plus réduisent l'expression de ce récepteur. Les cellules telles que les cellules endothéliales lorsqu'elles sont à confluence, cessent de croître et forment une monocouche. Ce phénomène, appelé inhibition de contact, est accompagné d'une réduction du métabolisme des LDL par les cellules endothéliales (Kénagy et al., 1984). Pour ces facteurs autres que le pool intracellulaire de stérols, les voies de transduction sont controversées. Il semblerait cependant, que l'expression du gène codant pour le récepteur apo(B,E), soit augmentée après stimulation de l'AMP cyclique (Middleton et Middleton, 1992).

Ainsi l'expression du récepteur LDL est sous le contrôle de nombreux et divers facteurs. La complexité de ces phénomènes de régulation reflète l'importance du gène de ce récepteur dans les fonctions cellulaires.

#### 3.1.2.1.3 Spécificité du récepteur apo(B,E)

Le récepteur apo(B,E) fixe les lipoprotéines contenant non seulement l'apo B mais aussi l' apo E. Ainsi, il reconnaît les LDL, les IDL, les HDL et les VLDL. L'affinité des HDL contenant de l'apo E, est 20 fois supérieure à celle des LDL. Mais, à saturation, la quantité des LDL fixées est quatre fois plus importante (Mahlay et al., 1979). Un modèle faisant intervenir la fixation d'une apo E-HDL sur quatre sites de fixation est proposé pour expliquer ce phénomène (Mahley et Innerarity, 1983).

L'apolipoprotéine n'est pas seule déterminante et les lipides interviennent également dans la liaison récepteur-ligand. L'apo E délipidée ne se fixe pas au récepteur et retrouve son affinité lorsqu'elle est de nouveau incorporée dans des liposomes (Pitas et al., 1980).

Le récepteur apo(B,E) possède les autres caractéristiques suivantes (Mahley et Innerarity, 1983) :

- la liaison est calcium dépendante. Elle est inhibée en présence d'EDTA.

- le récepteur est sensible à l'action de la pronase et de la trypsine.

- la liaison est inhibée par les polycations, la poly-L-lysine, la suramine et l'héparine.

- la fixation est résistante à la dénaturation thermique et détruite par la réduction de ponts disulfures.

### 3.1.2.2. Autres récepteurs

#### 3.1.2.2.1 LRP : "LDL receptor related protein"

Le LRP est présent au niveau de différents types cellulaires. In vivo, chez le lapin son expression est prédominante au niveau hépatique. Le LRP fixe les  $\beta$ VLDL lorsque celles-ci sont enrichies en apo E. En effet ce récepteur malgré ses homologies structurales avec le récepteur apo(B,E), ne fixe pas l'apo B (Fig. 25). La fixation des  $\beta$ VLDL est abolie en présence d'apolipoprotéines de type C sur les lipoprotéines (Kowal et al., 1990 ; Weisgraber et al., 1990).



Figure 25 : Représentation schématique du récepteur LDL et du LRP (LDL receptor Related Protein). D'après Brown et al. (1991).

Après endocytose, ce récepteur est recyclé à la surface cellulaire alors que son ligand est dégradé. La régulation de l'expression du LRP est différente de celle du récepteur LDL. Les inhibiteurs de l'HMG CoA réductase tels que le cholestérol alimentaire et l'oestradiol, n'altèrent pas l'expression du LRP au niveau hépatique. Son rôle hépatique serait d'éliminer de la circulation sanguine les lipoprotéines résiduelles. Cependant, cette fonction est controversée et la véritable contribution du LRP au métabolisme des lipoprotéines reste à déterminer.

### 3.1.2.2.2 Récepteur HDL

Les propriétés antiathérogènes des HDL résident sans doute dans leur participation au transport réverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie où il sera catabolisé (Schmitz et Lackner, 1993).

Alors qu'il n'existe aucun doute sur l'existence de sites de liaisons spécifiques des HDL sur les cellules, la nature des interactions et leurs impliquations dans l'efflux du cholestérol ne sont pas encore démontrées.

#### 3.1.2.2.3 Récepteur aux lipoprotéines modifiées

Les LDL modifiées in vitro chimiquement (LDL acétylées ou oxydées) ou modifiées in vivo (LDL oxydées) sont fixées, internalisées et dégradées par les macrophages ; ceci par l'intermédiaire de récepteurs appelés "scavenger", différents du récepteur reconnaissant les LDL non modifiées. Il semble que ces récepteurs forment plusieurs classes. Un récepteur spécifique des LDL oxydées ne reconnaissant pas les LDL acétylées a été décrit au niveau de ces macrophages en culture (Stanton et al. 1992). Il s'agit du récepteur FC  $\gamma$  RII-B. Une autre protéine, CD36, glycoprotéine de 88 kDa, cette fois exprimée à la surface des monocytes, des plaquettes et des cellules endothéliales permet l'internalisation spécifique des LDL oxydées. Ces récepteurs "scavenger" sont le plus souvent associés à la pathologie de la plaque athéromateuse. Cependant, au niveau du foie, des récepteurs spécifiques aux LDL oxydées joueraient plutôt un rôle protecteur contre l'accumulation sanguine de LDL modifiées. A l'inverse du récepteur apo(B,E) qui est régulé, les récepteurs "scavenger" sont toujours présents à la surface des cellules quelle que soit la quantité de cholestérol intracellulaire.

L'homéostasie des lipides au niveau des organes périphériques est largement décrite.

Qu'en est-il au niveau du cerveau isolé du reste de l'organisme par la BHE ?

## 3.2 Homéostasie des lipides cérébraux

L'équilibre lipidique au sein du cerveau est primordial pour le bon fonctionnement du système nerveux central. Cependant le métabolisme et la distribution des lipides du cerveau sont encore peu connus. Ces 20 dernières années les études concernant l'équilibre des lipides cérébraux se sont multipliées. En 1979, Roheim et al. montrent l'existence des apolipoprotéines AI et E, dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). Ils notent aussi la présence de lipoprotéines de densité inférieure à 1,21.

L'apo AI est très probablement d'origine plasmatique. Chez le porc, elle est synthétisée dans les microvaisseaux cérébraux où Hartmut et al. (1990) détectent l'ARNm codant pour cette protéine. Cette synthèse apparaît spécifique des vaisseaux cérébraux, l'ARNm n'étant pas retrouvé dans les cellules endothéliales d'aorte. Le rôle de l'apo AI dans le LCR et dans les vaisseaux cérébraux n'est pas connu.

L'apo E du LCR est d'origine endogène. Sa concentration est inférieure à celle du plasma (chez l'homme :  $7,5 \pm 3,1$  mg/ml dans le LCR ;  $93,5 \pm 29,7$  mg/ml dans le plasma, Carlsson et al., 1991). L'apo E est plus sialylée dans le LCR que dans le plasma.

Elle est également présente dans le parenchyme cérébral, synthétisée par les astrocytes. Sa concentration est particulièrement élevée dans les pieds astrocytaires tapissant la lame basale des capillaires, ainsi que dans leur espace extracellulaire immédiat (Boyles et al.,1985). La synthèse de l'apo E dans le cerveau est confirmée par la présence d'ARNm codant pour cette protéine (Elshourbagy et al., 1985).

Pitas et al. (1987) émettent l'hypothèse que l'apo E servirait à la redistribution du cholestérol aux cellules du système nerveux central. Ceci grâce au récepteur apo(B,E), capable de fixer l'apo E et présent à la surface des astrocytes et des neurones (Pitas et al., 1987).

L'expression de ce récepteur est contrôlée par la concentration locale en cholestérol. Par détection de l'ARNm, Hofmann et al. (1987) confirment la synthèse du récepteur apo(B,E) dans le cerveau. Sa concentration est plus élevée dans certaines régions du cerveau. Sa synthèse reste constante après la période de myélinisation, indiquant la participation de ce récepteur dans le maintien de l'homéostasie du cholestérol cérébral chez l'adulte (Swanson et al., 1988).

Wolf et al. (1992) montrent l'existence d'un autre récepteur capable de fixer l'apo E : le LRP. Ce récepteur est localisé dans la substance grise et s'exprime principalement à la surface des neurones. Le LRP pourrait participer au métabolisme du cholestérol et des lipoprotéines dans le système nerveux central.

Récemment, plusieurs travaux clarifient le rôle de l'apo E cérébrale.

Poirier et al. (1991) montrent qu'une lésion effectuée au niveau de l'hippocampe est suivie d'une rapide augmentation d'ARNm codant pour l'apo E. Cet ARNm est situé dans les astrocytes proches du traumatisme. De même, une lésion du nerf optique provoque une élévation d'apo E au niveau des oligodendrocytes associés à ce nerf (Stoll et al., 1989). L'apo E semble être impliquée dans la régénération des membranes neuronales (Poirier et al., 1991).

La figure 26 schématise l'éventuelle participation des astrocytes et de l'apo E qu'ils synthétisent dans la régénération de synapses et la prolifération de dendrites (Poirier, 1994). Les lipides provenant de la dégénération sont emmagasinés par les astrocytes. La présence d'une forte concentration de cholestérol dans ces cellules gliales provoque la synthèse d'apo E. Le cholestérol estérifié des astrocytes est alors hydrolysé et le cholestérol libre est associé à l'apo E (Fig. 26 : 1, 2) pour former une lipoprotéine. Cette lipoprotéine n'est pas encore caractérisée, elle "ressemblerait" à une HDL (Chiba, 1991). Les lipoprotéines sont excrétées dans le LCR au niveau des cellules épendymales ou/et directement au niveau des cellules nerveuses nécessitant un apport de cholestérol. Elles sont vraisembablement internalisées et dégradées (Fig. 26 : 4) par les neurones via un récepteur spécifique (Fig. 26 : 3). Le cholestérol libéré sera utilisé lors de la synaptogénèse ou de la prolifération de dendrites. La présence de cholestérol inhibera la synthèse de l'HMG CoA (Fig. 26 : 7) (Poirier, 1994).



Figure 26 : Participation hypothétique des astrocytes et de l'apo E dans la régénération de synapses et la prolifération de dendrites. D'après Poirier (1994).

Un rôle identique de l'apo E a été décrit au niveau du système nerveux périphérique. Une lésion du nerf sciatique provoque la colonisation de ces extrémités par des macrophages. Ceux-ci synthétisent et sécrètent de l'apo E (Ignatius et al., 1986 ; Snipes et al., 1986 ; Gelman et al., 1987 ; Goodrum et Novicki, 1988). Goodrum (1991) montre que le cholestérol libéré après lésion de la gaine de myéline est associé à l'apo E. Ceci permettrait la réutilisation du cholestérol lors de la remyélinisation. Les cellules de Schwann, isolées du ganglion de la racine dorsale et les neurones sensitifs mis en culture, fixent les lipoprotéines formées suite à la lésion du nerf sciatique. Ceci grâce à des récepteurs apo(B,E) (Rothe et Müller, 1991).

Deux enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines : la lipoprotéine lipase (LPL) (Eckel et Robbins, 1984 ; Gavin et al., 1987 ; Vilaró et al., 1990) et la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT) (Warden et al., 1989) sont présentes et fonctionnelles dans le parenchyme cérébral. La LCAT a aussi été retrouvée dans le LCR (Illingworth et Glover, 1970). Une déficience de cette dernière enzyme provoque de graves troubles cérébraux jouant principalement sur les facultés auditives (Shojania et al., 1983).

La présence dans le cerveau d'apolipoprotéines, de leurs récepteurs, de la LCAT et de LPL évoque l'intervention de lipoprotéines dans la distribution et le maintien de l'homéostasie tissulaire des lipides cérébraux.

## 3.2 Echanges de cholestérol sang <-> cerveau

### 3.3.1 Origine du cholestérol cérébral

#### 3.3.1.1 Synthèse de novo

La synthèse du cholestérol fait intervenir au moins 30 enzymes. La 3-Hydroxy-3-Méthylglutaryl Coenzyme A réductase (HMG CoA réductase) est l'enzyme clef de cette synthèse. Chez le lapin, la présence dans le cerveau d'ARNm codant pour l'HMG CoA réductase indique une synthèse de novo du cholestérol cérébral (Hofmann et al., 1987 ; Swanson et al. 1988). Cet ARNm est situé au niveau des neurones et des cellules gliales. Sa concentration très élevée lors de la myélinisation diminue de 50% à 60% chez le lapin adulte. Le taux de base chez l'adulte reste cependant élevé, indiquant la participation de la synthèse de novo dans le renouvellement du cholestérol cérébral.
Swanson et al. (1988) remarquent que la présence d'ARNm codant pour l'HMG CoA est souvent accompagnée de l'ARNm codant pour le récepteur apo(B,E). Ils en déduisent qu'une même région nécessitant du cholestérol, le synthétise et le prélève à partir des lipoprotéines.

# 3.3.1.2 Captation cérébrale du cholestérol plasmatique

La première étude concernant la captation cérébrale de cholestérol date de 1943 (Bloch et al.). Elle montre, qu'après injection dans la circulation sanguine, le cholestérol marqué n'est pas retrouvé dans le cerveau.

Les travaux de Davisson et Wajda, en 1959, contredisent ces résultats. Ils trouvent la molécule, dans le cerveau, marquée sur le même carbone, jusqu'à un an après l'injection chez de jeunes poulets et lapins.

Rapidement, les travaux démontrant une captation cérébrale du cholestérol se multiplient et l'idée d'une synthèse totalement in situ est abandonnée.

Dobbing (1963) démontre que sa captation est d'autant plus importante que la demande est forte ; en période de myélinisation par exemple.

Le cholestérol cérébral a donc, au moins en partie, une origine exogène. Pour atteindre le cerveau il doit traverser la BHE. Dans le plasma, il est principalement transporté par les lipoprotéines de basse densité (LDL). C'est pourquoi il est intéressant d'étudier la captation de ces lipoprotéines par le cerveau, ainsi que les interactions entre les LDL et l'endothélium cérébral.

# 3.3.2 Captation des lipoprotéines

Il existe peu d'informations concernant le transport des lipoprotéines à travers la BHE. Cependant, quelques travaux concernant la captation par le cerveau de molécules associées aux lipoprotéines de basse densité (LDL) sont publiés.

Deux enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines, la lipoprotéine lipase et une lipase acide, sont présentes dans l'endothélium des capillaires cérébraux du lapin (Brecher et Kuan, 1979).

Pardridge et Mietus (1980) remarquent que l'association aux lipoprotéines de cholestérol marqué diminue considérablement sa captation par le cerveau. La captation de la cyclosporine n'est pas augmentée lorsque celle-ci est associée aux lipoprotéines

(Cefalu et Pardridge, 1985). Inversement, l'isparine et la doradipine, deux molécules très liposolubles, sont totalement captées par le cerveau lorsqu'elles sont associées aux VLDL, LDL ou HDL (Urien et al., 1987).

Cependant, Brightman (1989) montre in vivo, que les LDL marquées à l'or colloïdal sont endocytées par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

De plus, Méresse et al. (1989) montrent qu'au contraire de l'endothélium des autres organes, l'endothélium des capillaires cérébraux exprime un récepteur apo(B,E). Ce récepteur diffère du récepteur "scavenger" qui lie les LDL modifiées. Après injection postmortem de LDL marquées à l'iode 125 dans la circulation cérébrale du bœuf, la radioactivité est associée aux capillaires. Elle décroît en présence d'un excés de LDL non marquées. Ceci montre que les LDL sont fixées spécifiquement par les capillaires cérébraux. Ces résultats ne sont pas retrouvés lorsque les études sont effectuées sur des capillaires isolés de bœuf, la fixation non spécifique au niveau de la lame basale étant trop importante. La mise au point d'une culture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux va permettre de confirmer les résultats obtenus in vivo et d'approfondir ces travaux. Les cellules endothéliales en culture, fixent spécifiquement les LDL (Kd : 16nM) (Méresse et al., 1989).

Le récepteur des LDL est isolé des capillaires cérébraux de bœuf. Il présente les caractéristiques suivantes :

- il fixe les LDL humaines.

- la fixation de LDL n'est pas déplacée par les HDL<sub>3</sub> et les LDL méthylées.

- la fixation est dépendante de la concentration en calcium et sensible aux protéases.

- le poids moléculaire est de 132 KD.

Ainsi ce récepteur aux LDL présente les mêmes caractéristiques que le récepteur apo(B,E) des fibroblastes humains (Méresse et al., 1989). Après fixation par la cellule endothéliale, les LDL sont internalisées, mais ne sont pas dégradées (Méresse et al., 1991). Le rôle du récepteur apo(B,E) au niveau de l'endothélium cérébral, paraît être différent de celui trouvé dans les autres tissus. En effet, dans les autres tissus, il dirige les LDL dans les lysosomes où elles sont dégradées.

Le rôle du récepteur apo(B,E) au niveau de la BHE est donc à déterminer.

# 3.4 Conclusion

Le cholestérol cérébral a en partie une origine plasmatique. Pour atteindre le cerveau il doit traverser la BHE. Les modalités de ce transport sont inconnues.

Dans le plasma, 70% du cholestérol est véhiculé dans les lipoprotéines de basse densité. La présence d'enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines dans l'endothélium cérébral, ainsi que l'existence d'un récepteur apo(B,E) à la surface de cet endothélium, suggèrent l'intervention de ces lipoprotéines dans l'apport du cholestérol plasmatique aux cellules nerveuses.

# **4 CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

Le support anatomique de la BHE est l'endothélium des capillaires cérébraux. Les caractéristiques morphologiques liées à l'imperméabilité de l'endothélium des capillaires cérébraux et qui les différencient des capillaires des autres organes, sont la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales, la rareté des vésicules de pinocytose et l'absence de fenestration. D'autres facteurs tels que l'expression de la MAO et la P-glycoprotéine participent aussi à l'imperméabilité de l'endothélium cérébral.

Malgré ses importantes capacités de synthèse, le cerveau ne peut être autonome. Les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral assurent l'alimentation du cerveau. Ils sont effectués par des transporteurs et récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules endothéliales.

La mise en place et le maintien des caractéritiques de la BHE sont induits par l'environnement cérébral. Les astrocytes, proches voisins des cellules endothéliales, sécrètent des facteurs diffusibles permettant l'expression des jonctions serrées et de protéines spécifiques de l'endothélium cérébral. Cependant des échanges réciproques entre les astrocytes et les cellules endothéliales sont indispensables à l'expression de ces protéines. L'élaboration des propriétés de la BHE nécessite une intercommunication entre les cellules endothéliales de capillaires cérébraux et les astrocytes.

# Ainsi La BHE restreint les phénomènes de diffusion pour privilégier les transports spécifiques entre les compartiments plasmatique et nerveux. Elle apparait comme une structure biologiquement active.

Si les transports des acides aminés, du glucose et d'autres molécules sont bien connus, les informations concernant le transfert des lipides du sang au parenchyme cérébral sont parcellaires et contradictoires.

Or le cerveau est un organe très riche en lipides. Le cholestérol représente 25 % de ces lipides. Il est un constituant essentiel des membranes des cellules nerveuses et des gaînes de myéline. La présence dans le cerveau d'apolipoprotéines AI et E, du récepteur apo(B,E), ainsi que d'enzymes impliquées dans le métabolisme des lipoprotéines suggère que les lipoprotéines interviennent dans la distribution du cholestérol aux tissus nerveux.

Bien que le cerveau possède l'équipement enzymatique nécessaire à sa synthèse, un apport plasmatique de cholestérol est indispensable.

Le cholestérol plasmatique est principalement transporté dans les lipoprotéines de basse densité. L'expression d'un récepteur fixant ces lipoprotéines, le récepteur apo(B,E), sur la face luminale des cellules endothéliales de capillaires cérébraux permet d'envisager son intervention dans le transport du cholestérol au travers de la BHE.

Nos travaux ont pour but d'établir le rôle des lipoprotéines de basse densité dans l'apport du cholestérol au système nerveux central. Ils sont effectués sur un modèle in vitro de barrière hémato-encéphalique, consistant en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes.

Nous avons participé à la mise au point du modèle in vitro de BHE en étudiant plus particulièrement le rôle des astrocytes dans les phénomènes de transport.

Puis, après avoir vérifié l'existence du récepteur LDL, mis en évidence par Méresse et al. (1989), en coculture, nous avons étudié l'influence de la composition lipidique des astrocytes sur son expression.

Enfin, le rôle de ce récepteur dans la transcytose des LDL du sang vers le cerveau a été montré.

# TRAVAUX PERSONNELS

Dans un premier temps, la BHE a été étudiée in vivo. Les techniques d'études in vivo sont nombreuses, encore très utilisées et toujours en évolution. Pendant ces dernières années des méthodes d'études in vitro se sont développées. Les auteurs utilisent alors des capillaires cérébraux isolés, ainsi que des cultures de cellules endothéliales préparées à partir de ces capillaires. Ces études vont permettre d'appréhender les mécanismes cellulaires entrant en jeu lors des phénomènes de transport au travers de la BHE, ainsi que la régulation de ces transports. Ainsi elles complètent les études faites in vivo.

Le principal problème rencontré lors des études in vitro est de conserver l'intégrité de la BHE. C'est pourquoi, nous avons choisi pour nos études, un modèle in vitro de BHE recréant les conditions in vivo.

Nous étudions dans un premier temps si ce modèle permet l'étude du transport des nutriments et des médicaments du sang vers le cerveau.

# Article 1 : Modèle de barrière hémato-encéphalique in vitro

Le modèle de barrière hémato-encéphalique in vitro consiste en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes de part et d'autre d'un filtre.

# 1. Obtention des cellules endothéliales de capillaires cérébraux : culture primaire et subculture

Les cellules endothéliales sont obtenues à partir de capillaires cérébraux de bœuf isolés de facon mécanique (Méresse et al., 1989). Les capillaires sont ensemencés dans des boîtes de Pétri couvertes d'une matrice extracellulaire produite par des cellules endothéliales de cornée de bœuf (article 1, Figure 1A). Cinq jours après l'ensemencement, des cellules migrent des capillaires (article 1, Figure 1B) et commencent à former des colonies (article 1, Figure 1C). Des colonies de péricytes se développent aussi dans les même boîtes de Pétri (article 1, Figure 1D). Les cellules endothéliales et les péricytes sont morphologiquement très différents, ce qui permet de les distinguer aisément. Lorsqu'elles sont suffisamment développées, les colonies constituées uniquement de cellules endothéliales sont récupérées par microtrypsinisation et ensemencées dans des boîtes de Pétri de 35mm de diamètre couvertes de gélatine (premier passage). Après s'être multipliées, elles sont repiquées dans une boîte de Pétri de 60mm de diamètre recouverte de gélatine (deuxième passage), dans laquelle elles atteignent la confluence en 6 à 8 jours. Elles sont alors à nouveau repiquées (troisième passage) dans vingt boîtes de 60mm de diamètre (passage au 1/20ème). Lorsqu'elles sont confluentes, elles sont trypsinisées et congelées dans l'azote liquide. Une fois décongelées, elles pourront encore être repiquées 7 fois au 1/20ème, après quoi elles n'atteignent plus la confluence.

# 2. Coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes (Fig. 27)

Des filtres pour culture cellulaire (Millicell-CM ; pores,  $0,4 \mu m$  ; diamètre, 30mm ; Millipore) sont couverts de collagène de queue de rat sur leurs deux faces.



Figure 27 : Schéma de la coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes de part et d'autre d'un filtre.

### Culture primaire d'astrocytes de rats nouveaux-nés

Les cultures primaires d'astrocytes sont réalisées à partir de cortex de rats nouveaux-nés, en forçant doucement le tissu cérébral au travers d'un tamis de nylon. La suspension cellulaire ainsi obtenue, est ensemencée sur la face inférieure du filtre. Huit jours plus tard, les filtres sont replacés en position normale. La culture d'astrocytes est stabilisée deux semaines plus tard. Le milieu de culture (DMEM additionné de 10% de sérum de veau foetal, glutamine 2 mM et 50  $\mu$ g/ml de gentamycine) est changé deux fois par semaine.

# Réalisation de la coculture (Fig. 28)

Trois semaines après avoir été ensemencée, la culture d'astrocytes est stabilisée. Les cellules endothéliales sont alors décongelées et remises en culture dans des boîtes de Pétri couvertes de gélatine. Dès qu'elles ont atteint la confluence, les cellules sont trypsinisées et ensemencées sur la face supérieure des filtres. Le milieu utilisé pour la coculture est le DMEM additionné de 15% de sérum de veau, de glutamine 2 mM,  $50\mu$ g/ml de gentamycine et 1ng/ml de FGF. Les cellules endothéliales forment une monocouche confluente en huit jours (article 1, Figure 3).



Figure 28 : Réalisation de la coculture

# 3. Caractérisation des cellules en coculture

# Caractérisation des astrocytes

Dans les cultures d'astrocytes matures, trois marqueurs sont recherchés par immunofluorescence : la GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), le NF (neurofilament) et l'A2B5 (glycoprotéine membranaire). La GFAP est un marqueur spécifique des astrocytes, le NF, un marqueur des neurones et l'A2B5, un marqueur des astrocytes fibreux et du précurseur commun des oligodendrocytes et des astrocytes fibreux. Les cellules sont GFAP positives et NF négatives. Les cellules sont donc des astrocytes. Quelques astrocytes sont A2B5 positifs. La plupart des astrocytes en culture sont donc des astrocytes protoplasmiques.

# Caractérisation des cellules endothéliales de capillaires cérébraux

# Marqueurs liés au type endothélial

Les marqueurs endothéliaux, tel que le facteur de Willebrand, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), la non thrombogénicité et la synthèse de prostacycline, sont exprimés dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux mises en culture. Ces marqueurs restent stables dans les subcultures jusqu'au septième repiquage.

# Propriétés liées à l'origine cérébrale

\*Monoamine oxydase (MAO)

Les cellules endothéliales n'expriment la MAO que lorsqu'elles sont confluentes. L'activité de la MAO dans les cultures confluentes est peu différente de celle des capillaires isolés. Elle est constante dans les cellules endothéliales cultivées seules et en coculture avec les astrocytes.

\*Gamma-glutamyl transpeptidase ( $\gamma$ -GT)

L'activité de la  $\gamma$ -GT dans les capillaires isolés (243±28 nmol/mg de protéine/min) est quarante sept fois plus élevée que dans l'homogénat de cerveau (5,1±1,6 nmol/mg de protéine/min). Elle est l'un des marqueurs cérébraux perdu dès la mise en culture des cellules endothéliales. Cependant cette activité est réinduite lorsque les cellules endothéliales sont cocultivées avec les astrocytes (35±3 nmol/mg de protéine/min) : elle est 12 fois plus importante que lorsque les cellules endothéliales sont cultivées seules (2,9 nmol/mg de protéine/min).

\*Jonctions serrées

La présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales est l'une des principales propriétés de l'endothélium cérébral. Les études en cryofracture montrent la présence et la complexité de ces jonctions au niveau des cellules endothéliales mises en culture (article 1, Figure 2).

La résistance au passage du courant électrique est directement associée à l'expression des jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Lorsque les cellules endothéliales sont cultivées sans astrocytes, la résistance des monocouches est 416 $\pm$ 57,6  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>. En présence d'astrocytes elle est de 661 $\pm$ 46  $\Omega$ . cm<sup>2</sup>.

Les cellules endothéliales cultivées en présence d'astrocytes présentent tous les marqueurs liés au type endothélial et les caractéristiques de l'endothélium des capillaires cérébraux.

# 4. Etude du transport au travers de la BHE : comparaison des résultats obtenus in vitro et in vivo.

La méthode in vitro utilise la coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes. Le transport des substances au travers de la monocouche est donné par le calcul de la perméabilité (Pe) (Siflinger-Birnboim et al., 1987).

La méthode utilisée in vivo est la méthode du BUI (ou méthode d'Oldendorf) (Oldendorf, 1971 ; modifié par Pardridge et al., 1983). Le transport est donné par le calcul de l'extraction cérébrale (Eo). Ces travaux sont réalisés dans le laboratoire du Professeur J.P. Tillement par P. Jolliet et F. Bree.

Les substances testées sont :

- des substances lipophiles : le propranolol,

- des substances connues pour passer la BHE en empruntant des transporteurs : glucose et leucine,

- des substances pénétrant peu dans le cerveau : saccharose, inuline,

- et cinq produits dérivés d'une famille thérapeutique, les anti-inflammatoires (méloxican, isoxicam, piroxicam, ténoxicam, diclofénac) dont le transport à travers la BHE n'a jamais été étudié.

La parfaite corrélation entre la perméabilité, in vitro et l'extraction cérébrale, in vivo, des différentes substances étudiées, montre que dans le modèle mis au point, le passage des substances du sang vers le cerveau s'effectue de la même façon qu'in vivo.

Cependant pour l'une des substances étudiées les résultats ne sont pas concluants. Le propranolol, substance très lipophile, a in vivo un coefficient d'extraction cérébral supérieur à celui du glucose. In vitro, cette substance déposée face luminale des cellules endothéliales, n'atteint qu'en très petite quantité le compartiment abluminal. Ceci s'explique par le fait que 35% du propranolol déposé dans le compartiment luminal se lie aux astrocytes cultivés sur l'envers du filtre. Ainsi le calcul de la perméabilité est faussé.

L'étude du transport de molécules au travers de la BHE, peut être effectuée grâce au modèle in vitro de BHE. Cependant des précautions sont à prendre pour les substances se fixant ou étant métabolisées par les astrocytes.

٠

Afin de palier cet inconvénient, mon travail a consisté à modifier l'agencement du modèle. Les astrocytes ne sont plus ensemencés sur la face inférieure du filtre, mais sur le plastique d'une boîte de six puits (Fig. 29). Ainsi les deux types cellulaires peuvent être facilement séparés lors des études de transport et la couche d'astrocytes n'interfère plus avec le peptide ou le médicament.

Nous avons vérifié que dans ces conditions, l'activité de la  $\gamma$ -GT ainsi que l'intégrité des jonctions serrées sont réinduites par les astrocytes. Lorsque les cellules endothéliales sont cultivées seules, la perméabilité à l'inuline de la monocouche est deux fois plus élevée que lorsqu'elles sont cocultivées avec les astrocytes ensemencés sur plastique (article 1, Figure 5).

Journal of Controlled Release, 21 (1992) 81–92 © 1992 Elsevier Science Publishers B.V. All rights reserved 0168-3659/92/\$05.00

COREL 00758

# In vitro reconstituted blood-brain barrier

M.P. Dehouck<sup>a</sup>, S. Méresse<sup>a</sup>, B. Dehouck<sup>a</sup>, J.C. Fruchart<sup>a</sup> and R. Cecchelli<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>SERLIA - U325 INSERM, Institut Pasteur, Lille, France; <sup>b</sup>Université de Lille I, Villeneuve d'Ascq, France (Received 7 July 1991; accepted in revised form 23 March 1992)

The passage of substances across the blood-brain barrier (BBB) is regulated in the cerebral capillaries, which possess certain distinct different morphological and enzymatic properties compared with the capillaries of other organs. Investigations of the functional characteristics of brain capillaries have been facilitated by the use of cultured brain endothelial cells, but in most studies some characteristics of the in vivo system are lost. To provide an in vitro system for studying brain capillary functions, we have developed a process of coculture that closely mimics the in vitro situation by culturing brain capillary endothelial cells on one side of a filter and astrocytes on the other. Under these conditions, endothelial cells retain all the endothelial cell markers and the characteristics of the blood-brain barrier including tight junctions and gamma-glutamyl transpeptidase activity. The average electrical resistance for the monolayer was 661  $\Omega$ ·cm<sup>2</sup>. In order to assess the drug transport across the blood-brain barrier, we compared the maximal brain extractions E(0) in vivo to the permeability of the in vitro model. Eleven compounds were tested. They were selected due to their ability to exhibit quantitatively different brain extraction rates. The in vivo and the in vitro values showed a strong correlation as indicated by the Spearman's correlation coefficient (r=0.83, p<0.01). The relative ease with which such cocultures can be produced in large quantities could facilitate the screening of new centrally active drugs.

Key words: Blood-brain barrier; Endothelial cell

#### Introduction

The passage of substances across the bloodbrain barrier (BBB) is regulated in cerebral capillaries, which possess certain distinct different morphological and enzymatic properties compared with the capillaries of other organs. The endothelial cells of brain capillaries are sealed together by continuous tight junctions and have little transcellular vesicular transport [1]. In addition, a number of proteins are specifically expressed by brain endothelial cells that may be required for metabolic protection or transport activities at the BBB interface. Due to these characteristics, the BBB is a regulatory interface that may limit or impair the delivery of drugs to the central nervous system as compared to other tissues.

Various in vivo models have been described for

Correspondence to: Dr. R. Cecchelli, SERLIA - U 325 IN-SERM, Institut Pasteur, 1 rue de Pr. Calmette, 59019 Lille Cedex, France. Tel: 20.87.77.54; Fax: 20.87.73.60.

Abbreviations: BBB=blood-brain barrier; BBCE=bovine brain capillary endothelium; bFGF=basic fibroblast growth factor; DMEM=Dulbecco's modified Eagle medium; ECM=Extracellular matrix; MAO=Monoamine oxidase.

the study of the drug transport through the BBB [2-5]. The in vivo situation has the advantage resembling close the physiological transfer conditions; however, in vivo models do not provide direct access to transport phenomena.

A better understanding of the functions of the BBB became available only with the elaboration of a procedure, by means of which a fraction enriched by isolated microvessels could be obtained [6]. A disadvantage was still that in transport studies the substrates largely approached the microvessels from the abluminal side, which is literally opposite to the in vivo situation. However, these preparations were an excellent starting point for the culture of cerebral endothelial cells since it was demonstrated that most of the endothelial cells remained viable and could be maintained under tissue culture conditions [7].

During the past decade, several laboratories have developed methods for culturing endothelial cells from brain microvessels. Mechanical homogenization was the most widespread procedure used at the beginning of the development of brain microvessels' endothelial cell cultures. But with the work of Williams et al. [8], who demonstrated that microvessels originating from mechanical dispersion techniques showed a viability of only 5%, while cultures from microvessels isolated using the enzymatic procedure showed a viability of 84%, most of the laboratories have introduced the enzymatic procedure to isolate endothelial cells from brain microvessels for cultures. Endothelial cells form a continuous monolayer in culture and tight junctions are evident in primary and early passages of these cell cultures. Even when these junctions are seen frequently between cultured cells, it is difficult to determine by electron microscopy whether they are continuous (zonalae occludentes) or discontinuous (maculae occludentes). It may be possible to verify the continuous nature of these junctions using transcellular electrical measurements as performed with MDCK cells [9], but such measurements have not been made by most of the authors. The only values published varied from 157 to 783  $\Omega$ ·cm<sup>2</sup> and demonstrated the serious lack of reproducibility of their technique [10]. It is interesting that the junctions, although apparently continuous, are not complex [11]. They restrict the passage of proteins but not of smaller organic molecules and do not limit the movement of ions. The apparent difference between the permeability properties of the cultured monolayers and the BBB 'in vivo' is the 'in vitro' system's leakiness to small membrane impermeant molecules such as sucrose [12]. This difference could be due to the less complex tight junctions observed in primary cultures and/or may be related to the absence of required factors in the artificial culture conditions. Furthermore, the overestimation of BBB permeability values measured in vitro and in vivo for lipid-mediated transport and the underestimation of permeability values for carrier-mediated transport by the in vitro model have been ascribed to the loss of expression of BBB-specific proteins in endothelium cultured in the absence of astrocytic trophic factors [13].

In summary, several lines of evidence suggest that cultured brain endothelial cells rapidly lose the characteristics of a differentiated BBB in vitro and it has been claimed that long-term cultures of brain endothelial cells may not provide good model systems for the BBB in vitro [14]. Reasons for this could first of all be that the enzymatic method used for the preparation of microvessel endothelial cells makes impossible to totally clear all arterioles and venules from the capillary preparation. So the possibility exists that migrating and proliferating cells might be derived from the endothelial wall of arterioles and venules which contaminated the capillaries. Several authors have shown that capillary endothelial cells differ from the endothelial cells of large arteries in their biochemical and functional characteristics; a point to be taken into consideration since it is now well known that the BBB is situated in capillaries and not in larger vessels [15,16]. Secondly, it has been suggested that barrier properties of the BBB may be the consequence of perivascular astrocytes acting on the endothelium they ensheath [17].

For the reasons mentioned above we initiate

.

another strategy to prepare an in vitro model for the BBB [18-20] which will be reviewed below.

#### Preparation and cell culture conditions

After isolation by mechanical homogenization from one hemisphere of bovine brain, microvessels were seeded onto dishes coated with an extracellular matrix (ECM) secreted by bovine corneal endothelial cells. Five days after seeding, the first migrating cells emerged from attached capillary fragments (Fig. 1A). Two cell types were seen. The first was identified as pericytes, which grew as individual cells and were characterized by their irregular outlines and numerous processes (Fig. 1D). These unwanted pericytes rapidly invaded the culture dishes when the floating capillary tufts were not discarded with the washing (2 h after microvessel seeding). The endothelial cells extruding from the capillary fragments (Fig. 1B) grew in colonies of closely apposed and elongated cells (Fig. 1C). These cells were found only on the ECM-coated dishes. In fact, no endothelial cells were encountered when the isolated capillaries were seeded on un-



Fig. 1. Bovine brain endothelial cells in tissue culture. (A) Phase-contrast photomicrograph of isolated bovine brain capillaries. One hour after seeding and washing with fresh culture medium, the isolated capillaries adhere on extracellular matrix. (B) Five days after plating, emerging cells are seen at the end of the isolated capillaries (arrow). (C) Six days after plating, the migrating cells form a clump of endothelial cells. A remnant of the original capillary is present (arrow). (D) Five days after plating, contaminated cells, presumably pericytes, grow as individual cells which are characterized by irregular outlines and numerous processes. (E) Confluent monolayer of bovine brain capillary endothelial cells in their third passage after cloning. The cells are grown on gelatin-coated dishes in the presence of DMEM supplemented with 15% CS and bFGF (1 ng/ml). Bar, 100  $\mu$ m (from reference [18]).

treated plastic dishes. As soon as the first bovine brain capillary endothelial cells emerged from the capillaries, cell proliferation was enhanced by addition of bFGF (1 ng/ml) to the culture medium. Under these conditions, approximately 10% of the seeded fragments can initiate pericyte-free endothelial cell colonies. In each dish, three or four of the largest colonies were mechanically harvested and then seeded on gelatincoated dishes in the presence of optimal culture medium (DMEM). bFGF (1 ng/ml) was added every other day, until bovine brain capillary endothelial (BBCE) cells became confluent, 7 to 8 days after seeding. They formed a monolayer of small, tightly packed, non overlapping and contact-inhibited cells (Fig. 1E). Endothelial cells from one 35 mm-dish were harvested at confluence and seeded onto 60 mm gelatin-coated dishes. After 6 to 8 days, confluent cells were subcultured at the split ratio of 1:20. Cells at the third passage (about 50 dishes) were stored in liquid nitrogen. Cells frozen in passage 3 showed good recovery and growth after storage in liquid nitrogen. When endothelial cells and blood-brain barrier characteristics were studied, no differences between frozen and unfrozen cells were observed.

Under the optimal culture conditions, cells were passaged repeatedly at low cell density up to passage 10. Each passage allowed a 20-fold increase of the cultured surface. The life span of the cultures was about 50 cumulative population doublings. Beyond passage 10, cells became large and did not reach confluence.

This technique allowed us to circumvent the culture limitations of primary cultures and provide a large quantity of monolayers quickly. Furthermore, disruption of brain tissue by mechanical dispersion and filtration techniques, without enzymatic treatment, enabled us to isolate a microvascular network. The fact that only capillaries adhere on the extracellular matrix gives us cloned endothelial cells emerging from these capillaries. In contrast to the enzymatic digestion technique, the obvious advantage of the use of cloned endothelial cells emerging from capillaries is that the culture is not contaminated by endothelial cells of arteriolar or venular origin and pericytes.

#### Characterization of the cells

#### **Endothelial cell markers**

Factor VIII-related antigen is the most widely used marker for identifying endothelial cells in culture [21]. In our system, factor VIII-related antigen could be detected within BBCE cells at early and later passages ( $\geq 10$ ), in contrast to what was observed by other authors [22,23]. Although several non-endothelial cell lines, including bovine smooth muscle cells and pericytes, failed to stain with factor VIII antisera used for these experiments, the ability of human anti-factor VIII-related antigen to bind non-specifically has been documented [24].

Thus, demonstration of factor VIII-related antigen by this technique is useful, but other criteria must be used to identify these cells. That is why we have demonstrated (i) the non-thrombogenic properties of the monolayer, (ii) the production of PGI<sub>2</sub> by BBCE cells in response to bradykinin and (iii) the presence of angiotensin converting enzyme. Furthermore, we have shown that all these criteria are present on sparse, subconfluent and confluent BBCE cells up to the tenth passage (50 generations).

#### **Blood-brain barrier markers**

#### Structural markers

The structural basis of the blood-brain barrier is that the cells are sealed together by tight junctions. Freeze fracture examination of confluent cultures at different passage numbers revealed, for the first time to our knowledge, intercellular junctional complexes consisting exclusively of tight junctions in the present cultures (Fig. 2). This pattern is similar to that seen in the tight junctions of brain capillaries in vivo [25]. In our model the presence of tight junctions in BBCE



Fig. 2. Freeze fracture replica of BBCE cells in their third passage after cloning. The complexity of this tight junction is characterized by numerous parallel ridges which are highly anastomosed (arrows). (E) E fracture face; (P) P fracture face; (C) cytoplasm. Bar, 250 nm (from reference [18]).

cells seems related to a phenotype stabilization since such tight junctions were absent in bovine aortic endothelial cells subjected to the same culture conditions. In addition, the BBCE cells in culture have few pinocytotic vesicles, a further similarity to their in vivo counterpart. In these conditions, the electrical resistance of the monolayers is  $416 \pm 57.6 \ \Omega \cdot \text{cm}^2 \ (n=9)$ .

#### **Enzymatic markers**

The occurrence of monoamine oxidase (MAO) is one of the biochemical typical properties of the cerebral endothelium. In our system, we demonstrated that the cells expressed high levels of MAO activity only when they were confluent. In contrast, angiotensin converting enzyme activity, an endothelial cell marker, remained constant when it was biochemically assayed on sparse, subconfluent and confluent cells. These results suggest that intimate contacts between cells are necessary to restore the level of MAO activity [18].

Another enzymatic marker of the BBB was

studied: gamma-glutamyl transpeptidase. Studies have shown that subcultivation of brain endothelial cells is associated with the loss of bloodbrain barrier markers [26]. Cerebral vascular endothelium is the only endothelium that contains a histochemically or biochemically detectable concentration of gamma-glutamyl transpeptidase. The results concerning the occurrence of gamma-glutamyl transpeptidase in cultured brain endothelial cells have so far been very conflicting. The enzyme is often lost from the endothelial cells as soon as they migrate or proliferate from the isolated microvessels [27-29]. In the present studies, the specific activity of gammaglutamyl transpeptidase in isolated brain capillaries  $(243 \pm 28 \text{ nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$  was more than 40-fold that of the starting homogenate  $(5.1 \pm 1.6 \text{ nmol} \cdot \text{mg prot}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$ , indicating the purity of the isolation. Nevertheless low levels of gamma-glutamyl transpeptidase activity (2.9 nmol·mg prot<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>) were observed in primary culture and in passaged cells. This agreed with previous results that cerebral endothelial cells lose their gamma-glutamyl transpeptidase in primary culture.

-78-

85

## Improved in vitro blood-brain barrier model

In order to reinduce the gamma-glutamyl transpeptidase in BBCE cells and to reconstruct some of the complexity of the cellular environment that exists in vivo we further developed our in vitro model of BBB by growing endothelial cells on one side of a filter and astrocytes on the other [19].

Figure 3 illustrates the structure of confluent bovine brain endothelial cells cultured on an insert coated with collagen. Culture plate inserts (Millicell-CM 0.4  $\mu$ m, 30 mm diameter from Millipore) were coated on both sides with rat tail collagen [30]. BBCE cells form a monolayer of small, tightly packed, non-overlapping and contact-inhibited cells. Also noted in Fig. 3 is the close apposition of the cells and the absence of open spaces between them. As did the endothelial cells in our previous cultures on plastic coated with gelatin [18], BBCE cells retain both endothelial and some of the BBB features (tight junctions, monoamine oxidase activity and few pinocytotic vesicles).

For the two side filter coculture, primary cultures of astrocytes, made from newborn rats' cerebral cortex [31], were first plated at a concentration of  $2.5 \times 10^5$  cells/ml on the bottom side using the filter upside down in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine and 50  $\mu$ g/ml gentamicin. After 8 days, filters were properly positioned and the medium changed twice a week. Three weeks after seeding, cultures of astrocytes became stabilized. Then BBCE cells, frozen at passage 3, were recultured on a 60 mm gelatin-coated dish. Confluent cells were trypsinized and plated on the upperside of the filters at a concentration of  $4 \times 10^5$  cells/filter. The medium used for the coculture was DMEM supplemented with 15% calf serum, 2 mM glutamine, 50  $\mu$ g/ml gentamicin and 1 ng/ ml bFGF added every other day. Under these conditions, BBCE cells form a confluent monolayer in 8 days.

Fig. 4 illustrates the ultrastructure of this coculture. In transverse sections, endothelial cells form a monolayer while astrocytes form layers of overlapping cellular sheets. Astrocytes are glial fibrillary acidic protein positive (GFAP<sup>+</sup>) and



Fig. 3. Phase contrast micrograph of confluent BBCE cells grown on the upper face of a collagen-coated cell culture insert "cyclopore" from Falcon (×340).



Fig. 4. Electron micrograph showing ultrastructure of a coculture of BBCE cells and astrocytes. Bar: 5 μm.

neurofilament negative (NF<sup>-</sup>). Under these conditions, the presence of gamma-glutamyl transpeptidase activity is seen in BBCE cells as red granular staining. The cells demonstrate variability in the intensity of the staining but nearly all cells reveal some activity (not shown). Control cultures that contain aortic bovine arch endothelial (ABAE) cells and astrocytes show no activity. The activity of gamma-glutamyl transpeptidase is more than ten times higher in the two side filter coculture compared with BBCE cells observed alone  $(35\pm3 \text{ nmol/min/mg of} \text{ protein}, n=9 \text{ versus } 2.9\pm0.5 \text{ nmol/min/mg of} \text{ protein}, n=12$ ).

Satisfied with the observations that monolayers of BBCE cells in coculture possess many of the properties that are known to have important barrier functions in vivo, we investigated the integrity of our monolayers by their ability to resist the transendothelial passage of electric current. After one week, the resistance of these monolayers in four experiments averaged  $661.5 \pm 48$  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  (n=20). This resistance is approximately 2 times less than that of frog brain capillaries ( $1,295 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , [32]) but 300 times greater than that of frog mesenteric capillaries (1.85 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ , [33]). When BBCE cells are cultured alone, the resistance is  $416 \pm 57.6 \Omega \cdot \text{cm}^2$  (n=9) which is in the same range as those found by Rutten et al. [10]. The reduction of resistance in the absence of glial cells is in agreement with the results in which primary capillary endothelial cells cocultured with an astrocyte-enriched preparation showed significant enhancement of tight junction length, width and number as compared to various controls [34].

The permeability of the BBB in vivo is enhanced for several hours by brief infusion of hypertonic arabinose through the carotid artery [35]. The effect of an osmotic stress was studied by exposure of the coculture for the five minutes equilibration period to medium containing 1.6 M arabinose. The rate of movement of  $[^{3}H]$  sucrose increased by 70%. There was also an immediate drop in the resistance of the coculture to 32% of the control values. This effect was reversible, and the integrity of the cell layer was reestablished within 6 h of the return to normal culture conditions.

The finding concerning the movement of extracellular tracers ([<sup>3</sup>H]inulin) across the monolayers was investigated. Culture plate inserts were set into six-well plates with 2 ml of buffer added to the upper chamber, and 100  $\mu$ l was removed from the lower chamber at various time points. Fig. 5 shows that the permeability of the monolayer is two times less when the endothelial cells were cocultured with astrocytes.



Fig. 5. Flux of [<sup>3</sup>H] inulin vs time across either a monolayer of brain capillary endothelial cells cultured on a Millicell-CM insert in solo or a monolayer of brain capillary endothelial cells cultured on a Millicell-CM insert with astrocytes plated on the plastic well. Each datum represents the mean ± SEM from three different monolayers.

-80-

Fig. 6 shows that after 8 days in coculture, the barrier remains impermeable to inulin up to 20 days.



Fig. 6. % of inulin after 1 h which had crossed a monolayer of brain capillary endothelial cells cultured in presence of astrocytes. Results are the means  $\pm$  SEM of 12 different filters using 2 different clones of brain capillary endothelial cells at passage 5, 6 and 7.

#### **Transport studies**

In order to assess drug transport across the BBB, we have compared the maximal brain extraction E(0) using the in vivo Oldendorf method [3] with the permeability of our 2 side filter coculture [20].

To calculate the permeability of the monolayer, the clearance principle was used. The increment in cleared volume between successive sampling events was calculated by dividing the amount of solute transport during the interval by the donor chamber concentration. The total volume cleared at each time point was calculated by summing the incremental cleared volumes up to the given time point [36]:

Clearance 
$$(\mu l) = \frac{[C]_{A} \cdot V_{A}}{[C]_{L}}$$

where [C]L is the initial luminal tracer concentration, [C]A is the abluminal tracer concentration and VA is the volume of the abluminal chamber. During the 40 min experiment, the clearance volume increased linearly with time. The average volume cleared was plotted vs time, and the slope was estimated by linear regression analysis to give the mean and the standard error to the estimate. The slope of the clearance curves for the coculture was denoted PSt where PS=permeability×surface area product ( $\mu$ l/ min). The slope of the clearance curve with control filter is equal to PSf.

The PS value for endothelial monolayer (PSe) was calculated from:

$$\frac{1}{PSe} = \frac{1}{PSt} - \frac{1}{PSf}$$

The PSe values were divided by the surface area of the Millicell-CM  $(4.2 \text{ cm}^2)$  to generate the endothelial permeability coefficient (Pe in centimeters per minute).

We have chosen different compounds transferred by a passive diffusion: some such as sucrose and inulin having a low brain extraction, propranolol for its high extraction. Glucose and leucine were chosen as they cross the BBB by a carrier-mediated system. Moreover, we tested diclofenac and four oxicam-related drugs: isoxicam, meloxicam, piroxicam and tenoxicam, as all of them have the same pharmacokinetic pattern which involves high plasma binding percentage, low apparent distribution volumes indicating a poor, if any, brain transfer [37].

A typical transport assay employing triplicate inserts with coculture or triplicate filters with astrocytes only is shown for sucrose in Fig. 7. The in vivo E(0) values were plotted against the in



Fig. 7. Clearance of  $[{}^{3}H]$  sucrose across a coculture of BBCE cells and astrocytes: PSt=Permeability×surface area of the coculture; PSf=Permeability×surface area of a filter coated with rat tail collagen on both sides and astrocytes plated on the bottom side of the filter. Data are the mean ± SEM (n=3 filters).



Fig. 8. Correlation between in vivo and in vitro methods. The in vivo E(0) values were plotted against the in vitro Pe values. Data points were used in linear regression analysis to generate the slope and intercept.

vitro Pe values and the correlation is shown in Fig. 8. The results demonstrated a strong correlation as shown by the Spearman's correlation coefficient (r=0.83; p<0.017). The apparent opposing data concerning the in vivo and in vitro transports of glucose and propranolol i.e. propranolol has a higher in vivo E(0) than glucose but a lower permeability coefficient could be explained by the fact that propranolol incor89

porated in the astrocytes (35%) is not integrated into the calculation of Pe and underestimated in the in vitro Pe values. The occurrence of tight junctions between capillary endothelial cells could explain the lower values measured in vitro (and in better agreement with those calculated in vivo) than those published by Pardridge's group [13]. The in vitro permeability of glucose and leucine, i.e. compounds that traverse the BBB via carrier mediation performed by specific transport proteins is in the same range as that of the BBB permeability in vivo, indicating that in our model the specific transporters are always present. Furthermore, this in vitro model allows better resolution with the compounds that have a low brain extraction. For example, the in vivo E(0) for sucrose and inulin are equal (8%). When we analyzed the permeability of these molecules in vitro we can see that the permeability of sucrose  $(0.63 \cdot 10^{-3} \text{ cm/min})$  is twice that of the permeability of inulin  $(0.29 \cdot 10^{-3} \text{ cm}/$ min). This point is very important, since several carefully performed in vivo studies have shown that peptides can cross the BBB in small amounts [38]. Because of the potency of these peptides, such small amounts might indeed be biologically significant.

In conclusion, the strong correlation between the in vivo E(0) and in vitro Pe values demonstrated that this in vitro model will be an important tool for investigations of the role of the BBB in the delivery of drugs to the brain. Furthermore, the relative ease with which such cocultures can be produced in large quantities and the reproducibility of the system would facilitate not only the study of the biochemical mechanisms regulating peptide delivery to the central nervous system at the cellular level, but also provide a more efficient and selective system for the screening of new centrally active peptides.

#### Acknowledgments

We are very grateful to Prof. J.P. Tillement, Dr. P. Jolliet-Riant and F. Brée for the in vivo studies. We thank Isabelle Desmaret for her skilful help and patience in the preparation of the manuscript and P. Kelly for his editorial help.

#### References

- 1 T.S. Reese and M.J. Karnovsky, Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase, J. Cell Biol. 34 (1967) 207-211.
- 2 C. Crone, The permeability of capillaries in various organs as determined by use of indicator method, Acta Physiol. Scand. 58 (1963) 292-305.
- 3 W.W.H. Oldendorf, Measurement of brain uptake of radiolabeled substance using a tritiated water internal, Brain Res. 24 (1971) 372-376.
- 4 S.I. Rapoport, K. Ohno and K.D. Pettigrew, Drug entry into brain, Brain Res. 172 (1979) 354–359.
- 5 D. Triguero, J. Buciak and W.M. Pardridge, Capillary depletion method for quantification of blood-brain barrier transport of circulating peptides and plasma proteins, J. Neurochem. 54 (1990) 1882–1888.
- 6 F. Joo, The blood-brain barrier in vitro: Ten years of research on microvessels isolated from the brain, Neurochem. Int. 7 (1985) 1-25.
- 7 P. Panula, F. Joo and L. Rechardt, Evidence for the presence of viable endothelial cells dissociated from rat brain, Experientia 34 (1978) 95-96.
- 8 S.K. Williams, J.F. Gillis, M.A. Matthew, R.C. Wagner and M.W. Bitensky, Isolation and characterization of brain endothelial cells: morphology and enzyme activity, J. Neurochem. 35 (1980) 374–381.
- 9 M. Cereijido, E.S. Robbins, W.J. Dolan, C.A. Rotunno and D.D. Sabbatini, Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucide support, J. Cell Biol. (1978) 853-880.
- 10 M.J. Rutten, R.L. Hoover and M.J. Karnovsky, Electrical resistance and microvascular permeability of brain endothelial monolayer culture, Brain Res. 425 (1987) 301-310.
- 11 P.D. Bowman, S.R. Ennis, K.E. Ravey, A.L. Betz and G.W. Goldstein, Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability, Ann. Neurol. 14 (1983) 396-402.
- 12 K.L. Audus and R.T. Borchardt, Bovine brain microvessel endothelial cell monolayers as a model system for the blood brain barrier, Ann. N.Y. Acad. Sci. 17 (1987) 9-18.
- 13 W.M. Pardridge, D. Triguero, J. Yang and P.A. Cancilla, Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier, J. Pharmacol. Exp. Ther. 253 (1990) 884-891.
- 14 W. Risau and H. Wolburg, Development of the bloodbrain barrier. TINS 13 (1990) 174–178.
- 15 B.R. Zetter, Endothelial heterogeneity: influence of vessel size, organ localization, and species specificity on the properties of cultured endothelial cells, in: U. Ryan

(Ed.), Endothelial Cells, Vol. II, CRC Press Inc., Boca Raton, FL, 1988, pp. 63-79.

- F. Joo, The cerebral microvessels in culture, an uptake, J. Neurochem. 58 (1992) 1-17.
- 17 H. Davson, The blood-brain barrier, J. Physiol. (London) 255 (1976) 1-28.
- 18 S. Méresse, M.P. Dehouck, P. Delorme, M. Bensaïd, J.P. Tauber, C. Delbart, J.C. Fruchart and R. Cecchelli, Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture, J. Neurochem. 53 (1989) 1363-1371.
- 19 M.P. Dehouck, S. Méresse, P. Delorme, J.C. Fruchart and R. Cecchelli, An easier, reproducible, and massproduction method to study the blood-brain barrier in vitro, J. Neurochem., 54 (1990) 1798-1801.
- 20 M.P. Dehouck, P. Jolliet-Riant, F. Brée, J.C. Fruchart, R. Cecchelli and J.P. Tillement, Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models, J. Neurochem. 58 (1992) (in press).
- 21 E.A. Jaffe, L.W. Hoyer and R.L. Nachman, Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells, J. Clin. Invest., 52 (1973) 2757-2764.
- 22 L.E. DeBault, E. Henriquez, M.N. Hart and P.L. Cancilla, Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture, In Vitro 17 (1981) 480-494.
- 23 R.A. Robinson, C.J. Ten Eyck and M.N. Hart, Establishment and preliminary growth characteristics of a transformed mouse cerebral microvessel endothelial cell line, Lab. Invest. 54 (1986) 579-587.
- 24 A.J. Wilson, Factor VIII related-antigen staining by immunoperoxidase technique in smaller laboratories: a potential problem, Am. J. Clin. Pathol. 81 (1985) 117– 120.
- 25 R.R. Shivers, A.L. Betz and G.W. Goldstein, Isolated rat brain capillaries possess intact, structurally complex, interendothelial tight junctions: freeze fracture examination of tight junction integrity, Brain Res. 324 (1984) 313-322.
- 26 P.D. Bowman, A.L. Betz and G.W. Goldstein, Culture of endothelial cells from neural capillaries, in: E.A. Jaffe (Ed.), Biology of Endothelial Cells, Martinus Nijhoff Publishers, 1984, pp. 27-33.
- 27 L.E. DeBault, Gamma-glutamyl transpeptidase induction mediated by glial foot process to endothelium contact in coculture, Brain Res. 220 (1981) 432-435.
- 28 L.E. DeBault and P.A. Cancilla, Induction of gammaglutamyl transpeptidase into isolated endothelial cells, Adv. Exp. Med. Biol., 131 (1980) 79-88.
- 29 L.E. DeBault and P.A. Cancilla, Gamma-glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro, Science 207 (1980) 653,655.
- 30 M.B. Bornstein, Reconstituted rat tail collagen used substrate for time tissue cultures on coverslips in maximow slides and roller tubes, Lab. Invest. 7 (1958) 134– 139.

- 31 J. Booher and M. Sensenbrenner, Growth and cultivation of dissociated neurones and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures, Neurobiology 2 (1972) 97-105.
- 32 C. Crone and S.P. Oleson, The electric resistance of brain capillary endothelium. J. Physiol. 316 (1981) 53-54.
- 33 C. Crone and Christiensen, Electrical resistance of a capillary endothelium, J. Gen. Physiol. 77 (1981) 349– 371.
- 34 C. Tao, H. Jung, Z. Nagy and M.W. Brightman, Tight junctions of cerebral endothelium in vitro are greatly enhanced in the company of astrocytes, Anat. Rec. 214 (1986) 131A.
- 35 S.I. Rapoport, W.R. Frederick, K. Ohno and K.D. Pet-

tigrew, Quantitative aspects of reversible osmotic opening the blood-brain barrier, Am. J. Physiol. 238 (1980) 2421-2431.

- 36 A. Siflinger-Birboim, P.J. Del Vecchio, J.A. Cooper, F.A. Blimenstock, J.N. Shepard and A.B. Malik, Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer, J. Cell Physiol. 132 (1987) 111-117.
- 37 E. Albengres, J.L. Pinquier, P. Riant, S. Urien, J. Barre and J.P. Tillement, Pharmacological criteria for risk benefit evaluation of NSAIDs, Scand. J. Rheumatol. 73 (1988) 3-15.
- 38 W.A. Banks and A. Kastin, Permeability of the bloodbrain barrier to neuropeptides: the case for penetration. Psychoneuroendocrinology 10 (1985) 385-399.

Ainsi l'ensemencement des astrocytes sur plastique, plutôt que sur la face inférieure du filtre, ne change en rien l'établissement des propriétés de l'endothélium cérébral.

.

Il nous faut maintenant vérifier si ce nouvel agencement permet et améliore l'étude du transport au travers de la BHE.

•

•

Article 2 : Transport de médicaments vers le cerveau : comparaison entre des modèles d'étude de la barrière hémato-encéphalique in vitro et in vivo

Afin de valider un modèle in vitro de BHE, consistant en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes, nous étudions le passage de différentes substances au travers de la BHE, en comparant ce modèle d'une part à un autre modèle in vitro où les cellules endothéliales sont cultivées seules et d'autre part à un modèle in vitro.

Les substances étudiées sont choisies pour leur extraction cérébrale. Elle varie de 2% (Cyclosporine A) à 90% (propranolol).

La culture primaire et les études in vivo sont réalisées par C. Schluep, au sein de l'équipe du Dr M.Lemaire (Laboratoires SANDOZ, Bale).

# Méthode d'étude in vitro

# Coculture de cellules endothéliales et astrocytes

La coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes est décrite dans l'article 1. Les cellules endothéliales sont ensemencées sur la face supérieure du filtre, les astrocytes sur le plastique d'une boîte 6 puits (Fig. 29). Après 12 jours de coculture, nous avons montré que la monocouche de cellules endothéliales présente toutes les caractéristiques de l'endothélium cérébral. Lors des études de transport les deux types cellulaires sont séparés.



Figure 29 : Schéma de coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes. Les astrocytes sont ensemencés sur le plastique d'une boîte de Pétri.

# Culture primaire de cellules endothéliales

La culture primaire de cellules endothéliales est décrite par Audus et Borchardt (1986). Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux sont ensemencées sur filtre et cultivées sans astrocytes. Les études de transport se font dans une chambre de diffusion.

Le transport des substances au travers de la monocouche de cellules endothéliales est donné par le calcul de la perméabilité (Pe) (Siflinger-Birnboim et al., 1987).

# Méthode in vivo

La méthode utilisée in vivo est la méthode du BUI (ou méthode d'Olderdorf) (Oldendorf, 1971 ; modifié par Pardridge et al., 1983). Le transport est donné par le calcul de l'extraction cérébrale (Et).

#### **Résultats**

Comparaison entre le modèle in vivo et les modèles in vitro

### Modèle in vivo / modèle in vitro, coculture

Comme nous l'avons montré dans l'article 1, il existe une parfaite corrélation entre le transport des substances étudiées sur la coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes et celui étudié in vivo (article 2, Table 2, Figure 2B). L'ensemencement des astrocytes sur plastique, plutôt qu'à l'envers du filtre, ne change en rien le transport des substances au travers de la monocouche de cellules endothéliales. De plus ce nouvel agencement de la coculture, qui permet de séparer les cellules endothéliales des astrocytes au moment de l'expérience, facilite l'études des substances telles que le propranolol qui se fixaient aux astrocytes ensemencés à l'envers du filtre. Le transport du propranolol sur le modèle de coculture où les astrocytes ont été ensemencés sur le plastique, est en parfaite corrélation avec le modèle in vivo (article 2, Table 2, Figure 2B).

Modèle in vivo / modèle in vitro, culture primaire

Il existe une corrélation entre le transport des substances effectué in vivo et celui étudié in vitro, utilisant la culture primaire de cellules endothéliales (article 2, Table 2, Figure 2A), sauf pour le propranolol. La perméabilité au propranolol de la monocouche de cellules endothéliales est très faible par rapport à son extraction cérébrale.

Le transport du L-propranolol est décrit par Pardridge et al. (1984) ainsi que par Lin et al. (1987), comme un transport saturable, mettant en jeu des mécanismes spécifiques de la BHE.

Comme nous l'avons vu précédemment, les astrocytes sont directement impliqués dans l'établissement des caractéristiques de la BHE. Ceci expliquerait la différence de perméabilité au propranolol des monocouches de cellules endothéliales cultivées ou non en présence d'astrocytes.

# Comparaison entre les différents modèles in vitro

Les résultats montrent une bonne corrélation (sauf pour le propranolol) entre le transport effectué sur la coculture et celui étudié sur la culture primaire. Cependant, comme nous l'avons montré pour l'inuline (article 1) la perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales est moins élevée lorsque ces cellules sont cultivées en présence des astrocytes. Ici elle est 7 fois plus perméable en culture primaire, sans astrocytes (article 2, Table 2, Figure 3). Ces résultats confirment, que le nouvel agencement des astrocytes ne nuit en rien à la qualité du modèle et il souligne l'importance des astrocytes dans l'élaboration des caractéristiques de la BHE.

# DRUG TRANSPORT TO THE BRAIN : COMPARISON BETWEEN IN VITRO AND IN VIVO MODELS OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER.

Dehouck M.P.\*, Schluep C.°, Dehouck B., Fruchart J.C.\*, Lemaire M.° and Cecchelli R.\*Ω

\* U325 INSERM, Institut Pasteur, 1 rue Calmette, 59019 Lille Cédex, France.

° Drug Safety Assessment, Sandoz Pharma, Basel, Switzerland.

Ω Université de Lille I, 59650 Villeneuve d'Ascq Cédex, France.

Address correspondence and reprint requests to :

Marie-Pierre DEHOUCK SERLIA, U325 INSERM Institut Pasteur 1, rue du Prof. Calmette 59019 Lille Cédex FRANCE

Telephone: [+33] 20 87 73 85 Fax: [+33] 20 87 73 60

## ABSTRACT

To assess drug transport across the blood-brain barrier, we compared the transport of drugs using two "in vitro" models : a primary culture of brain microvessel endothelial cells and a coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. For this purpose we selected a set of compounds corresponding to a wide range of lipid solubility. Additionally the "in vitro" results were compared to "in vivo" results obtained with the single carotid injection, and a good correlation between "in vivo" extraction ratios ( $E_t$ ) and "in vitro" permeability coefficients ( $P_e$ ) was shown. The work was focused on the influence of astrocytes on the permeability properties of the monolayer of endothelial cells. We estimated that the cocultured endothelial cells were 7 times less permeable than the primary culture of brain microvessels, showing that the coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes move the "in vitro" blood-brain barrier closer to the "in vivo" situation relative to a restrictive barrier.

key words : Drug transport - Bood-brain barrier - "In vitro" models - brain microvessel endothelial cells - Astrocytes - "In vivo" intracarotid injection.

# **INTRODUCTION**

Drug therapy of the central nervous system presents many logistical problems. The major problem is delivering the drugs to the brain owing to the presence of the blood-brain barrier. Brain capillary endothelial cells forming the blood-brain barrier are sealed by complex tight junctions and possess few pinocytotic vesicles. These characteristics, added to the occurrence of a metabolic barrier, restrict the passage of most small polar molecules and macromolecules from cerebrovascular circulation to the brain.

Many endothelial functions that include the diffusion or transport barrier of brain microvessels have been defined by studies in whole animals and in isolated capillaries "in vitro". The ability to grow central nervous system microvascular endothelial cells in culture has opened the door to many new experimental approaches in studying the transendothelial transport of substances across the "in vitro" blood-brain barrier (Bowman et al., 1983). Audus and Borchardt (1986) pioneered the use of brain microvessel endothelial cell monolayers to study drug transport and metabolism. Subsequent technical developments promoted the use of more sophisticated ways to study blood-brain barrier transport "in vitro" (for review see Audus et al., 1990). Pardridge et al. (1990) confirmed the previous investigations (van Bree et al., 1988; Shah et al., 1989) showing a correlation between lipid solubility and drug transport through an "in vitro" blood-brain barrier. They also demonstrated a correlation between drug transport "in vivo" and across the endothelial monolayer "in vitro". However blood-brain barrier permeability coefficients (Pe) "in vitro" were, on average, about 150-fold greater than the corresponding Pe values "in vivo". This overestimation was attributed to the loss of astrocytic trophic factors, which are normally secreted owing to the close apposition of astrocytes on brain capillary endothelial cells "in vivo" (DeBault and Cancilla, 1980). Because it is now well established that many of the unique features that are characteristic of the blood-brain barrier are in some way induced by astrocytes (Risau and Wolburg, 1990), we have developped an "in vitro" model consisting of a coculture of bovine brain capillary endothelial cells (BBCE cells) and astrocytes (Dehouck et al., 1990), in order to assess drug transport across the blood-brain barrier. Using this model, we have shown a highly significant correlation between the "in vivo" and "in vitro" blood-brain barrier permeability (Dehouck et al., 1992a).

In order to compare the transport of drugs using two "in vitro" models, routinely used in our laboratories : a primary culture of brain microvessel endothelial cells and a coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes, we selected a set of compounds corresponding to a wide range of lipid solubility. Additionally the "in vitro" results were compared to "in vivo" results obtained with the single carotid injection technique. Our results demonstrated that the coculture system represents an improvement over the primary culture of brain microvessel endothelial cells with regards to the lower permeability.

# **EXPERIMENTAL PROCEDURES**

# Radiolabeled compounds

Radiolabeled compounds and corresponding specific activities are listed in Table 1. Cyclosporine A and drugs mentioned "SDZ" were synthesized by the Labeling Laboratory of Sandoz Pharma Ltd., Basel, Switzerland. [<sup>3</sup>H]-inulin, [<sup>14</sup>C]-sucrose and [<sup>3</sup>H]-propranolol were from Amersham, France.

# Carotid injection technique

The unidirectional influx of the various drugs into the brain was measured by the tissue sampling site injection technique (Oldendorf, 1970) in adult male Wistar rats weighing 200g under ketamine-xylazine anesthesia (ketamine 130 mg/kg i.m.; xylazine 1.3 mg/kg i.m.).

Approximately 0.2 ml of 0.01 M HEPES-buffered Ringer's solution were rapidly injected into the common carotid artery. The injected solution contained either tritiated test compound (10  $\mu$ Ci/ml) and [<sup>14</sup>C]-butanol (1  $\mu$ Ci/ml), or [<sup>14</sup>C]-test compound (1  $\mu$ Ci/ml) and [<sup>3</sup>H]-H<sub>2</sub>O

 $(5\mu Ci/ml)$ . The animals were decapitated 5s after injection. Samples from the injection solution and the hemisphere ipsilateral to the injection site were solubilized in 2 ml soluene-350 (Packard, Maiden, CT, USA) at room temperature overnight before double isotope liquid scintillation counting. The brain uptake index (BUI) was determined from the ratio : test / reference disintegration per minute in brain tissue divided by the same ratio in the injection mixture. The BUI = Et / Er where Et and Er are brain extractions of the test and reference compounds, respectively. The Er values for water and butanol were 62 and 73 % respectively (Pardridge et al., 1985). These Er values were used to convert BUI data into Et values.

### Cell cultures

<u>Primary cultures</u>. Bovine brain microvessel endothelial cells (BBME cells) were isolated from grey matter of cerebral cortex and grown in primary culture according to the protocol of Audus and Borchardt (1986).

The grey matter was minced into 1- to 2-mm cubes, suspended in minimum essential medium (MEM) containing dispase at a final concentration of 0.5 % and placed in a shaking water bath for 3 hours at 37°C. After the dispase treatment, the cell suspension was centrifuged at 1000g for 10 minutes then the pellets were resuspended in 13 % dextran and centrifuged at 5800g for 10 minutes. Cell debris, fat and myelin which float in dextran were discarded and the pellets resuspended in MEM containing 1 mg/ml collagenase / dispase. The suspension of brain microvessels was placed in a shaking water bath for 5 hours at 37°C. The enzymatic treatment was followed by centrifugation over a pre-established 50% Percoll gradient to provide a homogenous isolate of BBME cells. Isolated BBME cells were frozen at -70°C for use as needed.

Primary culture of BBME cells monolayers were grown on permeable polycarbonate discs (Nucleopore ; 13-mm diameter with 3.0  $\mu$ m pore) pretreated with collagen and fibronectin (Sigma Chemical, Buchs, Switzerland). Cells were seeded at a density of 50 000 cells/cm<sup>2</sup> and fed again every other day after seeding with a culture medium consisting of 45% MEM, 45% F-12 nutrient mixture (Hazelton, Lenesca, KS, USA), 10% donor-defined equine serum (Hyclone

Laboratories, Logan, UT, USA), 100  $\mu$ g/ml heparin, 50  $\mu$ g/ml gentamycin and 2.5  $\mu$ g/ml amphotericin B (Sigma Chemical).

Coculture of bovine brain capillary endothelial cells and astrocytes. Bovine brain capillary endothelial cells (BBCE cells) were isolated and characterized as described by Méresse et al. (1989). After isolation by mechanical homogenization and sieving from the grey matter of bovine brain, microvessels were seeded onto dishes coated with an extracellular matrix secreted by bovine corneal endothelial cells. Five days after seeding the first endothelial cells migrated out from the capillaries and began to form microcolonies. When the colonies were sufficiently large, the largest islands were trypsinised and seeded onto 35 mm-diameter gelatin-coated dishes in the presence of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 15% calf serum (Hyclone, Flobio, France), 2 mM glutamine, 50  $\mu$ g/ml gentamicin and recombinant fibroblast growth factor (1 ng/ml added every other day). Endothelial cells from one 35 mm-diameter dish were harvested at confluence and seeded onto 60 mm-diameter gelatin coated dishes. After 4-6 days, confluent cells were subcultured at the split ratio of 1:20. Cells at the third passage were stored in liquid nitrogen. For experiments, cells were rapidly thawed at 37°C and used between passage 4 and 7.

Newborn rat astrocytes were isolated according to the method of Booher and Sensenbrenner (1972).

Cocultures of BBCE cells and astrocytes were obtained using the method of Dehouck et al. (1990) with some modifications. The astrocytes were plated at a concentration of  $1,25 \times 10^5$  cells/ml on six-well plastic plates. The medium was changed twice a week. Three weeks after seeding, cultures of astrocytes became stabilized. Then BBCE cells frozen at passage 3, were recultured on a 60mm-diameter gelatin-coated dish. Culture plate inserts (Millicell-CM ; pore size,  $0.4 \mu m$ ; diameter, 30 mm; Millipore) were coated on the upper side with rat tail collagen and set in the six-well plates containing stabilized astrocytes. Confluent BBCE cells were trypsinized and plated on the upper side of the culture plate inserts at a concentrations of  $4 \times 10^5$  cells / well. This arrangement permitted the use of BBCE cells separately from astrocytes by removing the insert at the time of the experiment, while preserving cell-cell interactions and

therefore the differentiation of the two cell types during the 12 days of culture (Dehouck et al., 1994). The medium used for the coculture was Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 15% calf serum, 2 mM glutamine, 50  $\mu$ g/ml gentamicin and 1 ng/ml recombinant fibroblast growth factor added every other day. Under these conditions, endothelial cells formed a confluent monolayer after 7 days. Diffusion experiments were performed 5 days after confluence. The integrity of the endothelial cell monolayers was checked by measuring diffusion of sucrose and inulin, substances which in physiological conditions, have a very low brain extraction.

# Transendothelial transport studies

Using primary culture of bovine brain microvessel endothelial cells. After the primary cultures of BBME cells reached confluence, the polycarbonate membranes were lifted from the culture dishes and inserted between the two chambers of a side-by-side diffusion apparatus (Crown Glass, Somerville, NJ, USA) as described by Guillot et al (1991). On both sides of the monolayers, chambers were filled with 3 ml modified phosphate-buffered saline (137mM NaCl, 2.7mM KCl, 1.5mM KH2PO4, 0.9mM CaCl2, 0.5mM MgCl2 6H2O, 8.2mM Na2HPO4 7H2O, 10mM D-glucose). The water-jacketed diffusion chambers were thermostated at 37°C with an external circulating water bath, and the contents of the donor and receptor chambers were stirred magnetically at 600 rpm. An aliquot of [3H]-test compound or [14C]-test compound was added at time 0 to the donor chamber, i.e., the luminal side (the final concentrations corresponded to 0.8 µM for CyA, 5.8 µM for ICM, 8.5 µM for EAB, 1.9 µM for ICT, 0.9 µM for HDC, 6.4 µM for ICS, 0.05 µM for propranolol, 3.3 µM for sucrose). At various times (10, 15, 20, 30 and 45 minutes) after the addition of the drug, 200 µl aliquots were removed from the receptor chamber, i.e., the basolateral side, and the radioactivity was determined in a liquid scintillation counter. After their removal, fresh phosphate-buffer aliquots were added to the receptor chamber to maintain equal volumes in both chambers (this dilution was taken into account for the data analysis). 8 polycarbonate membranes covered with

-95-

confluent monolayers and 8 polycarbonate membranes coated only with collagen and fibronectin were used for each test compound.

Using coculture of bovine brain capillary endothelial cells and astrocytes. On the day of the experiment, buffered Ringer's solution (150mM NaCl, 5.2mM KCl, 2.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2mM MgCl<sub>2</sub>, 6mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.8 mM glucose, 5mM HEPES ) was added to the lower compartments of a six-well plate (2 ml per well). One insert containing a confluent monolayer of bovine brain capillary endothelial cells was transferred to the first well of the six-well plate containing buffered Ringer's solution. 2 ml of buffered Ringer's solution containing [<sup>14</sup>C]labeled or [<sup>3</sup>H]-labeled test compound were placed, at time 0, in the upper compartment, i.e., the luminal side. The incubation were performed at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. The concentrations of tested compounds were similar to those used in the primary culture model. At time 10, 15, 20, 30 and 45 minutes after time 0, the insert was transferred to another well of the six-well plate to minimize the possible passage from the lower compartment, i.e., the basolateral side to the upper compartment, i.e., the luminal side.

Triplicate inserts containing confluent monolayers and triplicate inserts coated with collagen and incubated for 12 days with astrocytes were used for each drug. An aliquot of 200  $\mu$ l from each lower compartment and 20  $\mu$ l from the initial solution containing the labeled test compound were analyzed in a liquid scintillation counter.

# Data analysis

The clearance principle was used to obtain a concentration-independent transport parameter. The cleared volume was calculated as described by Siflinger-Birboim et al. (1987) by dividing the amount of radiolabeled compounds in the receptor chamber or the lower compartment (i.e., the basolateral side) by the drug concentration in the donor chamber or the upper compartment (i.e., the luminal side).
The total volume (Cl) cleared at each time point was calculated by summing the cleared volumes up to the given time point :

$$Cl (ml) = \frac{X}{Cd}$$

Where X is the amount of test compound on the basolateral side and Cd is the luminal side concentration of test compound at each time point.

During the 40 minute experiment, the clearance volume increased linearly with time. The average volume cleared was plotted versus time, and the slope was estimated by linear regression analysis to give the mean  $\pm$  SE. The slope of the clearance curve was denoted PSt, where PS is the permeability surface area product (in milliters per minute). The slope of the clearance curve with the control filter was denoted PSf.

The PS value for the endothelial monolayer (PSe) was calculated from :

$$\frac{1}{PSe} = \frac{1}{PSt} = \frac{1}{PSf}$$

The PSe values were divided by the surface area of the Millicell-CM for the coculture (4.2 cm<sup>2</sup>) or by the surface area of the polycarbonate disc for the primary culture (0.636 cm<sup>2</sup>) to generate the endothelial permeability (Pe, in cm per minute).

#### **Statistics**

The method of Spearman (1987) is a classical used non-parametric test for studying the linear correlation between two quantitative parameters when the number of coupled values is < 20:

$$r' = \frac{1-6 \sum d_i^2}{n(n^2 - 1)}$$

where *n* is the number of studied values and  $d_i$  is the difference  $(y_i - x_i)$  between the order value of each couple. Its degree of significance is found in the tables, considering (n - 2) degree of freedom.

#### RESULTS

Typical assays employing inserts with endothelial cells from primary culture and coculture are shown for  $[^{14}C]$  ICM in Figure 1. The slopes of the clearance curves are linear up to 40 min. For all studied compounds, the rate of solute diffusion across endothelial cell monolayers is lower than the rate of diffusion of solute across collagen coated filters. For each substance, the passage is not restricted by the permeability of the filter. Furthermore, the binding of the tested substances to the filter coated with collagen is negligeable (results not shown).

The "in vivo" extraction ratios Et and "in vitro" Pe values obtained with primary culture and coculture of brain microvessel endothelial cells are compared in Table 2. A significant correlation as shown by the Spearman's correlation coefficient (r = 0.91 and r = 0.96 for primary culture and coculture respectively) is observed between Et values and "in vitro" Pevalues (Figure 2).

A correlation between Pe values obtained with primary cultures of brain microvessels and Pe values obtained with coculture is shown in Figure 3. From the slopes of the regression lines, we can estimate that the cocultured endothelial cells are 7-fold less permeable than the primary culture of brain microvessels.

#### DISCUSSION

The purpose of the present study was to compare drug transfer across the blood-brain barrier using two, well established and routinely used, "in vitro" models: the primary culture of brain microvessel endothelial cells described by Audus and Borchardt (1986), and the coculture

-99-

64

of brain capillary endothelial cells and astrocytes described by Dehouck et al. (1990). The work was focused on the influence of astrocytes on the permeability properties of the monolayers of endothelial cells.

Until recently, it has been widely believed that the octanol/water partition coefficient of a compound was a predictor of brain penetration. However recent evidences have shown that this is not systematically the case (Van de Waterbeemd and Kansy, 1992). Using the primary culture model, Guillot et al. (1993) and Saheki et al. (1994) have shown that the octanol-buffer partition coefficient was a poor predictor of the blood-brain barrier permeability for some anticholesterol drugs. In this study, we demonstrated that cyclosporin A, a cyclic peptide with high lipophilicity, showed a very low blood-brain barrier permeability "in vivo" as well "in vitro". It was recently suggested that this low permeability of cyclosporin A into the brain was caused by the active efflux from brain microvessel endothelial cells by P-glycoprotein present at the luminal surface of cells (Tsuji et al., 1993). Therefore correlations between octanol/water partition coefficient and blood-brain permeability were not considered in this study.

Our studies confirm previous investigations showing a good correlation between "in vivo" and "in vitro" blood-brain permeabilities (Pardridge et al., 1990; Dehouck et al., 1992a). The correlation between "in vivo" and "in vitro" permeability values obtained in this study (r = 0.96) was better than that observed in a previous study using the coculture model (Dehouck et al.,1992a). This improvement could be explained in two ways : i) in the first study, the choice of the compounds might not have given the best opportunity to demonstrate a closer correlation between the "in vitro" and "in vivo" models since the range of brain penetration of the compounds studied was relatively narrow. In this study, 8 different test compounds were used that showed a wide range of blood-brain barrier penetration ii) in the first study, astrocytes grew on the underside of the filter and the multilayer formed by astrocytes was an added physical and metabolic barrier for subsequent transport studies. Additionally, adsorption phenomena to the cells were by far more critical since 35 % of the propranolol that moved across the endothelium

barrier was recovered in the astrocytes. In order to avoid these problems, astrocytes were not grown on the underside of the filter in the present study.

The finding that the primary culture of the brain microvessel endothelial cell monolayer is 7-fold more permeable than the cocultured monolayer could be attributed to the different methods used for the preparation of the endothelial cells. Primary brain microvessel cultures derived from collagenase-digested microvessels consist in a mixture of cells of capillary, arteriolar and venular origin since the microvessel fraction obtained from the brain consists mainly of capillaries but also of arterioles and venules (Joo, 1992). Folkman et al.(1979), Zetter (1980) have shown that capillary endothelial cells grow slowly in medium, whereas endothelial cells derived from large vessels grow more rapidly. Therefore one cannot exclude the fact that migrating and proliferating cells derived from arterioles or venules might contaminate the capillary endothelial cell preparation. An obvious avantage of the use of cloned endothelial cells emerging from identified capillaries (Méresse et al., 1989) is that the culture is not contaminated by endothelial cells of arteriolar or venular origin. Since it was noted that endothelial cells from different vascular origins do show a difference in biochemical and functional characteristics (Zetter, 1988), this important methodological point should be taken into consideration when the structural basis of the blood-brain barrier is known to be the capillary bed.

Moreover the lower permeability of the brain microvessel endothelial cell monolayer could also be explained by the dedifferentiation that brain endothelial cells undergo in culture, even in primary culture (Pardridge et al., 1990). This dedifferentiation and the loss of genetic expression of a variety of blood-brain barrier specific proteins is presumably caused by the absence of the astrocytic factors that are secreted by astrocytes (DeBault and Cancilla, 1980). It was shown that the inulin permeability of brain capillary endothelial cells was reduced by 50% when the cells were cocultured with astrocytes 12 days before the experiments (Dehouck et al., 1992b). The same results were obtained by Raub et al. (1992),who demonstrated that the treatment with rat or human astroglioma cells results in a 50% decrease in permeability to sucrose and dextran (70 kDa). The decrease in passive diffusion is most probably due to a change in tight junctions and not to transcellular vesicular traffic, supporting the hypothesis that

-101-

astroglioma cells release one or more signals that are required for cultured brain microvessel endothelial cells to express a "differentiated" phenotype. Furthermore, the correlation between "in vitro" and "in vivo" brain extractions indicates that the propranolol value is well fitted in coculture experiments but not in primary culture experiments (Figure 2). Since a saturable transport system into the brain was found for L-propranolol using the BUI method (Pardridge et al., 1984; Lin et al., 1987), these results suggest that the coculture model could be a better reflect of the "in vivo" active transport of propranolol into the brain.

Another advantage of using cloned and passaged cells is that this technique allowed to circumvent the culture limitations of primary cultures. As described by Dehouck et al. (1992a), one pure clone of endothelial cells was seeded onto one 35mm-diameter dish. After confluence, the cells were harvested and seeded onto one 60mm-diameter gelatin-coated dishes. After 4 to 6 days, confluent cells were subcultured at the split ratio of 1: 20, and gave 20 dishes. Cells at this passage (third passage) were stored in liquid nitrogen. For diffusion experiments, cells were rapidly thawed at 37°C and used between passage 4 and 7. Even if the appearance of the cells at passage 8 seems to be normal using contrast microscopy, an increase in the permeability of the monolayer is observed for sucrose and inulin, demonstrating the beginning of a dedifferentiation of the endothelial cells. The relative ease with which such monolayers can be produced in large quantities allows great flexibility in performing the experiments since primary cultures of astrocytes can also be kept in a CO<sub>2</sub> incubation for at least 2 months.

As stated by Audus et al. (1990), a critical factor, particularly in the study of lipophilic molecules, is the importance of stirring. The unstirred cell-insert system was used with the coculture, while a side-by-side diffusion system stirred mechanically was employed with the primary culture. As noted by Hidalgo et al. (1989), whether the diffusion apparatus is stagnant or stirred could influence the thickness of the aqueous boundary layer on the surface of the cell monolayer and, thus, the permeability. According to these results, the permeability of hydrophobic compounds like HDC or ICT could be slightly underevaluated in the coculture experiments performed in this study. The introduction of the  $O_2/CO_2$  gas lift stirring system

recently developed for conducting transport studies on cell cultures grown in "mini"cell inserts (Audus et al., 1990) could represent an important improvement of "in vitro" blood-brain barrier models.

Finally, in this study, transendothelial transport was realised in optimal conditions of culture for both methods. We have shown that manipulations in tissue culture conditions, such as the introduction of the coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes move the "in vitro" blood-brain barrier closer to the "in vivo" situation relative to restrictive blood-brain barrier, but further improvements have still to be effected in order to approach the "in vivo" reality.

Aknowledgements : The BIOMED concerted action : "Drug transport to the brain : New experimental strategies" prompted and supported the present study. This work was also supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

#### REFERENCES

Audus K.L. and Borchardt R.T. (1986) Characterization of an "in vitro" blood-brain barrier model system for studying drug transfer and metabolism. Pharm. Res. 3, 81-87.

Audus K.L., Bartel R.L., Hidalgo I.J. and Borchardt R.T. (1990) The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. Pharm. Res. 7, 435-451.

Booher J. and Sensenbrenner M. (1972) Growth and cultivation of dissociated neurones and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. Neurobiology 2, 97-105.

Bowman P.D., Ennis S.R., Rarcy K.E., Betz A.L. and Goldstein G.W. (1983) Brain microvessel endothelial cells in tissue culture : a model for study of blood-brain barrier permeability . Ann. Neurol. 14, 396-402.

DeBault L.E. and Cancilla P.A. (1980)  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells : induction by glial cells "in vitro". Science 207, 653-655.

Dehouck M.P., Méresse S., Delorme P., Fruchart J.C. and Cecchelli R. (1990) An easier, reproducible and mass production method to study the blood-brain barrier "in vitro". J. Neurochem. 54, 1798-1801.

Dehouck M.P., Jolliet-Riant P., Brée F., Fruchart J.C., Cecchelli R. and Tillement J.P. (1992a) Drug transfer across the blood-brain barrier : correlation between "in vitro" and "in vivo" models. J. Neurochem. 58, 1790-1797.

Dehouck M.P., Méresse S., Dehouck B., Fruchart J.C., Cecchelli R. (1992b) In vitro reconstituted blood-brain barrier. Journal of Controlled Release 21, 81-92.

Dehouck B., Dehouck M.P., Fruchart J.C. and Cecchelli R. (1994) Upregulation of the LDL receptor at the blood-brain barrier : intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. J. Cell Biol. 126, 465-473.

Folkman J., Haudenschild C.C. and Zetter B.R. (1979) Long-term cultures of capillary endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5217-5221.

Guillot F.L., Audus K.L. (1991) Angiotensin peptide regulation of bovine brain microvessel endothelial cell monolayer permeability. J. Cardiovasc. Pharmacol. 18, 212-218.

Guillot F., Misslin P. and Lemaire M. (1993) Comparison of fluvastatin and lovastatin bloodbrain barrier transfer using "in vitro" and "in vivo" methods. J. Cardiovascular Pharmacol. 21, 339-346.

Hidalgo I.J., Hillgren K.M., Grass G.M. and Borchardt (1989) Characterization of the aqueous boundary layer in caco-2 cells using a novel diffusion cell. Pharm. Res. 6 : S-114 (abstr PD950)

Joo F. (1992) The cerebral microvessels in culture, an update. J. Neurochem. 58, 1-17.

Lin T.H., Sawada Y., Sugiyama Y., Iga T. and Hanano M. (1987) Inhibition of blood-brain barrier permeability to DL-propranolol by serum from acute renal failure rats. Biochem. Pharmacol. 36, 3425-3431.

Méresse S., Dehouck M.P., Delorme P., Bensaïd M., Tauber J.P., Delbart C., Fruchart J.C. and Cecchelli R. (1989) Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. J. Neurochem. 53, 1363-1371.

Oldendorf W.H. (1970) Measurement of brain uptake of radiolabelled substances using tritiated water internal standard. Brain Res. 24, 372-376.

Pardridge W.M., Sakiyama R. and Fierer G. (1984) Blood-brain barrier transport and brain sequestration of propranolol and lidocaine. Am. J. Physiol. 247, R582-R588.

Pardridge W.M., Triguero D., Yang J. and Cancilla P.A. (1990) Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier. J. Pharmacol. Exp. Ther. 253, 884-891.

Raub T.J., Kuentzel S.L. and Sawada G.A. (1992) Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells "in vitro" : barrier tightening by a factor released from astroglioma cells. Exp. Cell Res. 199, 330-340.

Risau W. and Wolburg H. (1990) Development of the blood-brain barrier. Trends Neurosci. 13, 174-178.

Saheki A., Terasaki T., Tamai I. and Tsuji A. (1994) In vivo and in vitro blood-brain barrier transport of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors. Pharm. Res. 11, 305-311.

Shah M.V., Audus K.L. and Borchardt R.T. (1989) The application of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers grown onto polycarbonate membranes "in vitro" to estimate the potential permeability of solutes through the blood-brain barrier. Pharm. Res. 6, 624-627.

Siflinger-Birnboim A., Del Becchio P. J., Cooper J.A., Blumenstock F.A., Shepard J.N. and Malik A.B. (1987) Molecular sieving characteristics of the cultured endothelial monolayer. J. Cell. Physiol. 132, 111-117.

Spearman D. (1987) in Méthodes Statistiques à l'usage des Médecins et Biologistes (Schwartz D. ed) p.256. Flammarion Médecine Sciences, Paris.

Tsuji A., Tamai I., Sakata A., Tenda Y. and Terasaki T. (1993) Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, P-glycoprotein. Biochem. Pharmacol. 46, 1096-1099.

Van Bree J.B.M.M., De Boer A.G., Danhof M., Ginsel L.A. and Breimer D.D. (1988) Characterization of an "in vitro" blood-brain barrier : effects of molecular size and lipophilicity on cerebrovascular endothelial transport rates of drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 247, 1233-1239.

Van de Waterbeemd H. and Kansy M. (1992) Hydrogen-bounding capacity and brain penetration. Chimia 46, 299-303.

Zetter B.R. (1980) Migration of capillary endothelial cells is stimulated by tumor-derived factors. Nature 285, 41-43.

Zetter B.R. (1988) Endothelial heterogeneity : influence of vessel size, organ localization, and species specificity on the cultured endothelial cells. In Endothelial Cells.Vol II.Ryan Editor. CRC Press, Boca Raton, Florida. pp 63-79.

Drug or solute*	М	Specific Activity (µCi/mM)	Structural Class	
[ <sup>3</sup> H] Cyclosporine A	1 203	2.2 x 10 <sup>6</sup>	cyclosporin	
[ <sup>14</sup> C] SDZ ICM 567	314	5.67 x 10 <sup>4</sup>	indole amine	
[ <sup>14</sup> C] SDZ ICT 322	298	5.7 x 10 <sup>4</sup>	indole amine	
[ <sup>14</sup> C] SDZ ICS 930	284	5.2 x 10 <sup>4</sup>	indole amine	
[ <sup>14</sup> C] SDZ EAB 515	335	3.97 x 10 <sup>4</sup>	phosphoric acid derivative	
[ <sup>3</sup> H] SDZ HDC 912	360	1.93 x 10 <sup>6</sup>	aminoergoline	
[ <sup>3</sup> H] propranolol	259	22 x 10 <sup>6</sup>	ß-blocker	
[ <sup>14</sup> C] sucrose	342	15 x 10 <sup>3</sup>	disaccharide	
[ <sup>3</sup> H] inulin	5200	1.07 x 10 <sup>6</sup>	polyholoside	

Table 1. Drug molecular weight (M), specific activity and structural class

\* ICM 567, 7-methoxy-1H-indole-3-carboxylic acid-(1αH, 51αH)-8-methyl-8-aza-bicyclo[3.2.1]oct-3α-yl ester; ICT 322, 1H-indole-3-carboxylic acid-9-methyl-3-oxa-9aza-tricyclo[3.3.1.0<sup>2,4</sup>]non-7-yl ester, ICS 930, 1H-indole-carboxylic acid-(1αH, 51αH)-8-methyl-8-azabicyclo[3.2.1]oct-3α-yl ester hydrochloride; EAB 515, (S)-3phosphonomethyl-5-U-phenyl-phenylalanine; HDC 912, 2-chloro-8α-pivaloylamino ergoline.

	Pe values x 10	Et %	
Compound	Primary culture (BBME cells)	Coculture (BBCE cells)	
СуА	2.2	0.79	2
ICM	11.9	3.09	12
EAB	1.7	0.53	2
ICT	56.4	7.37	60
HDC	59.7	9.92	65
ICS	7.9	1.87	. 11
Propranolol	2.45	22.7	90
Inulin	0.98	0.37	2
Sucrose	1.9	0.75	2

Table 2. "In vitro" Pe values and "in vivo" brain extraction ratios Et

- Figure 1 : Clearance of [<sup>14</sup>C] ICM (○) across A) microvessel endothelial cells in primary culture or B) across capillary endothelial cells which have been cultivated in coculture with astrocytes. For each experiment filters coated with collagen were assessed (▲). Data are mean ± SEM (bars) values (8 filters for primary cultures, 3 filters for cocultures).
- Figure 2 : Correlations between "in vivo" and "in vitro" methods. The "in vivo" Et values were plotted against the "in vitro" Pe values obtained A) with primary cultures of microvessel endothelial cells or B) with capillary endothelial cell which have been cultivated in coculture with astrocytes.
- Figure 3 : Permeability values obtained with primary cultures of brain microvessels were plotted against permeability values obtained with cocultures. Data points (a) were used in linear regression analysis to generate the slope.



-110-





Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux cultivées avec des astrocytes présentent toutes les caractéristiques structurales et biochimiques de l'endothélium cérébral. Cette coculture permet l'étude in vitro du transport au travers de la BHE. Ce modèle in vitro, recréant les conditions in vivo, va nous permettre d'étudier les interactions entre la BHE et les lipoprotéines de basse densité.

Article 3 : Régulation de l'expression du récepteur aux lipoprotéines de basse densité au niveau de la barrière hémato-encéphalique : intercommunications entre les cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes

En phase exponentielle de croissance les cellules endothéliales fixent, internalisent et dégradent les LDL ; ceci par l'intermédiaire du récepteur apo(B,E) exprimé à leur surface. Elles acquièrent ainsi le cholestérol nécessaire pour la synthèse de leur membrane. L'expression du récepteur apo(B,E) est régulée par la concentration en lipoprotéine dans le milieu de culture. Elle est élevée dans un milieu dépourvu de lipoprotéine et, au contraire, réduite en présence d'une forte concentration de LDL. La cellule en contrôlant la synthèse de ce récepteur, s'adapte ainsi au milieu extracellulaire afin de subvenir à ses besoins en cholestérol.

Lorsque les cellules endothéliales sont à confluence, c'est à dire apposées les unes aux autres, elles cessent de croître et forment une monocouche. Ce phénomène, appelé inhibition de contact, est accompagné d'une réduction du métabolisme des LDL par les cellules endothéliales (Kenagy et al., 1984). Les cellules n'ayant plus besoin de cholestérol, n'expriment plus le récepteur apo(B,E).

In vivo, lorsqu'un endothélium vasculaire est intact, l'expression du récepteur apo(B,E) est inhibée à la fois par la présence de lipoprotéines dans le plasma et par la confluence des cellules endothéliales. En dépit de ces deux facteurs, l'endothélium des capillaires cérébraux exprime un récepteur apo(B,E) (Méresse et al., 1989).

Comme nous l'avons montré précédemment, la mise en place et le maintien des propriétés de la BHE sont induits par l'environnement cérébral. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'influence des astrocytes sur l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

Ces études sont effectuées sur un modèle in vitro de BHE consistant en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes (Figure 29). La réalisation de ce modèle est décrite dans l'article 1. Les cellules endothéliales sont ensemencées sur filtre, les astrocytes sur le plastique d'une boîte de six puits. Ainsi les deux types de cellules peuvent être facilement séparées.

Expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux : influence des astrocytes

Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux cultivées seules présentent à leur surface un récepteur apo(B,E). Lorsqu'elles sont cocultivées avec les astrocytes, l'expression de ce récepteur est trois fois plus élevée (article 3, Fig. 3). Les astrocytes modulent donc l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales de capillaires cécrébraux.

Il a été montré que les astrocytes, comme les autres cellules de notre organisme, fixent et internalisent les lipoprotéines, afin de subvenir à leurs besoins en cholestérol (Pitas et al., 1987).

Les astrocytes déprimés en cholestérol influencent-ils l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux ?

# Induction de l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

Les astrocytes cocultivés avec les cellules endothéliales de capillaires cérébraux, sont incubés 36 heures dans un milieu dépourvu en lipoprotéines (article 3, Fig. 1). Ils sont ensuite replacés, avec leur milieu d'incubation, en présence des cellules endothéliales. Les astrocytes déprimés en cholestérol augmentent l'expression du récepteur à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux (article 3, Fig. 5).

Le milieu conditionné d'astrocytes déprimés en cholestérol a un effet similaire, indiquant que le signal d'induction est une substance diffusible sécrétée par les astrocytes. Le poids moléculaire de ce(s) facteur(s) est compris entre 3500 et 14000 Da.

#### Spécificité du signal d'induction

Des cellules de muscle lisse incubées dans un milieu dépourvu en lipoprotéines ne sécrètent pas le(s) facteur(s) permettant l'induction du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. De même les atrocytes cocultivés avec des cellules endothéliales d'aorte de bœuf et déprimés en cholestérol n'induisent pas l'augmentation de l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface de ces cellules endothéliales. Ainsi l'induction du récepteur apo(B,E) est spécifique des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et des astrocytes.

Les astrocytes cultivés seuls n'induisent pas l'augmentation de l'expression du récepteur apo(B,E) sur l'endothélium cérébral. Seuls les astrocytes préalablement cocultivés avec les cellules endothéliales des capillaires cérébraux, sécrètent le signal d'induction (article 3, Fig. 8). L'intercommunication entre les cellules

endothéliales et les astrocytes sont nécessaires à l'induction de l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface de l'endothélium cérébral.

Par contre le(s) facteur(s) d'induction obtenu dans des conditions favorables, permet l'induction de l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface d'autres cellules (article 3, Fig. 10).

•

•

### Upregulation of the Low Density Lipoprotein Receptor at the Blood–Brain Barrier: Intercommunications between Brain Capillary Endothelial Cells and Astrocytes

#### Bénédicte Dehouck,\* Marie-Pierre Dehouck,\* Jean-Charles Fruchart,\* and Roméo Cecchelli\*‡

\* Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U325 Service d'Etude et de Recherche sur les Lipoprotéines et l'Atherosclérose, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex, France; and <sup>‡</sup>Université des Sciences et Technologies de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Abstract. In contrast to the endothelial cells in large vessels where LDL receptors are downregulated, brain capillary endothelial cells in vivo express an LDL receptor. Using a cell culture model of the blood-brain barrier consisting of a coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes, we observed that the capacity of endothelial cells to bind LDL is enhanced threefold when cocultured with astrocytes. We next investigated the ability of astrocytes to modulate endothelial cell LDL receptor expression. We have shown that the lipid requirement of astrocytes increases the expression of endothelial cell LDL receptors. Experiments with dialysis membranes of different

ELLS acquire cholesterol for membrane synthesis primarily by receptor-mediated uptake of LDL, which is internalized and delivered to lysosomes. LDL is then degraded and cholesterol is released to be used by the cells (Brown et al., 1981). These receptors appear to be regulated by a feedback mechanism responsive to the availability of LDL in the surrounding medium. These authors have suggested that LDL suppresses the synthesis of new receptor sites. In vivo, normal circulating concentration of lipoproteins downregulates the LDL receptor levels on vascular endothelial cells (ECs).<sup>1</sup>

Studies in situ indicate that the endothelial cells of the major vessel are highly contact inhibited, and that cell division takes place slowly, if at all, except in response to endothelial injury. Contact inhibition also leads to downregulation of LDL receptors.

A number of different studies have confirmed that growing ECs in culture also bind LDL (Vlodavsky et al., 1978). Kenagy et al. (1984) have found that the decreased ability of the LDL receptor of confluent ECs to degrade LDL is the

pore size showed that this effect is mediated by a soluble factor(s) with relative molecular mass somewhere between 3,500 and 14,000. Substituting astrocytes with smooth muscle cells or brain endothelium with endothelium from the aorta or the adrenal cortex did not enhance the luminal LDL receptor expression on endothelial cells, demonstrating the specificity of the interactions. This factor(s) is exclusively secreted by astrocytes cocultured with brain capillary endothelial cells, but it also upregulates the LDL receptor on other cell types. This study confirms the notion that the final fine tuning of cell differentiation is under local control.

result of the loss of LDL receptor activity. This decrease was also observed with fibroblasts and smooth muscle cells when they were cultured in complete medium containing serum and at confluence.

In contrast to what was observed with large vessels in vivo (Vasile et al., 1983) and in culture (Kenagy et al., 1984), we have shown (Méresse et al., 1989b) that confluent brain capillary ECs express an LDL receptor in vivo. This receptor exhibits the same characteristic properties as the LDL receptor on human fibroblasts (Goldstein and Brown, 1977). In addition, we have shown that cultured brain capillary ECs have LDL receptors with the same apparent molecular weight as in vivo (Méresse et al., 1991). How can we explain the difference between brain capillary ECs and peripheral ECs? ECs in different locations exhibit varying properties well suited to functional interactions between the blood and the underlying tissues (Fishman, 1982; Zetter, 1984). Brain capillary ECs, which constitute the blood-brain barrier, are sealed together by high electrical resistance tight junctions, and they display a low rate of transcellular vesicular transport (Reese and Karnovsky, 1967). These barrier properties contribute to the maintenance of the homeostasis of brain interstitial fluid (Brightman, 1989). In recent years, the manner in which capillary ECs in the brain become different from those in the periphery has been examined and the crucial role of the environment in which they grow has been

<sup>1.</sup> Abbreviations used in this paper: ABAE, aortic bovine arch endothelial cells; ACE, adrenal cortex endothelial cells; AUF, astrocyte-regulating LDL receptor factor; BCECs, brain capillary endothelial cells; CS, calf serum; ECs, endothelial cells; GFAP, glial fibrillary acidic protein; LPDS, lipoprotein-deficient serum; SMC, smooth muscle cells.

demonstrated (Stewart and Wiley, 1981). Astrocytes, the nearest neighbor of brain capillaries, have been shown to induce some of the specialized properties of ECs (Janzer and Raff, 1987). In attempts to investigate such interactions, we have developed an in vitro model of the blood-brain barrier that imitates an in vivo situation by culturing brain capillary ECs and astrocytes on opposite sides of a filter (Dehouck et al., 1990a, 1992).

To understand why brain capillary ECs express LDL receptors in spite of the tight apposition of ECs and their contact with high concentrations of lipoproteins, we have investigated the capacity of astrocytes to modulate the expression of the LDL receptor on brain capillary ECs. We document specific EC-astrocyte interactions, and we propose that a soluble factor(s) derived from astrocytes modulates LDL receptor expression at the luminal surface of the brain capillary endothelium.

#### Materials and Methods

#### Cell Culture

Bovine Brain Capillary ECs. Brain capillary ECs were isolated and characterized as described by Méresse et al. (1989a). The use of cloned endothelial cells enables us to obtain a pure endothelial cell population without contamination by pericytes. The cells were cultured in the presence of DME supplemented with 15% (vol/vol) heat-inactivated calf serum (Hyclone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 50  $\mu$ g/ml gentamycin, and basic fibroblast growth factor (1 ng/ml added every other day).

Bovine Aortic ECs. Bovine aortic ECs were isolated and characterized as described by Dehouck et al. (1990b).

Bovine Adrenal Cortex Endothelial Cells (ACE). ACE were isolated and characterized as described by Gospodarowicz et al. (1986). ACE (a gift from Dr. S. Saule, Molecular Oncology Laboratory, Institut Pasteur, Lille, France) were cultured as the bovine brain capillary endothelial cells were.

Rat Astrocytes. Primary cultures of mixed astrocytes were made from newborn rat cerebral cortex. After the meninges had been removed, the brain tissue was gently forced through a nylon sieve, as described by Booher and Sensenbrenner (1972). Astrocytes were plated on six multiwell dishes (Nunclon; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) at a concentration of  $1.2 \times 10^5$ cells/ml in 2 ml of DME supplemented with 10% FCS (Hyclone Laboratories), and the medium was changed twice a week. 3 wk after seeding, cultures of astrocytes stabilized and were used for experiments. The astrocytes were characterized with glial fibrillary acidic protein (GFAP), and >95% of the population was GFAP positive (Dehouck et al., 1990b).

Coculture of Endothelial Cells and Astrocytes. Filters were prepared for coculture as follows: Culture plate inserts (Millicell-CM 0.4  $\mu$ m, 30-mm diameter; Millipore Corp., Bedford, MA) were coated on the upper side with rat tail collagen prepared by a modification of the method of Bornstein (1958).

Experimental methods proceeded as follows: Cultures of astrocytes were prepared as described above. After 3 wk, coated filters were set in six multiwell dishes containing astrocytes, and ECs were plated on the upperside of the filters in 1.5 ml of medium with a concentration of  $4 \times 10^5$  cells/ml for bovine brain capillary ECs and bovine adrenal cortex ECs. Bovine aortic ECs were plated at the concentration of  $2 \times 10^4$  cells/ml. The medium used for the coculture was DME supplemented with 15% calf serum (CS), 2 mM glutamine, 50 µg/ml gentamycin, and 1 ng/ml basic fibroblast growth factor added every other day. This medium was changed every other day. Under these conditions, ECs form a confluent monolayer after 7 d. Experiments were performed 5 d after confluence. This arrangement readily permits the use of different cell types, which were separated easily after coculture by removing the insert.

Bovine Aortic Smooth Muscle Cells (SMC). SMC were isolated and characterized as described by Dehouck et al. (1990b).

# Preparation of LDL, Acetylated LDL, and Lipoprotein-deficient Serum

LDL was isolated from human plasma by sequential ultracentrifugation at

the densities of 1.03–1.053. The densities were adjusted using solid KBr. The LDL was extensively dialyzed at 4°C against 0.15 M NaCl. Acetylated LDL was prepared by treating LDL with acetic anhydride (Basu et al., 1976). LDL was radioiodinated as described by Bilheimer et al. (1972). After labeling, the LDL was chromatographed on a PD10 column (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) and extensively dialyzed at 4°C against 0.15 M NaCl and 0.01% EDTA (pH 7.4). The specific activity of [<sup>125</sup>]-LDL, which was used within 10 d of preparation, ranged from 300 to 400 cpm/ng protein. Lipoprotein-deficient serum (LPDS) was prepared from FCS by ultracentrifugation at the density of 1.25 adjusted with solid KBr. LPDS was extensively dialyzed at 4°C against 0.15 M NaCl.

#### [<sup>125</sup>I]LDL Binding

Cells were incubated for 2 h at 4°C with DME, 10 mM Hepes, 0.2% BSA, and the indicated concentrations of [<sup>125</sup>I]LDL. At the end of the incubation, the cells were washed nine times at 4°C: three times with 4 ml of PBS (Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>), three times with 4 ml of PBS (Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>) containing 0.2% BSA, three times with 4 ml of PBS (Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>). Then, endothelial cell associated radioactivity was determined by removing the membrane of the culture insert and counting it in a gamma counter. Astrocytes cultured on the plastic were solubilized in 1 ml of 0.1 N NaOH, and aliquots were taken for measurements of radioactivity and protein concentrations. Nonspecific binding was determined by incubating the cells with [<sup>125</sup>I]LDL and a 20-fold excess of unlabeled LDL. The same protocol was followed for acetylated LDL binding.

Inhibition of cell surface binding of  $[^{125}I]LDL$  to brain capillary ECs at 4°C by the monoclonal antibody, designated immunoglobulin C-7 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) (Beisiegel et al., 1981) was achieved by incubating it in the same medium as the ECs at a concentration of 1 mg/ml. IgG directed against apolipoprotein AI at the same concentration was used as a control.

#### Studies of the Regulation of LDL Receptor

The induction of LDL receptor expression can be described in four phases (Fig. 1):

Coculture Phase. Brain capillary ECs and astrocytes were cocultured for 12 d in DME supplemented with 15% CS as described above.



Figure 1. Experimental procedure for the upregulation experiments. The induction of LDL receptor expression can be described in four phases: (Coculture phase) Brain capillary ECs and astrocytes were cocultured for 12 d in DME supplemented with 15% CS. (Astrocyte LPDS phase) ECs were transferred and cocultured with other astrocytes in DME supplemented with 15% CS. Astrocytes of the initial coculture were incubated for 36 h at 37°C with DME supplemented with 10% LPDS, 2 mM glutamine, and 50 µg/ml gentamycin. As a control, the incubation of astrocytes was performed with DME supplemented with 10% FCS. (Induction phase) On the day of the experiment, brain capillary ECs in DMEM supplemented with 15% CS were cocultured for different times at 37°C with cholesterol-depleted astrocytes in their 36-h LPDS incubating medium. (LDL Binding phase) After the induction phase, specific [<sup>125</sup>I]LDL binding to ECs was performed at 4°C, at the concentration of 45  $\mu$ g/ml of [<sup>125</sup>I]LDL as described under the experimental brain capillary endothelial cells (BCECs); AA, astrocytes.

Induction phase. On the day of the experiment, the filter inserts with ECs, in 1.5 ml of fresh DME supplemented with 15% CS, were moved to a well that contained astrocytes in their 36-h LPDS-conditioned medium. The cells were incubated together for different times at 37°C

LDL Binding Phase. After the "induction phase," specific [1251]LDL or <sup>125</sup>I-acetylated LDL bindings to ECs were performed at 4°C as described above. The induction phase was modified in two experiments: (a) brain capillary ECs were separated from cocultured astrocytes by a dialysis bag with a cut-off molecular weight of either 3,500 or 14,000 (see Fig. 7); (b) luminal medium contained 10 µg/ml cycloheximide (Sigma Immunochemicals, St. Louis, MO). In some experiments, the same protocol was followed, but bovine aortic ECs or bovine adrenal cortex ECs were plated instead of brain capillary ECs or SMC instead of astrocytes.

#### **Cholesterol Concentration of Astrocytes**

The concentration of cholesterol in astrocytes was determined by high pressure liquid chromatography using a reversed phase C-18 column as described by Barbaras et al. (1986).

#### Results

#### Coculture of Endothelial Cells and Astrocytes

Fig. 2 a illustrates the structure of confluent bovine brain capillary ECs cultured on an insert coated with collagen. ECs form a monolayer of small, tightly packed, nonoverlapping and contact-inhibited cells. This culture is a pure endothelial cell population without contamination by pericytes. The astrocytes were characterized with GFAP. As shown in Fig. 2 b,  $\sim 95\%$  of the cell bodies and the processes of the astrocytes were stained.

#### Binding of LDL to Brain Capillary ECs

Labeled LDL bound with saturation kinetic on brain capillary ECs cultured alone or cocultured with astrocytes in 15% CS, in contrast to what was observed on aortic endothelial cells (Fig. 3). By Scatchard analysis, the data indicate the presence of a single binding site with an apparent  $K_d$  of 90 nM for ECs cultured alone and 43 nM for ECs cocultured

Figure 2. (a) Phase contrast micrograph of confluent brain capillary endothelial cells grown on the upper face of a collagen-coated filter. (b) Immunolabeling of a coculture of astrocytes with the anti-GFAP serum. Bars, 30  $\mu$ m.





Figure 3. LDL binding to endothelial cells. Brain capillary ECs were cultured in the presence ( $\odot$ ) or in the absence ( $\odot$ ) of astrocytes for 12 d in DME supplemented with 15% CS. LDL binding was performed on ECs at 4°C as described under the experimental procedures. These data are compared with LDL binding on confluent aortic ECs ( $\bigtriangleup$ ). (*Inset*) Scatchard analysis of the binding data to brain capillary ECs. *B*, bound; *B/F*, bound/free.

with astrocytes. However, the maximal binding was higher (358 ng LDL/mg protein) when the ECs were cocultured with astrocytes than when they were cultured alone (215 ng LDL/mg protein).

The C7-monoclonal antibody, known to interact with the receptor binding domain, totally blocked the binding of LDL to bovine brain capillary ECs. Control irrelevant IgG had no effect on LDL binding (results not shown), suggesting that binding on endothelial cells is mediated by the receptor.

These results indicate that brain capillary ECs at confluence, cultured in a medium containing lipoproteins, express LDL receptors in contrast to what was observed on aortic ECs. Furthermore, there was an increase in the number of the LDL receptors on brain capillary ECs in the presence of astrocytes. Since LDL serves as the principal carrier of exogenous cholesterol to peripheral tissues (Fredrickson et al., 1967), it is possible that the cholesterol content of astrocytes modulates LDL receptor expression on brain capillary ECs.

## Cholesterol Content and Binding of LDL on Astrocytes

The ability of the cultured astrocytes to bind and internalize lipoproteins was shown by Pitas et al. (1987). The pretreatment of astrocytes with LPDS led to a time-dependent increase in the binding of [1251]LDL to the cells (Fig. 4), indicating that the cells have modified their metabolism to obtain more exogenous cholesterol. Furthermore, HPLC analysis shows a 32% decrease of the cholesterol content of astrocytes (27.00  $\pm$  3.37  $\mu$ g cholesterol/mg protein vs 39.25  $\pm$  4.03  $\mu$ g cholesterol/mg protein, n = 6), when they were incubated at 37°C for 36 h in LPDS.

#### Upregulation of the LDL Receptor

To investigate the role of the astrocytes in the regulation of the binding of LDL to ECs, the experiments described in



Figure 4. Specific binding of LDL to astrocytes incubated with lipoprotein deficient serum. After maturation (3 wk), astrocytes were incubated at 37°C for indicated times with DME supplemented with 10% LPDS, 2 mM glutamine, and 50  $\mu$ g/ml gentamycin. At the end of the incubation, [<sup>125</sup>I]LDL binding was performed at a concentration of 30  $\mu$ g/ml of [<sup>125</sup>I]LDL, as described under the experimental procedures. The results are representative of three series of independent experiments.

Fig. 1 were performed. Brain capillary ECs and astrocytes were cocultured for 12 d in a medium containing 15% CS. 36 h before the binding experiments, ECs were transferred onto other astrocytes, and the astrocytes of the coculture were cultured for 36 h in a medium containing 10% LPDS to modify the intracellular metabolism of these cells. After this period, brain capillary ECs and cholesterol-depleted astrocytes in their conditioned medium were again cocultured, and the binding of radiolabeled LDL was performed. As shown in Fig 5, increased binding of lipoproteins was already manifested 3 h after coculture of the two cell types at 37°C, and the maximum effect (600% of the control binding) was observed at 4 and 5 h. When brain capillary ECs were incubated with cycloheximide during the "induction phase," no increase in LDL receptor expression was observed (data not shown). The toxicity of cycloheximide was assessed by calculating the permeability of sucrose and inulin of the monolayer (Dehouck et al., 1992). No effect of cycloheximide at the concentration of 10  $\mu$ g/ml was observed.

#### Preliminary Characterization of the Astrocyte Upregulation LDL Receptor Factor(s) (AUF)

Since these effects in coculture were mediated through a filter that prevented direct cell-cell contact, we hypothesized that soluble factor(s) derived from astrocytes were responsible for inducing the upregulation of the LDL receptor. To test this hypothesis, brain capillary ECs and astrocytes were cocultured for 12 d. 36 h before the binding, brain capillary ECs were transferred onto other astrocytes, and the astrocytes of the original cocultures were fed with a medium containing 10% LPDS. When the astrocyte-conditioned medium was added to the abluminal side of brain capillary ECs, and the ECs were cultured for different times at 37°C, we ob-

2.000 (i) 1.500 1.500 500 500 1 2 3 4 5 Induction time (h)

Figure 5. Upregulation of LDL receptor on brain capillary ECs. Specific binding of LDL at 4°C to brain capillary ECs: the upregulation was performed as described in Fig. 1, with astrocytes fed for 36 h with LPDS ( $\Box$ ). The control was the binding of LDL to ECs cocultured with astrocytes fed with serum ( $\blacksquare$ ), during the "astrocyte LPDS phase." The curves are representative of six series of independent experiments.

served an increase (300%) in the LDL binding at 4°C after 4 or 5 h incubation (Fig. 6).

An estimate of the molecular weight of the AUF(s) was obtained by the following experiments. The astrocytes were cocultured with brain capillary ECs for 12 d. Then they were fed for 36 h with a medium containing 10% LPDS. During



Figure 6. Upregulation of LDL receptors on brain capillary ECs by astrocyte-conditioned medium. Specific binding of LDL at 4°C to brain capillary ECs: the upregulation was performed as described in Fig. 1, but during the induction phase, only the conditioned medium was added to the abluminal face of brain capillary endothelial cells (BCECs). LDL binding was performed to BCECs after incubation at 37°C in the presence of the conditioned medium obtained from astrocytes in LPDS ( $\Delta$ ) or as a control in FCS ( $\Delta$ ). The results are representative of three series of independent experiments.



Figure 7. Preliminary characterization of soluble factor(s) secreted by astrocytes. Specific binding of LDL at 4°C to brain capillary ECs: the upregulation was performed as described in Fig. 1, but during the induction phase the two cell types were separated by cut off dialysis bags of 3,500 or 14,000 mol wt. BCECs were incubated during the induction phase with astrocytes fed with LPDS, with or without a dialysis bag (2), or with astrocytes fed with FCS ( $\square$ ) as a control. The results are representative of two series of independent experiments.

the induction experiment, dialysis bags with a variable cutoff were used to separate the two cell types. No increase of LDL receptor expression was observed in the coculture with a cut-off membrane of 3,500. In contrast, the upregulation was observed in the coculture with a cut-off membrane of 14,000 (Fig. 7).

#### Specificity of the Upregulation

To test the cell-cell specificity of these observations, similar experiments were performed with aortic ECs or adrenal cortex ECs, SMC instead of brain capillary ECs, and astrocytes, respectively. Under these conditions, no upregulation on aortic ECs and adrenal cortex ECs was observed when the astrocytes were cultured in LPDS for 36 h (data not shown). Similarly, SMC did not induce an upregulation of LDL receptors on brain capillary ECs (data not shown). Interestingly, when astrocytes cultured alone were fed with LPDS during 36 h and then cocultured with brain capillary ECs that had been cocultured for 12 d with other astrocytes, no upregulation of LDL receptors was observed on brain capillary ECs (Fig. 8). Considered together, these results indicate that the 12 d of the coculture are necessary for enhanced LDL binding. Reciprocal communications between ECs and astrocytes are required to activate the mechanism of the upregulation during the coculture phase.

Furthermore, when binding of acetylated LDL is performed instead of LDL to brain capillary ECs, no upregulation of the scavenger receptor occurs (Fig. 9).

#### Response of Other Cell Types to AUF(s)

Since the secretion of AUF(s) requires reciprocal communications between brain capillary endothelial cells and astro-



Figure 8. Interaction between brain capillary ECs and astrocytes during the "coculture phase." The upregulation was performed as described in Fig. 1, but astrocytes depleted in cholesterol were not cocultured with BCECs; they were cultured alone. Specific [<sup>125</sup>I]LDL binding was performed to BCECs incubated with astrocytes either cocultured with BCECs ( $\odot$ ) or cultured alone ( $\bullet$ ).

cytes, the generality of the upregulatory effect of this AUF(s) was tested on other cell types. Astrocytes and brain capillary ECs were grown in coculture for 12 d. Aortic ECs were cultured alone in a medium containing 15% calf serum. Astrocytes, cocultured with brain capillary ECs, were fed for 36 h in a medium containing 15% LPDS. These astrocytes were then cocultured with aortic ECs. No specific binding was observed on aortic ECs cultured alone, but we could see a large increase in the specific binding of the LDL to the aortic ECs when they were in the presence of cholesterol-depleted astrocytes (Fig. 10). The same results were observed when the ex-



Figure 9. Upregulation of the scavenger receptor on brain capillary ECs. The upregulation was performed as described in Fig. 1. BCECs were incubated for 5 h with astrocytes fed with LPDS ( $\square$ ) or as a control with FCS ( $\square$ ). Then specific binding of either LDL or acetylated LDL to brain capillary ECs was performed.



Figure 10. Upregulation of LDL receptor expression on aortic endothelial cell surface. Specific LDL binding to aortic bovine arch endothelial cells (ABAE) after induction of LDL receptor expression: coculture of BCECs and astrocytes and "solo" culture of ABAE were performed. 36 h before the experiment, astrocytes from the coculture were incubated at 37°C with DME supplemented with LPDS or with FCS as a control; then ABAE were incubated for indicated times at 37°C with treated astrocytes and LDL binding was performed to ECs. ABAE were incubated with astrocytes fed for 36 h with LPDS ( $\Xi$ ) or with FCS ( $\Xi$ ). The results are representative of two series of independent experiments.

periments were performed with SMC instead of aortic ECs (data not shown).

#### Discussion

The development of this type of coculture system enables the reconstruction of some of the complexities of the cellular environment that exist in vivo while retaining the experimental advantages associated with tissue culture. Thus, the culture medium is shared by both cell populations, allowing humoral interchange without direct cell contact.

#### LDL Binding to Brain Capillary ECs

In contrast to what was observed on ECs from large vessels, labeled LDL bound specifically to brain capillary ECs that were 5 d postconfluence (as visualized by phase contrast microscopy) and in the presence of a medium containing 15% calf serum. Scatchard analysis of the binding data was used to calculate the  $K_d$  for LDL. These data revealed, for the culture with or without astrocytes, the presence on brain capillary ECs of a single class of high affinity LDL binding sites with a  $K_d$  of the order of nM. This estimate of affinity is similar to that reported by Vlodasky et al. (1978) in bovine aortic ECs cultured in lipoprotein deficient serum ( $K_d = 27$ nM). We have determined (Méresse et al., 1991) by ligand blotting that ECs in culture express an LDL receptor with the same apparent molecular weight as that in vivo (132,000 D). This receptor exhibits the same characteristic properties as the LDL receptor on human fibroblasts (Goldstein and Brown, 1977). Furthermore, we have shown that an antibody raised against the binding site of the LDL receptor of human fibroblasts (Beisiegel et al., 1981) totally blocks the binding of LDL to bovine brain capillary ECs. These results indicate that we are dealing with an LDL receptor. This LDL receptor was present at the luminal side of ECs. Indeed, labeling of the abluminal receptor could be ruled out, since tight junctions, very well developed in our coculture (Dehouck et al., 1990a), prevent [125]]LDL leak into the abluminal compartment when the experiment is performed at 4°C (data not shown). Since aortic ECs and adrenal cortex ECs cultured in the same medium do not express this LDL receptor at confluence, the culture medium used could not have been responsible for the absence of downregulation observed with brain capillary ECs. This discrepancy may be related to the origin of the ECs (brain capillaries) because several authors have shown that capillary ECs differ from the ECs of other vessels in their biochemical and functional characteristics (Zetter, 1988). The uniqueness of these ECs was previously demonstrated in our laboratory when we showed that angiogenin was mitogenic only for brain capillary ECs (Chamoux et al., 1991).

Our findings also showed that the capacity of ECs to bind LDL is greater when cocultured with astrocytes than in their absence. It is well known that astrocytes are capable of influencing the differentiation of brain ECs in culture, as they are in vivo. Like other cells in the body, astrocytes possess an apo (B, E) receptor, and at the cellular level, this receptor provides a regulated mechanism for supplying cells with cholesterol (Volpe et al., 1978; Pitas et al., 1987). As demonstrated by HPLC analysis and labeled LDL binding, when a complete serum-containing medium was changed to a medium containing 10% LPDS 36 h before the binding experiments, the cholesterol content of the astrocytes was depleted, and the expression of the apolipoprotein (B, E) receptors was upregulated. Under these conditions, we investigated the cholesterol content of astrocytes to see if it modulated the expression of the LDL receptor on the luminal side of brain capillary ECs. In further experiments, astrocytes were incubated for 36 h in LPDS because, after 48 h, cell lysis could be detected in the incubation medium by the determination of the release of lactate dehydrogenase (results not shown).

#### Upregulation of the LDL Receptor

When astrocytes were pre-incubated in lipoprotein-deficient medium before the induction phase, binding of LDL to endothelial cells was increased a further sixfold. The direct action of LPDS on ECs could be ruled out because LPDS did not increase the LDL binding in 5 h (results not shown). Indeed, the direct action of LPDS on endothelial cells is very well known, and lipoprotein receptor activity of EC is upregulated by exposure to LPDS after a minimum of 24 h. In our experimental conditions, only the albuminal face was in contact with LPDS, and furthermore, upregulation experiments performed with SMC plated instead of astrocytes, or with astrocytes not cocultured with brain capillary ECs, did not enhance LDL receptor expression, even if astrocytes were fed with LPDS during the induction phase. This result indicates that the lipid requirement of astrocytes modulates the expression of endothelial cell LDL receptors. It is well established that coculturing ECs with primary glial cultures results in marked changes of several endothelial parameters. which suggests that several structural and functional characteristics of cerebral capillaries are determined by the surrounding astrocytes (Joó, 1992). For example, Cancilla and DeBault (1983) have already shown that the proximity in vitro of astrocytes enhances the uptake of neutral amino acids by ECs. These modifications result from specific interactions between brain capillary ECs and brain parenchyma (Risau et al., 1986; Stewart and Wiley, 1981). In our case, we have also shown this kind of specific interaction because substituting astrocytes with smooth muscle cells in coculture did not enhance the expression of the LDL receptors on brain capillary ECs. Moreover, when aortic ECs, originating from peripheral large vessels, or adrenal cortex ECs, originating from peripheral microvessels, were cocultivated with astrocytes, no effect on the upregulation of the LDL receptors was observed when astrocytes were fed with LPDS. Thus, the two close neighbors in vivo, brain endothelium and astrocytes, interact specifically in vitro to induce the expression of the LDL receptor at the luminal side of brain capillary ECs. Furthermore, astrocytes cultured alone do not upregulate LDL receptors on brain capillary ECs during the induction phase. This indicated that a cross-talk takes place between brain capillary ECs and astrocytes during the coculture. The observations that brain ECs can increase the incidence of intramembraneous particle arrays in astrocytes (Tao-Cheng et al., 1990) are in agreement with our results showing that endothelial cells can in turn induce changes in associated glia. The nature of the signal is not known, but Estrada et al. (1990) have shown that a peptide with molecular weight >50,000 derived from cerebral capillary ECs could be involved in the local signaling between cell types that control new vessel formation in development (i.e., brain capillary ECs and astrocytes). These results could explain why with our model, a conditioned medium of astrocytes cultured "alone" did not increase the  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase activity and the electrical resistance of the brain capillary endothelial cell monolayer (Dehouck et al., 1990a).

Furthermore, although brain capillary ECs bind specifically acetylated LDL, astrocytes cocultured with brain capillary ECs for 12 d and fed with LPDS cannot upregulate scavenger receptor expression on brain capillary ECs surface. So, the AUF seems to regulate LDL receptor expression specifically.

#### AUF(s).

Since these effects were mediated through a filter that prevents direct cell-cell contact, we examined the possible involvement of a soluble factor(s) in this phenomenon. The significant conclusion from the cholesterol-depleted astrocyte conditioned medium experiments is that a soluble factor(s) is involved in the upregulation mechanism. As already stated for the upregulation of the LDL receptor, the molecule(s) could not be a product of the cell lysis that could occur during the incubation with LPDS. The fact that the upregulation is lower when the astrocyte conditioned medium was used could be explained by the secretion of an unstable molecule(s) by astrocytes. The secretion of this factor requires cocultured cells, indicating that the reciprocal differentiation of both cell types might happen. The experiments using dialysis bags allowed only factor(s) with molecular

weights between 3,500 and 14,000 to diffuse to the brain capillary ECs. Since these EC-astrocyte effects are a crossspecies (bovine-rat), it is likely to be a fundamental property of the two cell types. AUF liberation is specific and occurs only with cocultured brain capillary endothelial cells and astrocytes.

The experiments using conditioned medium clearly demonstrate that coculture increases the probability of detecting the effects of a short-lived agent produced by astrocytes. That is why we carried out tests to find out if AUF(s), secreted by differentiated astrocytes in the presence of brain capillary ECs, could upregulate the LDL receptor activity in other cell types. The results showed that the AUF(s) secreted by astrocytes triggered the appearance of specific binding on aortic ECs and smooth muscle cells, even when they were cultured at confluence and in the presence of a high concentration of lipoproteins. The ability of the conditioned medium to upregulate receptor levels on other cell types gives us more information about the AUF effect. Indeed, aortic ECs and smooth muscle cells have no intracellular pool of LDL receptor; so an increase in LDL receptor expression requires new synthesis of this receptor. Furthermore, the AUF has no effect if ECs are incubated with cycloheximide. Cycloheximide, known to inhibit peptidyl transferase on eukaryiotic large ribosomal subunit, and therefore protein synthesis in the cell, also inhibits the upregulation of LDL receptor expression. These results show that the upregulation is caused by new synthesis of the LDL receptor. Our hypothesis is that the AUF could act on brain capillary endothelial cells and allow the production of a transcriptional factor. The chemical nature of AUF(s) is under investigation.

In conclusion, taken together, these experiments indicate that the occurrence of the LDL receptor on brain capillary endothelial cells at confluence and in the presence of a high concentration of lipoproteins could be explained not only by the originality of the cell type used (brain capillary endothelial cells), but also by the local control of astrocytes. This study confirms the notion that endothelial cells generally not express their final destination-specific differentiated features until these features are induced by local, environment-produced conditions.

Pitas et al. (1987) have proposed a model for cholesterol transport and homeostasis within the central nervous system. Apolipoprotein E, secreted by astrocytes within the brain, transports and redistributes cholesterol via brain interstitial fluid to cells that require cholesterol and express apolipoprotein B,E (LDL) receptors (Hofman et al., 1987). Our results integrated into this model, and they strongly suggest that the cerebral endothelial receptor plays a role in cholesterol transport across the blood-brain barrier. Additional studies are underway to determine if, after binding, lipoproteins are degraded by the endothelial cells or transcytosed in the underlying nervous tissue.

This work was partly supported by a grant from the Association Recherche et Partage.

Received for publication 13 July 1993 and in revised form 11 April 1994.

#### References

- Barbaras, R., P. Grimaldi, R. Négrel, and G. Ailhaud. 1986. Characterization of high-density lipoprotein binding and cholesterol efflux in cultured mouse adipose cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 845:492-501.
   Basu, S. K., J. M. Goldstein, R. G. W. Anderson, and M. S. Brown. 1976. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of choles-
- terol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 73:493-502.
- Beisiegel, U., W. J. Schneider, J. L. Goldstein, R. G. W. Anderson, and M. S. Brown. 1981. Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probe for study of receptor mediated endocytosis and the genetics of
- familial hypercholesterolemia. J. Biol. Chem. 256:11923-11931.
  Bilheimer, D. W., S. Eisenberg, and R. I. Levy. 1972. The metabolism of very low density lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta. 260:212-221.
- Booher, J., and M. Sensenbrenner. 1972. Growth and cultivation of dissociated neurons and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. Neurobiology. 2:97-105
- Bornstein, M. B. 1958. Reconstituted rat tail collagen used as substrate for time tissue cultures on coverslips in Maximow slides and roller tubes. Lab. Invest. 7:134-139
- Brightman, M. W. 1989. The anatomic basis of the blood-brain barrier. In Implications of the Blood-Brain Barrier and Its Manipulation. Vol. 1. Basic Sciences Aspects. E. A. Neuwelt, editor. Plenum Publishing Corp., New York. pp. 53-83. Brown, M. S., P. T. Kovanen, and J. L. Golstein. 1981. Regulation of plasma
- cholesterol by lipoprotein receptors. Science (Wash. DC). 212:628-635.
- Cancilla, P. A., and L. E. DeBault. 1983. Neutral amino acid transport properties of cerebral endothelial cells in vitro. J. Neuropathol Exp. Neurol. 42:191-199.
- Chamoux, M., M. P. Dehouck, J. C. Fruchart, G. Spik, J. Montreuil, and R. Cecchelli. 1991. Characterization of angiogenin receptors on bovine brain capillary endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 176:833-839. Dehouck, M. P., S. Méresse, P. Delorme, J. C. Fruchart, and R. Cecchelli.
- 1990a. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier "in vitro." J. Neurochem. 54:1798-1801. Dehouck, M. P., S. Méresse, P. Delorme, G. Torpier, J. C. Fruchart, and R.
- Cecchelli. 1990b. The blood-brain barrier in vitro: coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. Circulation et Métabolisme du Cerveau. 7:151-162
- Dehouck, M. P., P. Jolliet-Riant, F. Brée, J. C. Fruchart, R. Cecchelli, and J. P. Tillement. 1992. Drug transfer across the blood-brain barrier: correlation between in vitro and in vivo models. J. Neurochem. 58:1790-1797.
- Estrada, C., J. V. Bready, J. A. Berliner, W. M. Pardridge, and P. A. Cancilla. 1990. Astrocyte growth stimulation by a soluble factor produced by cerebral endothelial cells "in vitro." J. Neuropathol. Exp. Neurol. 49:539-549.
- Fishman, A. P. 1982. Endothelium: a distributed organ of diverse capabilities. Ann. NY Acad. Sci. 401:1-8.
- Fredrickson, D. S., R. I. Levy, and R. S. Lee. 1967. Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanisms and disorders. N. Engl. J. Med. 276:34-37.
- Goldstein, J. L., and M. S. Brown. 1977. The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. Annu. Rev. Biochem. 46:897-930. Gospodarowicz, D., S. Massoglia, J. Cheng, and D. K. Fuji. 1986. Effect of
- fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of endothelial cells derived from bovine adrenal cortex, brain cortex, and corpus luteum capillaries. J. Cell. Physiol. 127:121-136.
- Hofman, S. L., D. W. Russel, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 1987. mRNA for low density lipoprotein receptor in brain and spinal cord of immature and mature rabbits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84:6312-6316.
- Janzer, R. C., and M. C. Raff. 1987. Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. Nature (Lond.). 325:253-257
- Joó, F. 1992. The cerebral microvessels in culture, an uptake. J. Neurochem. 58:1-17.
- Kenagy, R., E. L. Bierman, S. Schwartz, and J. Albers. 1984. Metabolism of low density lipoprotein by bovine endothelial cells as a function of cell density. Arteriosclerosis. 4:365-371.
- Méresse, S., M. P. Dehouck, P. Delorme, M. Bensaïd, J. P. Tauber, C. Del-bart, J. C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1989a. Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. J. Neurochem. 53:1363-1371.
- Méresse, S., C. Delbart, J. C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1989b. Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. J. Neurochem. 53:340-345
- Méresse, S., M. P. Dehouck, P. Delorme, J. C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1991. Lipoproteins and reconstituted blood-brain barrier. In Pharmaceutical Applications of Cell and Tissue Culture to Drug Transport. G. Wilson, S. S. Davis, L. Illum, and A. Zweibaum, editors. Plenum Publishing Corp., New
- York. pp. 217-229. Pitas, R. E., J. K. Boyles, S. H. Lee, D. Foss, and R. W. Mahley. 1987. Astro-cytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-contain-ing lipoproteins. *Biochem. Biophys. Acta.* 917:148-161.
   Reese, T. S., and M. J. Karnovsky. 1967. Fine structure localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34:207-217.

The authors would like to thank Drs. Lee Rubin and Jim Staddon for critically reading the manuscript. We thank Dr. S. Saule for providing the passaged bovine adrenal cortex endothelial cells.

- Risau, W., R. Hallmann, U. Albrecht, and H. Henze-Fahle. 1986. Brain induces the expression of an early cell surface marker for blood-brain-specific endothelium. EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 5:3179-3183. Stewart, P. A., and M. J. Wiley. 1981. Developing nervous tissue induces for-
- mation of blood-brain barrier characteristics in involus disude othelial cells: a study using quail-chick transplantation chimeras. *Dev. Biol.* 84:183-192.
   Tao-Cheng, J. M., Z. Nagy, and M. W. Brightman. 1990. Astrocytic orthogonal arrays of intramembranous particle assemblies are modulated by brain endothelial cells in vitro. J. Neurocytol. 19:143-153.
- Vasile, E., M. Simionescu, and N. Simionescu. 1983. Visualization of the binding, endocytosis and transcytosis of low density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. J. Cell Biol. 96:1677-1689. Vlodavsky, I., P. E. Fielding, C. J. Fielding, and D. Gospodarowicz. 1978.

Role of contact inhibition in the regulation of receptor-mediated uptake of low density lipoprotein in cultured vascular endothelial cells. Proc. Natl.

- Natt. Acad. Sci. USA. 75:356-360.
   Volpe, J. J., S. W. Hennesy, and T. Wong. 1978. Regulation of cholesterol ester synthesis in cultured glia and neuronal cells. Relation to control of cholesterol synthesis. Biochim. Biophys. Acta. 528:424-435.
   Zetter, B. R. 1984. Culture of capillary endothelial cells. In Biology of endothelial cells. E. A. Jaffe, editor. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, MA.
- pp. 14-26.
- Zetter, B. R. 1988. Endothelial heterogeneity: influence of vessel size, organ localization, and species specificity on the properties of cultured endothelial cells. In Endothelial Cells. Vol II. U. Ryan, editor. CRC Press Inc., Boca Raton, FL. pp. 63-79.

Au contraire de l'endothélium des autres organes, l'endothélium des capillaires cérébraux présente un récepteur apo(B,E). La présence de ce récepteur apparait être l'une des nombreuses caractéristiques de la BHE, induites par les astrocytes et nécessitant une intercommunication entre les cellules endothéliales de capillaires cérébraux et les astrocytes.

L'induction du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, par les astrocytes déprimés en cholestérol, permet d'envisager le rôle de ce récepteur dans le transport du cholestérol plasmatique aux cellules nerveuses, ceci par l'intermédiaire des lipoprotéines de basse densité.

Article 4 : Transcytose des lipoprotéines de basse densité au travers de la barrière hémato-encéphalique

Le modèle de coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes va nous permettre d'étudier le transport des LDL au travers de la BHE. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'internalisation des LDL dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux et nous l'avons comparée à celle des LDL acétylées. Comme le montre la planche 2 (article 4), les LDL acétylées sont fortement endocytées par les cellules endothéliales. Nous pouvons noter que les LDL natives le sont aussi, mais en quantité moindre seules quelques cellules présentent une fluorescence marquée. Nous avons de plus montré que contrairement aux LDL acétylées, qui sont dégradées par la cellule endothéliale, les LDL ne le sont pas de manière significative. Ces résultats montrent que, bien que les cellules endothéliales possèdent les enzymes nécessaires à la dégradation des lipoprotéines, elles ne dégradent pas les LDL natives. Les études d'inhibition compétitive de la dégradation des LDL acétylées par un excés de LDL acétylées ou natives non marquées nous montrent bien que nous avons à faire à deux récepteurs différents (article 4, Fig. 1).

Ainsi, à l'inverse des LDL acétylées qui sont dirigées vers les compartiments lysosomiaux de la cellule et dégradées, les LDL natives ne le sont pas.

Les images en microscopie électronique nous montrent que les LDL marquées à l'or sont internalisées par la cellule dans des puits non recouverts de clathrine et se retrouvent dans les endosomes appelés "multi lamellar body". Seraient-elles véhiculées et relâchées face abluminale de l'endothélium cérébral ?

Les LDL marquées à l'iode traversent la monocouche de cellules endothéliales. Ce transport est inhibé par un excés de LDL froides, il est donc spécifique et fait certainement intervenir le récepteur LDL décrit dans l'article précédent.

L'hypothèse d'une transcytose médiée via le récepteur LDL est étayée par les résultats suivants :

le transport des LDL à 4°C est totalement inhibé à l'inverse du saccharose (article
4, Fig. 3). Ces résultats montrent que le passage des LDL ne résulte pas d'une simple diffusion paracellulaire et qu'il nécessite de l'énergie.

l'inhibition du transport par co-incubation des LDL avec l'anticorps monoclonal
C-7, qui comme nous l'avons vérifié dans l'article précédent, bloque la fixation des LDL
au récepteur LDL, nous permet d'établir que ce récepteur intervient dans le transport des
LDL au travers de la BHE (article 4, Fig. 4).

-128-

Comme nous l'avons vu dans l'article 3, les astrocytes carencés en cholestérol, augmentent l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales. Après l'induction de l'expression de ce récepteur, nous observons une augmentation du transport des LDL au travers de la BHE (article 4, Fig. 5). Ces résultats confirment l'intervention du récepteur apo(B,E) dans ce transport. Ils montrent que le statut lipidique des astrocytes influence le transport des LDL au travers de la BHE.

Ainsi, le cholestérol plasmatique est transporté aux cellules nerveuses par les LDL. Celles-ci sont, par l'intermédiaire du récepteur apo(B,E), fixées, internalisées et relarguées face abluminale de l'endothélium cérébral, ceci par l'intermédiaire du récepteur apo(B,E) présent à la surface des cellules endothéliales.

Le passage des LDL à travers la monocouche de cellules endothéliales est donc bien un mécanisme de transcytose médié par un récepteur. De plus nous avons montré que ce transport est régulé par le statut lipidique des astrocytes. La BHE semble ainsi être modulable. A la structure imperméable, rigide décrite ces dernières années, il convient de substituer une structure dynamique, capable de s'adapter localement aux besoins nutritifs des cellules nerveuses sous-jacentes.

### A NEW FUNCTION FOR THE LDL RECEPTOR TRANSCYTOSIS OF LDL ACROSS THE BLOOD-BRAIN BARRIER.

•

DEHOUCK Bénédicte\*, TORPIER Gérard\*, DEHOUCK Marie-Pierre\*, FRUCHART Jean-Charles\* and CECCHELLI Roméo\*.

\* INSERM U325, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex, FRANCE.

° Université des Sciences et Technologies de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, FRANCE.

Running title : Trancytosis of the LDL across the blood-brain barrier.

Corresponding author :

Dr CECCHELLI Roméo INSERM U325, Institut Pasteur, 59019 Lille Cédex, France. Tel : 33 20 87 73 81 Fax : 33 20 87 73 60

#### SUMMARY

Lipoprotein transport across the blood-brain barrier is of critical importance for delivery of essential lipids to the brain cells. The occurence of a low density lipoprotein (LDL) receptor on the blood-brain barrier has recently been demonstrated. To examine further the fonction of this receptor we have developed a model system in which brain capillary endothelial cells and astrocytes are co-cultured on opposing sides of a filter that prevents physical interaction between the two cell types.

Using this model, we have shown that in contrast to acetylated LDL which do not cross the blood-brain barrier, LDL is specifically transcytosed across the monolayer of brain capillary endothelial cells. This phenomenon is temperature dependent. The C7 monoclonal antibody, known to interact with the LDL receptor binding domain, totally blocked the transcytosis of LDL, while control irrevelant IgG had no effect, suggesting that the transcytosis is mediated by the receptor. Furthermore, radiolabeled LDL was not degraded during the transcytosis in contrast to what was observed with acetylated LDL, indicating that the transcytotic pathway in brain capillary endothelial cells is different from the LDL receptor classical pathway. We have recently shown that the lipid requirement of astrocytes increases the number of LDL receptors at the luminal side of brain capillary endothelial cells. That is why we next investigated the capacity of astrocytes to modulate LDL transcytosis. When the astrocytes were preincubated in lipoprotein deficient media prior to coculture, the rate of LDL transcytosis was increased 6 fold, compared to that observed when endothelial cells cocultured with astrocytes pre-incubated in complete media. This result comfirms that the transcytosis of LDL through the blood-brain barrier is receptor mediated. The maintenance of the homeostasis of brain interstitial fluid which constitutes the special micro-environment for neurons, is established by the presence of the blood-brain barrier (BBB) at the transition area from endothelial cells to brain tissue. Of primary importance in the formation of a permeability barrier by these cells is the presence of continuous tight junctions which seal together the margins of the endothelial cells. Futhermore, in contrast to EC's in many other organs, the brain capillary ECs contain no direct transendothelial passage ways such as fenestrations or channels. But obviously, the blood-brain barrier cannot be absolute. The brain is dependant upon the blood to deliver metabolic substrates and remove metabolic wastes and, therefore, the blood-brain barrier facilitate the exchanges of selected solutes. Carrier-mediated transport systems that facilitate the uptake of hexoses, amino-acids, purine compounds and mono-carboxylic acids have been revealed in the cerebral endothelium (for review, see Goldstein and Betz, 1986), but, until now little information has come to light regarding the cerebral uptake of lipids.

The characterization of lipoproteins E and A-I in the cerebrospinal fluid (Pitas et al., 1987) and the identification of apolipoprotein (B,E) receptors in the brain leave little doubt that the brain is equipped with a relatively self-sufficient transport system for cholesterol. Cholesterol could be derived from novo synthesis within the brain and from plasma via the blood-brain barrier. Malavolti et al. (1991) indicate the presence of unexpectedly close communications between extracerebral and brain cholesterol. Changes in the extracerebral cholesterol levels are readily sensed by the LDL receptor in the brain and promptly evoke appropriate modifications in its activity. Futhermore, the fact that enzymes involved in the lipoprotein metabolism are present in the brain microvasculture (Brecker and Kuan, 1979), and that the entire fraction of the drug bound to lipoproteins is available for entry into the brain strongly suggest that this cerebral endothelial receptor plays a role in the interaction of plasma lipoproteins with brain capillaries. These results pinpoint the critical importance of the interactions between brain capillary ECs and lipoproteins. However, whether LDL, which is the major carrier of cholesterol (Fredrickson et al., 1967) is involved in the exchange is not known.

Méresse et al. (1989a) provided direct evidence for the occurrence in vivo of an LDL receptor on the endothelium of brain capillaries. To examine further the function of this receptor, we have developed an in vitro model of the blood-brain barrier that imitates an in vivo situation by culturing capillary ECs and astrocytes on opposite sides of a filter (Dehouck et al., 1990a; 1992).

In culture, as in vivo, in spite of the tight apposition of ECs in culture and their contact with physiological concentration of lipoproteins, brain capillary ECs express an LDL receptor (Méresse et al., 1990; Dehouck et al., 1994). The capacity of ECs to bind LDL is greater when cocultured with astrocytes than in their absence. Futhermore, we have demonstrated that the lipid requirement of astrocytes increases the expression of the LDL receptor on brain capillary ECs. Taken together, the presence of LDL receptors on brain capillary ECs, and the modulation of the expression of these receptors by the lipid composition of astrocytes raise the possibility that cholesterol utilized by cells in the central nervous system may be derived, at least in part, from the periphery via transport across the blood-brain barrier.

In the present study, we provide direct evidence that after binding to brain capillary ECs, there is a specific mechanism for the transport of LDL across the endothelial monolayer from the apical to the abluminal surface. This mechanism might be best explained by a process of receptor-mediated transcytosis.
## **Experimental Procedures**

## Cell culture

Bovine brain capillary ECs : Brain capillary ECs were isolated and characterized as described by Méresse et al. (1989b). The use of cloned endothelial cells allows us to obtain a pure endothelial cell population without contamination by pericytes. The cells were cultured in the presence of DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) supplemented with 15% (v/v) heat-inactivated calf serum (Hyclone laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 50  $\mu$ g/ml gentamycin and bFGF (basic fibroblast growth factor) (1 ng/ml, added every other day).

<u>Rat astrocytes</u> : Primary cultures of mixed astrocytes were made from newborn rat cerebral cortex. After the meninges had been removed, the brain tissue was gently forced through a nylon sieve, as described by Booher and Sensenbrenner (1972). Astrocytes were plated on 6 multiwell dishes (Nunclon) at a concentration of  $1.2 \times 10^5$  cells/ml in 2ml of DMEM supplemented with 10% FCS (Hyclone laboratories, Logan, UT) and the medium was changed twice a week. Three weeks after seeding, cultures of astrocytes stabilized and were used for experiments. The astrocytes were characterized with glial fibrillary acidic protein (GFAP), and more than 95% of the population was GFAP positive (Dehouck et al., 1990b).

## Coculture of endothelial cells and astrocytes :

- Preparation of filters for coculture : Culture plate inserts (Millicell-CM  $0.4 \mu m$ ; 30 mm diameter from Millipore) were coated on the upperside with rat tail collagen prepared by a modification of the method of Bornstein (1958).

- *Experimental method*: Cultures of astrocytes were prepared as described above. After three weeks, coated filters were set in 6 multiwell dishes containing astrocytes and ECs were plated on the upperside of the filters in 1.5 ml of medium with a concentration of  $4x 10^5$  cells/ml for bovine brain capillary ECs and adrenal cortex ECs. The medium used for the coculture was DMEM supplemented with 15% CS, 2 mM glutamine, 50 µg/ml gentamycin and 1 ng/ml bFGF (basic fibroblast growth factor) added every other day. This medium was changed every other day. Under these conditions, ECs form a confluent monolayer after 7 days. Experiments were performed 5 days after confluence. This arrangement readily permits the use of different cell types, which were separated easily after coculture by removing the insert.

## Fluorescence microscopy

Endothelial cells grown on porous filter were fixed at room temperature for 20 minutes with 4% paraformaldehyde in a fibrous components-stabilizing buffer (PHEMS, 60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl<sub>2</sub> and 140 mM NaCl, pH 6.9). After washing in PHEMS, the cells on filter fragments were permeabilized with cold acetone (-20°C) for 10 min, followed by two washes with PHEMS. Cells were then stained with F-actin probe, bodipyphallacidin (Molecular Probes, Inc., 165 nM, 30 min, at room temperature). For the localization of tight junction-associated protein ZO-1 to the plasma membrane, the cells were fixed with cold methanol (-20°C). Fixed cells were incubated with an affinity-purified rabbit anti ZO-1 (Zymed, San Francisco) diluted in Tris-HCl-buffered saline (TBS, 20mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7), containing 5% (w/v) ovalbumin and 1% heat-inactivated normal goat serum. Subsequently, the cells were incubated 1 hour at room temperature with the appropriate combination of fluorescently labeled secondary antibodies and propidium iodide (2 $\mu$ g/ml). For luminal uptake of DiI-LDL, the endothelial cells were incubated for 2h at 37°C in prewarmed DMEM 5% LPDS with DiI-LDL (35  $\mu$ g/ml). All incubations were terminated by three washes in ice-cold Pipes-Hepes buffer and immediatlely fixed with 4% paraformaldehyde.

After final washes, the filters and their attached monolayers were mounted on glass microscopic slides using Mowiol mountant (Hoechst, Frankfurt) containing p-phenylene diamine (0.1%, Sigma) anti-quenching agent. All specimens were visualized using a Leitz DMRB fluorescence and microscope pictures were taken on Kodak Tmax film.

Preparation of DiI-LDL (1,1)-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine percholate (DiI)-LDL). The lipoprotein concentration should be between 1 and 2 mg of lipoprotein protein/ml in saline-EDTA. Two milliliters of lipoprotein-deficient serum is added of each 1 mg of lipoprotein protein to be labeled with DiI. The solution is then filtered (0,45 µm for LDL) through Millex-PF filters. The solution is gently agited, and 50µl of DiI in DMSO (3 mg/ml) is added per mg of lipoprotein protein. The mixture is incubated for 15-20 hours at 37°C. The lipoproteins are reisolated from the incubation mixture by ultracentrifugation at the density of 1,063. The density 1,063 by adding 0,0834 g de KBr for each ml of incubation mixture. Lipoprotein are reisolated using Beckman TL 100. 4 rotor centrifuged at 100000 rpm for 2 hours at 10°C. After centrifugation, the lipoproteins are dialyzed against saline-EDTA.

# Preparation of low density lipoproteins, acetylated LDL and lipoprotein deficient serum

Low density lipoprotein (LDL) was isolated from human plasma by sequential ultracentrifugation at the densities of 1.03-1.053. The densities were adjusted using solid KBr. The LDL was extensively dialyzed at 4°C against 0.15 M NaCl. Acetylated LDL was prepared by treating LDL with acetic anhydride (Basu et al., 1976). LDL was radioiodinated as described by Bilheimer et al. (1972). After labeling, the LDL was chromatographed on a PD10 column (Pharmacia) and extensively dialyzed at 4°C against 0.15 M NaCl and 0.01% EDTA (pH : 7.4). The specific activity of [<sup>125</sup>I]-LDL, which was used within 10 days of preparation, ranged from 300 to 400 cpm/ng protein. Lipoprotein-deficient serum (LPDS) was prepared from calf serum (CS) by ultracentrifugation at the density 1.25 ajusted with solid KBr. LPDS was extensively dialyzed at 4°C against 0.15 M NaCl.

## [<sup>125</sup>I]-LDL binding

ECs were incubated for 2 hours at 4°C with DMEM, 10 mM HEPES, 0.2% BSA (bovine serum albumin) and the indicated concentrations of  $[^{125}I]$ -LDL. At the end of the incubation, cells were washed 9 times at 4°C : 3 times with 4 ml of PBS (Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>) (phosphate buffered saline), 3 times with 4 ml of PBS (Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>) containing 0.2% BSA (bovine serum albumin), 3 times with 4 ml of PBS (Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>). Then, endothelial cell associated radioactivity was determined by removing the membrane of the culture insert and counting it in a gamma counter. Non-specific binding was determined by incubating the cells with [<sup>125</sup>I]-LDL and a 20-fold excess of unlabeled LDL.

## Studies of LDL transport through brain capillary ECs monolayers

Passage of [<sup>125</sup>I]-LDL or acetylated LDL through brain capillary ECs monolayers. Passage of lipoproteins through brain capillary ECs monolayers was studied using the coculture model as described above. ECs seeded on collagen-coated filters were cultured with astrocytes for 12 days. Then each filter was transferred in a 6-multiwell dishes containing 2 ml of DMEM with 15% LPDS (lower compartment). At time O a known amount of the iodinated lipoprotein (usually 35µg protein/ml) in DMEM with 15% LPDS was added on the luminal face of ECs monolayer (upper compartment ; 700µl). During the experiments, monolayers were kept at 37°C. At several time points, filters were transferred in the next well and at the end of the experiment, each lower and upper compartments were collected. Precipitation of samples by trichloroacetic acid was performed.

Determination of [<sup>125</sup>I]-LDL passage was performed by counting, in gamma counter, acid-precipitable fractions of the lower compartments. Passage rates were expressed in ng LDL/cm<sup>2</sup>. Non-specific passage was determined by incubating the cells with [<sup>125</sup>I]-LDL and a 20-fold excess of unlabeled LDL. The filter permeability to LDL was carried out with collagen-coated filter.

For the determination of the degradation of LDL during their passage through EC monolayers, acid-soluble fractions from upper and lower compartment samples were separated by centrifugation from acid-precipitable fractions ; then AgNo<sub>3</sub> (5%) precipitation was performed to correct for free <sup>125</sup>I. AgNo<sub>3</sub>-soluble fractions were counted in gamma counter. Degradation rates are expressed in ng LDL/mg cell potein.

After the end of the experiment, EC monolayers were washed 9 times at  $4^{\circ}C$ : 3 times with 4 ml of PBS (Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>) (phosphate buffered saline), 3 times with 4 ml of PBS (Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>) containing 0.2% BSA (bovine serum albumin), 3 times with 4 ml of PBS (Ca<sup>++</sup>/Mg<sup>++</sup>). Then, endothelial cell associated radioactivity was determined by removing the membrane of the culture insert and counting it in a gamma counter.

Transport and degradation of acetylated LDL were performed as described for LDL.

*Effect of temperature on LDL transport.* The LDL transport experiments were performed as described above, but the monolayers were kept at 4°C.

Inhibition of  $[^{125}I]$ -LDL passage through brain capillary ECs. ECs were incubated for 15 minutes with different concentrations (1 µg/ml et 0,1 µg/ml) of the monoclonal antibody designated immunoglobulin C-7 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) (Beisiegel et al., 1981) and with or without unlabeled LDL (upper compartment). Then  $[^{125}I]$ -LDL were added to this compartment and the rate of LDL passage was performed as described above. Irrelevant IgG directed against apolipoprotein AI (1mg/ml), were used as a control.

Influence of astrocytes on LDL transport. Upregulation of LDL receptor expression was performed as described by Dehouck et al.(1994). After 12 days of coculture, the astrocytes of the coculture were fed for 36 hours with LPDS in order to decrease their cholesterol content. During the "induction phase", ECs were incubated for 2 or 3 hours with these "cholesterol depleted astrocytes", and then binding at 4°C and transcytosis at 37°C were carried out (Fig. 5).

## Studies of gold-LDL passage through EC monolayers

Labeling of freshly isolated lipoprotein with 16nm colloidal gold was prepared according to the method of Handley et al. (1981). The cells were fixed routinely with 2,5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer, pH 7,2, at 4°C and were postfixed in 1% osmium tetroxide for 60 min. After deshydratation in ethanol, embedding is in araldite. Perpendicular sections to the monolayer culture cells, contrasted with lead hydroxide, were examined with Philip EM 420 electron microscope.

## RESULTS

#### The blood-brain barrier model

Plate 1a illustrates the typical phenotypes of confluent brain capillary ECs, cocultured for 12 days with astrocytes on an insert coated with rat tail collagen. Plate 1b mitotracker colloration shows a intense staining of the cells indicating a large amount of mitochondriae. Bodipy-phallacidin staining reveales a delicate fluorescent network of actin filaments throughout the cytoplasm and shows a prominent continuous band at cell borders (plate 1c). Futhermore, ZO-1 is localized in an unintempted manner at sites of cell-cell contract between endothelial cells along the junctional complex (plate 1d). This continuous network of ZO-1 demonstrates that it is associated with the tight junction barrier. These data added to previous published results concerning the high electrical resistance (500-700  $\Omega$ .cm<sup>2</sup>) and the low permeability (Dehouck et al.1990), support the fact that the coculture is a legitimate model of the blood-brain barrier.

#### LDL internalization

Since LDL internalization in most cells is mediated primarily by the LDL receptor, it was of interest to determine the extent of internalization of LDL from the luminal surface of brain capillary ECs.

The organization of the endocytotic pathways in these cells was tested using diI-LDL and diI-acetyl-LDL. A significant accumulation of diI-LDL (plate 2a) could be clearly observed in contrast to what was observed in brain capillary ECs. Plate 2b shows the large incorporation of diI-acetyl-LDL in the same ECs. These results show that endocytotic pathways are functional in brain capillary ECs.

In order to determine whether degradation of LDL occurs in the cells after internalization, degradation studies were carried out using either LDL or acLDL for a 5 hour incubation at 37°C

from the apical surface.<sup>125</sup>I-LDL or <sup>125</sup>I-AcLDL degradation by endothelial cell monolayers was measured by the apparition of the iodine free TCA soluble product released during incubation. In contrast to what was observed for AcLDL, which were actively degraded, no degradation of LDL occured during the incubation period (Fig. 1A). The degradation of acLDL is specific since only unlabeled acLDL can compete with acLDL (Fig. 1B), indicating a receptor-mediated degradation (scavenger receptor ligand). These results demonstrated that brain capillary ECs contain the classic degradation pathway (via lysosomes) and therefore LDL are not directed to the lysosomes after internalization .The electron microscopy picture (plate 3) shows that gold-LDL are predominently found in early endosomes.Very rarely a coated pit could be observed, and no accumulation of gold-LDL was observed in lysosomes.

## Transport of LDL across the brain capillary EC monolayer

From the experiments described above, it appears that brain capillary ECs bind, internalize, but do not degrade LDL. Transport experiments were performed to define the role of the LDL receptor. When <sup>125</sup>I-LDL was added to the luminal chamber of the culture, the progressive transfer of these macromolecules across the cell monolayer was observed during the 6 hour incubation. The transport was examined (Fig. 2) both in the absence and in the presence of a 20 fold excess of unlabelled LDL. The amount of <sup>125</sup>I-LDL (trichloro-acetic precipitable) transported is expressed in terms of nanograms per cm<sup>2</sup>, where the area refers to the surface area of the cells. The filter coated with rat-tail collagen and maintained for 12 days with rat astrocytes is not a barrier for the passage of LDL. Excess of unlabelled LDL competed with the transport of LDL form the apical to the basal membrane.

The results suggest that the transport from the apical to the basal side appears to be specific, although no evidence of saturation could be detected in concentrations of LDL ranging from 10 to  $100\mu$ g/ml. Limitations in specific activity and quantitaties of unlabelled LDL precluded examining concentrations of LDL higher than  $100\mu$ g/ml ( $^{125}$ I-LDL). No specific LDL transport was observed from the abluminal to luminal direction (not shown). The toxicity of high concentrations of LDL on the integrity of the monolayer was assessed by calculating the

permeability of sucrose and inulin (Dehouck et al., 1992). No effect of LDL concentrations up to 2mg/ml was observed.

Acetylation of the lysine and arginine residues of the LDL results in a modified LDL particle (acetyl-LDL) that is more negative and has lost its ability to bind the (B,E) receptor. No passage of acetyl-LDL was found over a 5 hour incubation (results not shown). These results corroborate our conclusions with regard to a specific transport of LDL across the monolayer.

Fig. 3 compares the effect of temperature on LDL transport from the apical to basal surfaces. A decrease in the incubation temperature from 37° to 4°C slightly affects the passage of sucrose (Fig. 3B), whereas a dramatic decrease in the LDL through the monolayer is observed (Fig. 3A), indicating a transport system requiring active mechanisms such as receptor-mediated transcytosis.

We have shown that the C7-monoclonal antibody, known to interact with the LDL receptor binding domain, totally blocked the binding of LDL to brain capillary ECs. Fig. 4 shows that co-incubations of LDL with increasing concentration of the C7 antibody, decrease the rate of passage of the LDL through the monolayer. Control irrelevant IgG has no effect on LDL transcytosis, suggesting once more the involvment of the LDL receptor in this intracellular traffic.

The involvment of the LDL receptor was confirmed by the following experiments. We have already demonstrated that the lipid requirement of astrocytes increased the expression of endothelial cell LDL receptors. Is it possible that the cholesterol content of astrocytes therefore modulates the LDL transcytosis ? In order to answer this question the following experiments were carried out (Fig. 5A). Brain capillary ECs and astrocytes were cocultured for 12 days in a medium containing 15% CS. 36 hours before the experiments, ECs were transferred onto other astrocytes, and the astrocytes of the coculture were cultured for 36 hours in a medium containing 10% LPDS to modify the intracellular metabolism of these cells. After this period,

brain capillary ECs and cholesterol depleted astrocytes in their conditioned medium were again cocultured for 2 or 4 hours (induction phase) and the binding and transcytosis experiments were performed (Fig. 5B Inset). Fig 5B draw, after 4 hours induction, a parallel between the upregulation of the LDL receptor at the luminal surface of the brain capillary ECs and the increase of the LDL transcytosis across the monolayer.

#### DISCUSSION

The availability of an in vitro model to study the passage of macromolecules through the monolayers of brain capillary endothelial cells on porous membranes enabled us to investigate the characteristics of the passage of lipoproteins through endothelial monolayers. These endothelial cells displayed : 1 - tight junctions as visualized by actin and ZO-1 repartition ; 2 - an electrical resistance of more than  $500 \Omega . \text{cm}^2$ ; 3 - a low permeability for sucrose and inulin ; 4 - the presence of specific transporters [amino-acids, glucose, propranolol, (Dehouck et al., 1995)]; 5 - specific enzymatic activities of the blood-brain barrier ( $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, monoamine oxidase). Owing to the fact that a close correlation exists between the values of the brain uptake index obtained in vitro on our monolayers and those obtained in vivo with the Oldendorf technique for a large number of drugs (Dehouck et al., 1995), the in vitro model resembles in vivo features of animal endothelial cells. Furthermore, we have recently shown (Dehouck et al., 1994) that brain capillary ECs in coculture express, as they do in vivo, (Méresse et al., 1989a) an LDL receptor in spite of the physiological concentrations of

lipoproteins in the incubation medium and the tight apposition of ECs. To summarize our coculture enables us to apprehend, on an in vitro model which closely mimics the in vivo conditions, the cellular mechanism of LDL interaction with the blood-brain barrier.

What then is the function of this LDL receptor on the luminal surface, and does it represent a true LDL receptor ? Owing to the fact that this receptor is expressed on brain capillary ECs at confluence and in the presence of LDL in the medium bathing either the basal or the apical surface, this receptor is clearly not involved in regulating cholesterol biosynthesis in endothelial cells. Futhermore, as demonstrated (Méresse et al., 1991 ; Dehouck et al., 1994), this luminal surface receptor is likely to be a bonafide LDL receptor as indicated by its saturability, its specificity and the ability of an anti-LDL receptor antibody to inhibit <sup>125</sup>I-LDL binding.

Our results suggest that there is a specific mechanism for the transport of LDL across the endothelial monolayer from the blood to the brain side. This transport is a specific transport mechanism that might be best explained by a process of receptor-mediated transcytosis. Several points lead us to this conclusion : 1 - the transport is specific and unidirectional ; 2 - the transcytosis is inhibited by the C7 monoclonal antibody, which is known to interact with the receptor binding domain ; 3 - the transport shows a temperature dependance similar to the processes involving receptor mediated internalization (Vasile et al., 1983). It is also interesting to note that the transcytosis from the luminal to the basal surface occurs in the absence of a significant route involving its internalization and degradation. The non transcytosis of ac-LDL after their internalization in the endothelial cells and their subsequent degradation indicates that lysosomal function are functional in these cells, and reinforce the hypothesis that the receptor mediated endocytotic pathway bypasses lysosomal processing. Taken together, these experiments indicate that LDL are transcytosed through the brain endothelium by a receptor-mediated mechanism.

Vasile et al., 1983, using an in situ perfusion of native LDL, showed that most of the transendothelial transport of LDL is receptor-independent. Within the inherent limitations of this approach and some uncertainties about the quantitative interpretation of the morphometric data obtained, the mechanism and rate of transport of intact native LDL across the endothelium in the peripheric organ has been the subject of several in vitro studies (Langeler et al., 1989; Navab et al., 1986).

Despite the absence of funtionally active LDL receptors due to contact inhibitor and physiological concentration of plasma LDL, there is a significant transport of intact LDL across the endothelium. These in vitro results confirm the in vivo observation of Vasile, and describe a concentration-dependent, receptor independent process. Our data using adrenal cortex capillary ECs and aortic ECs are in agreement with a transport of LDL independent of the simultaneous addition of an excess amount of unlabelled LDL. From our data, it is not possible to distinguish between a paracellular route for the movment of LDL or a transcellular route involving the formation of transient transendothelial channels. Thus, the normal peripheric confluent endothelium functions are not related to the direct metabolim of LDL, but rather transport the particle intact, by mechanisms unique to ECs, to the subendothelial space for metabolism by other cells. This transcellular transport can deposit up to twice the plasma-concentration of LDL

In the brain, the transcytosis seems highly regulated. First, it is receptor-mediated and high concentration independent. Second, the brain cells are able to regulate the expression of the LDL receptor, as demonstrated by Dehouck et al. (1994). The lipid requirement of astrocytes increases the number of LDL receptors at the luminal side of brain capillary ECs. When, we investigated the capacity of astrocytes to modulate LDL transcytosis, the astrocytes of the coculture were preincubated in lipoprotein deficient media, in order to decrease their cholesterol content, we observed that the increase in the LDL receptor at the luminal side, parallels the LDL transcytosis. These results confirms once more that LDL transcytosis to the brain is receptor mediated.

In summary, taken together, these experiments indicate that LDL are transcytosed through the blood-brain barrier via a receptor-mediated mechanism, in specialized endocytic vesicles which avoid fusion with lysosomes. In contrast to other ECs in the body, these highly differentiated cells regulate the entry of lipoproteins into the brain. Futhermore, the influence of astrocytes on the expression of the LDL receptor and the rate of LDL transcytosis suggests the existence of focal differences in lipoprotein influx, which may depend on the lipid states of astrocytes. The blood-brain barrier could not be considered as a rigid and impermeable structure protecting the brain, but as a dynamic interface able to modify its permeability to the specific needs of certain areas of the brain.

#### REFERENCES

- Basu, S.K., J.M. Golstein, R.G.W. Anderson, and M.S. Brown. 1976. Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 73 : 493-502.
- Beisiegel, U., W.J. Schneider, J.L. Goldstein, R.G.W. Anderson, and M.S. Brown. 1981. Monoclonal antibodies to the low density lipoprotein receptor as probe for study of receptor mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia. J. Biol. Chem. 256 : 11923-11931.
- Goldstein G. et Betz L. (1986).
  La barrière qui protège le cerveau. Pour la Science Novembre 1986.
- Bilheimer, D.W., S. Eisenberg, and R.I. Levy. 1972. The metabolism of Very Low Density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 260 : 212-221.
- Booher J., and M. Sensenbrenner. 1972. Growth and cultivation of dissociated neurones and glial cells from embryonic chick, rat and human brain in flask cultures. *Neurobiology*.
   2:97-105.
- Bornstein M.B. 1958. Reconstituted rat tail collagen used as substrate for time tissue cultures on coverslips in Maximow slides and roller tubes. *Lab. Invest.* 7 : 134-139.
- Brecher P., and H.T. Kuan. 1979. Lipoprotein lipase and acid lipase activity in rabbit brain microvessels. J.L.R. 20: 464-471.
- Dehouck B., M.P. Dehouck, J.C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1994. Upregulation of the low-density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier : intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. J. Cell Biol. 126 : 465-473.

- Dehouck M.P., S. Méresse, P. Delorme, J.C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1990a. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. J. Neurochem. 54 : 1798-1801.
- Dehouck M.P., S. Méresse, P. Delorme, G. Torpier, J.C. Fruchart, and R. Cecchelli.
   1990b. The blood-brain barrier in vitro : coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *Circulation et métabolisme du cerveau*. 7 : 151-162.
- Dehouck M.P., P. Jolliet-Riant, F. Brée, J.C. Fruchart, R. Cecchelli, and J.P. Tillement.
   1992. Drug transfer across the blood-brain barrier : correlation between in vitro and in vivo models. J. Neurochem. 58 : 1790-1797.
- Dehouck M.P., C. Schluep, J.C. Fruchart, M. Lemaire, and R. Cecchelli. 1995. Submitted to *European Journal of Pharmaceutical Science*.
- Fredrickson D.S., R.I. Levy, and R.S. Lee. 1967. Fat transport in lipoproteins. An integrated approach to mechanisms and disorders. *N. Engl. J. Med.* 276 : 34-37.
- Handley D.A., C.M. Arbeeny, H.A. Eder, and S. Chien. 1981. Hepatic binding and internalization of low density lipoprotein-gold conjugates in rats treated with 17 a-ethinyl estradiol. *J Cell Biol.* 90 : 778.
- Hoff H.F., J.W. Gaubatz, and A.M. Gotto. 1978. ApoB concentration in the normal aorta. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1424-1431.
- Langeler E.G., I. Snelting-Havinga, V.W.M. Van Hinsbergh. 1989. Passage of low density lipoproteins through monolayers of human arterial endothelial cells. Effects of vasoactive substances in an in vitro model. *Arteriosclerosis*. 9: 550-559.

- Malatovi M., H. Fromm, S. Ceryak, and K.L. Shehan. 1991. Cerebral low-density lipoprotein (LDL) uptake is stimulated by acute bile drainage. *Biochem. Biophys. Acta*. 1081: 106-108.
- Méresse S., C. Delbart, J.C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1989a. Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. J. Neurochem. 53 : 340-345.
- Méresse S., M.P. Dehouck, P. Delorme, M. Bensaïd, J.P. Tauber, C. Delbart, J.C.
   Fruchart, and R. Cecchelli. 1989b. Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. J. Neurochem. 53: 1363-1371.
- Méresse S., M.P. Dehouck, P. Delorme, J.C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1991.
   Lipoproteins and reconstituted blood-brain barrier. *In* Pharmaceutical applications of cell and tissue culture to drug transport. G. Wilson, S.S. Davis, L. Illum, and A. Zweibaum, editors. Plemun Publishing Corp., New York. pp. 217-229.
- Navab M., G.P. Hough, J.A. Berliner, Franck J.A., Fogelman S.A., Haberland A.M and Edwards P.A. 1986. Rabbit beta-migrating very low density lipoprotein increases endothelial macromolecular transport without altering electrical resistance. J. Clin. Invest. 78: 389-397.
- Pitas R.E., J.K. Boyles, S.H. Lee, D. Foss, and R.W. Maley. 1987. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochem. Biophys. Acta*. 917 : 148-161.
- Smith E.B., and C. Ashall. 1983. Low density lipoprotein concentration in interstitial fluid from human atherosclerotic lesions. *Biochem. Biophys. Acta.* 754 : 249-255.

•

- Vasile E., M. Simionescu, and N. Simionescu. 1983. Visualization of the binding, endocytosis of low density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. J. Cell Biol. 96 : 1677.

The abbreviations used in this paper : CS, calf serum ; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium ; EC, endothelial cell ; FCS, foetal calf serum ; LDL, low density lipoprotein ; LPDS, lipoprotein deficient serum.

## Plate legend

- Plate 1. Characterisation of brain capillary endothelial cell monolayer grown on the upper face of a collagen-coated filter. a) Phase contrast micrograph of confluent brain capillary endothelial cells (x100). b) Mitotracker colloration (Molecular Probes, Inc) (x240). c) staining with F-actin probe, bodipy-phallacidin (Molecular Probes, Inc). d) Localization of tight junction-associated protein ZO-1 to the plasma membrane (x150).
- Plate 2. Internalization of diI-LDL (a) and diI-acetylated-LDL (b) in brain capillary ECs. The lipoproteins were in contact with the luminal face of ECs for 2 hours at 37°C.
- Plate 3. Electron micrograph showing internalization of LDL conjugated to colloidal gold (16nm diameter). LDL are accumulated in multivesicular body (x100000).

#### Legends

*Figure 1.* Comparaison between LDL and acetylated LDL degradations after 5 hours incubation with brain capillary endothelial cells. A) Specifique degradation or LDL ( $\square$ ) or acetylated LDL ( $\square$ ). B) Competition between labeled acetylated LDL (acLDL\*) ( $\square$ ) with unlabeled acetylated LDL (acLDL°) ( $\square$ ) and unlabeled LDL (LDL°) ( $\square$ ).

Figure 2. Passage of  $[^{125}I]$ -LDL (ng/cm2) through collagen-coated filters with (continued lines) or without (dashed line) brain capillary EC monolayer at 37°C in 5% CO2.  $[^{125}I]$ -LDL was added to the upper side of the filter covered with EC monolayer (50µg/ml  $[^{125}I]$ -LDL, 1mg/ml unlabeled LDL). At various times, the insert was transferred to another well. At the end of experiment, intact LDL was assessed using TCA precipitation of lower mediums. Specific transport ( $\Box$ ) was calculated by subtracting the counts in the presence of native LDL ( $\Delta$ ) from that obtained in the absence of native LDL (O).

*Figure 3.* Effects of low temperature on  $[^{125}I]$ -LDL (A) and  $[^{14}C]$  sucrose (B) passage through EC monolayer. Sucrose and  $[^{125}I]$ -LDL transport were performed both at 37°C ( $\Box$ , 0) and 4°C ( $\blacksquare$ , 0).

Figure 4. Inhibition of  $[^{125}I]$ -LDL passage through EC monolayers by the C7 monoclonal antibody. Specific  $[^{125}I]$ -LDL transport experiment  $(35\mu g/ml \ [^{125}I]$ -LDL, 700 $\mu g/ml$  unlabeled LDL) was performed either in presence of C7-IgG, 1  $\mu g/ml$  (O), 0,1  $\mu g/ml$  ( $\Delta$ ) or AI-IgG, 1 mg/ml ( $\Box$ ).

*Figure 5.* [<sup>125</sup>I]-LDL passage after induction of LDL receptor expression.

A) Upregulation of LDL receptor on brain capillary ECs was performed in four phases : 1° <u>Coculture phase</u> : Brain capillary ECs and astrocytes were cocultured for 12 days in DMEM supplemented with 15% CS as described above ; 2° <u>Astrocyte LPDS phase</u> : ECs were transferred and cocultured with other astrocytes in fresh DMEM supplemented with

-151-

15% CS. Astrocytes of the original coculture were incubated for 36 hours at 37°C with DMEM supplemented with 10% LPDS, 2 mM glutamine and 50 µg/ml gentamycin. As a control, astrocytes were incubated with DMEM supplemented with 10% FCS ; 3° Induction phase : on the day of the experiment, the filter inserts with ECs, in 1.5 ml of fresh DMEM supplemented with 15% CS, were moved to a well that contained astrocytes in their 36 hour LPDS conditioned medium. The cells were incubated together for different times at 37°C ; 4° Experimental phase : After the induction phase, increase of LDL receptor expression was studied by [ $^{125}I$ ]-LDL binding at 4°C or [ $^{125}I$ ]-LDL passage was performed as described afterwards.  $\Box$  DMEM + 15% CS ;  $\Box$  DMEM + 10% LPDS ;  $\Box$  Brain capillary endothelial cells (ECs) ;  $\Box$  Atrocytes. B) Transport study was performed over 5 hour period, without induction ( $\Box$ ) or with induction for 2 ( $\Box$ ) or 4 ( $\Box$ ) hours. Inset. Specific binding of [ $^{125}I$ ]-LDL after indicated induction time.



.









Fig. 1



Fig. 2



minutes

Fig. 3.



Fig. 4





Fig. 5

# DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Nos travaux ont permis d'étudier le rôle du récepteur apo(B,E) situé au niveau de la BHE. Ce récepteur permet le transport des lipoprotéines de basse densité à travers l'endothélium cérébral.

Nos travaux ont été effectués sur un modèle de BHE in vitro, mis au point par Dehouck et al. (1990). Ce modèle consiste en une coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes de part et d'autre d'un filtre.

## 1- Intercommunications cellules endothéliales-astrocytes

La contribution des astrocytes dans la mise en place et le maintien des propriétés de la BHE est décrite in vivo et in vitro. Cependant la nature des interactions entre les deux types cellulaire est discutée.

DeBault et Cancilla (1980) montrent la réinduction de l'activité  $\gamma$ -GT dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de souris après coculture avec des cellules gliales C6 provenant de gliome de rats. Ces cocultures sont réalisées en retournant sur les astrocytes des lamelles ensemencées de cellules endothéliales. La réinduction n'a lieu que dans les cellules endothéliales directement en contact avec le prolongement astrocytaire (DeBault, 1981). Le milieu conditionné par les astrocytes ne permet par cette réinduction.

Dehouck et al. (1990) mettent au point une coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes de part et d'autre d'un filtre. Ils réinduisent ainsi l'activité de la  $\gamma$ -GT et augmentent l'étanchéité des jonctions serrées entre les cellules endothéliales. Dans ce modèle, l'induction des caractères de la BHE par les astrocytes est retrouvée quand les astrocytes sont ensemencés sur l'envers du filtre ou quand les astrocytes sont ensemencés sur le plastique d'une boîte de six puits (articles 1 et 2). Dans les deux cas, il n'existe pas de contact entre les deux types cellulaires. Lorsque les astrocytes sont cultivés sur boîte de Pétri, l'espace entre les deux types cellulaires est plus important. Ces travaux indiquent que les cellules endothéliales et les astrocytes communiquent entre eux via des facteurs diffusibles. Cependant Dehouck et al. (1990), observent que le milieu conditionné par des astrocytes ne réinduit pas l'activité  $\gamma$ -GT au niveau des cellules endothéliales et les astrocytes, la présence de ces deux types cellulaires et les astrocytes, la présence de ces deux types cellulaires apparaît indispensable.

Rubin et al. (1991), Wolburg et al. (1994) montrent que l'addition d'AMPc au milieu conditionné par les astrocytes est indispensable pour permettre l'apparition de nouvelles jonctions serrées entre les cellules endothéliales, le milieu conditionné seul n'étant pas suffisant. Dans ces expériences les astrocytes ne sont, à aucun moment, en présence de cellules endothéliales. Elles tiennent compte, de l'influence des astrocytes sur les cellules endothéliales, mais non de l'effet des cellules endothéliales sur les astrocytes. Tao-Cheng et Brightman (1988), Tao-Cheng et al. (1990), Estrada et al. (1990) montrent

l'influence des cellules endothéliales sur les astrocytes. Cette influence est aussi à prendre en compte dans l'établissement des caractéristiques de la BHE. Elle permet d'expliquer pourquoi Dehouck et al. (1990) ne réinduisent pas l'activité  $\gamma$ -GT en utilisant un milieu conditionné d'astrocytes, mais le réinduisent en coculture.

## Ces expériences semblent indiquer qu'il existe une interaction entre les deux types cellulaires.

Nous avons montré qu'en coculture, les astrocytes influencent l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales. Lorsque les astrocytes sont déprimés en cholestérol, c'est-à-dire lorsqu'ils ont besoin d'un apport de cholestérol exogène, ils augmentent l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales. Ces expériences décrivent pour la première fois l'influence du statut lipidique des astrocytes sur la BHE.

Le milieu conditionné par des astrocytes préalablement cocultivés avec les cellules endothéliales, puis déprimés en cholestérol a un effet similaire. Le(s) facteur(s) d'induction(s) est donc un(des) facteur(s) diffusible(s). Son poids moléculaire est compris entre 3500 et 14000 Da. Ces résultats sont en accord avec ceux de nombreux auteurs qui montrent que l'induction des propriétés de la BHE s'effectue via des facteurs solubles sécrétés par les astrocytes. Maxwell et al. (1989) montrent l'influence du milieu conditionné par les astrocytes sur l'internalisation du glucose par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Cet effet est proportionnel au temps d'incubation des capillaires isolés avec le milieu conditionné. De plus, il est inhibé par la présence d'inhibiteurs de synthèse lors de l'obtention du milieu conditionné. Ces facteurs d'induction sont principalement décrits comme étant de nature protéique, sensibles aux protéases (Maxwell et al., 1989) et à la chaleur (Rubin et al., 1991).

Des cellules de muscle lisse incubées dans un milieu dépourvu en lipoprotéines ne sécrètent pas le(s) facteur(s) permettant l'induction du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. De même les astrocytes cocultivés avec des cellules endothéliales d'aorte de bœuf et déprimés en cholestérol n'induisent pas l'augmentation de l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface de ces cellules endothéliales. Ainsi l'induction du récepteur apo(B,E) est spécifique des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et des astrocytes.

De plus, des astrocytes n'ayant jamais été en contact avec les cellules endothéliales de capillaires cérébraux, n'influencent pas l'expression du récepteur à la surface de ces cellules endothéliales. Seuls les astrocytes ayant été cocultivés sécrètent le(s) facteur(s) d'induction, démontrant que des échanges réciproques entre les cellules endothéliales et les astrocytes sont nécessaires à ces phénomènes d'inductions (Fig. 30). cellule endothéliale



Figure 30 : Intercommunication entre les cellules endothéliales et les astrocytes lors de la coculture.

Cette intercommunication entre les deux types cellulaires nous permet donc de comprendre pourquoi le milieu conditionné par les astrocytes est insuffisant pour recréer l'intégrité de la BHE et que l'adjonction de certaines substances (AMPc, inhibition de la phosphodiesterase cyclique) peut jusque dans une certaine mesure pallier à l'insuffisance du milieu conditionné.

Ainsi la présence du récepteur apo(B,E) à la surface de l'endothélium cérébral apparait être l'une des nombreuses caractéristiques de la BHE. Nos résultats montrent qu'il existe une intercommunication entre les cellules endothéliales de capillaires cérébraux et les astrocytes.

2- Récepteur LDL des capillaires cérébraux

L'induction du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, par les astrocytes déprimés en cholestérol, permet d'envisager le rôle de ce récepteur dans le transport du cholestérol plasmatique aux cellules nerveuses ; ceci par l'intermédiaire des LDL.

Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux mises en culture fixent et internalisent les LDL ; ceci par l'intermédiaire du récepteur apo(B,E) (Méresse et al., 1989 ; Dehouck et al., 1994). Ce récepteur est exprimé en dépit de la présence de

lipoprotéines dans le milieu de culture et de la confluence des cellules endothéliales. Ceci nous indique que l'expression de ce récepteur n'est pas régulée comme dans le schéma classique de Goldstein et Brown et qu'il a sûrement une fonction différente de celle qui lui est attribuée normalement. Son rôle ne serait pas de subvenir au besoin en cholestérol des cellules endothéliales. En effet, les LDL une fois internalisées ne sont pas dégradées par les cellules endothéliales. Ceci au contraire des LDL acétylées fixées, internalisées et ensuite dégradées par ces cellules. La non dégradation des LDL natives n'est donc pas due au manque d'enzymes permettant cette dégradation. Ces LDL ne sont pas dirigées vers les compartiments lysosomaux mais vers la face abluminale pour être relarguée dans le parenchyme cérébral.

Dans les autres organes, les LDL atteignent les cellules du parenchyme, après avoir traversé l'endothélium vasculaire (van Hinsbergh et al., 1983 ; Vasile et al., 1983 ; Wiklund et al., 1985 ; Hashida et al., 1986 ; Snelting-Havinga et al., 1989). Ce transport n'est pas médié par un récepteur. En effet, dans les organes périphériques, l'endothélium intact, n'exprime pas le récepteur apo(B,E) qui est inhibée à la fois par la présence de lipoprotéines dans le plasma et par la confluence des cellules endothéliales. Pour certains auteurs ce transport est non saturable (Smith et al., 1983). Pour d'autres, il est saturable mais l'interaction entre la LDL et l'endothélium est de faible affinité (Hashida et al., 1986) (Fig. 31).



Figure 31 : Schéma récapitulatif des informations concernant le métabolisme des LDL dans l'endothélium des organes périphériques et des capillaires de la BHE. D'après Méresse (1988).

Ainsi l'endothélium intact, dépourvu de récepteur, ne métabolise pas les LDL mais permet la diffusion de la lipoprotéine intacte vers les cellules du parenchyme (Wang-Iverson et al., 1988). Ce transport n'etant pas régulé, il peut provoquer l'accumulation locale des lipides dans les parois vasculaires et ainsi être impliqué dans la formation des plaques athéromateuses (Hoff et al., 1978 ; Smith et Ashall, 1983).

Comme nous l'avons vu précédemment, la BHE restreint les phénomènes de diffusion et privilégie les transports spécifiques entre les compartiments plasmatique et nerveux. En effet, nos travaux montrent un transport spécifique des LDL au travers de l'endothélium cérébral. Ce transport est inhibé par un anticorps bloquant la fixation des LDL à leur récepteur et nécessite de l'énergie. Ces résultats sont en faveur d'une transcytose spécifique des LDL médiée par le récepteur apo(B,E), au travers de la BHE.



Figure 32 : Transport des LDL au travers de la BHE et rôle hypothétique des astrocytes dans la recomposition et la distribution des lipides aux cellules du système nerveux central.

Lorsque les astrocytes sont déprimés en cholestérol, ils induisent une augmentation de l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales (article 3).

Ce phénomène provoque une augmentation du transport des LDL aux travers de l'endothélium cérébral. Le statut lipidique des astrocytes peut donc influencer le transport des LDL au travers de la BHE. Ces astrocytes, capables de fixer et de dégrader les LDL peuvent directement être impliqués dans le devenir des LDL ayant atteint le parenchyme cérébral. Pitas et al. (1987) suggèrent en effet le rôle des astrocytes dans la distribution des lipides aux cellules nerveuses (Fig. 32).

Ainsi à l'inverse de l'endothélium périphérique les LDL ne peuvent pas diffuser au travers de l'endothélium cérébral. Le rôle du récepteur apo(B,E) est de transporter les LDL au travers de la BHE de façon spécifique (Fig 31).

## 3-Perspectives

#### \*Recherche fondamentale

L'une des premières préoccupations sera de déterminer le trafic intracellulaire des LDL.

Nos études études préliminaires nous ont montré que l'interaction des LDL avec l'endothélium des capillaires cérébraux s'effectue non pas par l'intermédiaire de vésicules recouvertes de clathrine, comme c'est le cas pour le récepteur LDL classique, mais par des vésicules non recouvertes nommées caveolae. Il a été montré récemment (Schnitzer et al., 1994) que les caveolae étaient impliqués dans un grand nombre de fonctions cellulaires, incluant l'endocytose, la transcytose et la potocytose. Ces auteurs montrent que des substances capables de se fixer au cholestérol, comme la filipin, antibiotique de type macrolite, permettent de différencier en désorganisant les caveolae, une transcytose clathrine dépendante, d'une transcytose caveolae dépendente. Ainsi, l'utilisation de filipin, pourra nous renseigner sur le devenir des LDL natives et des LDL actétylées dans la cellule endothéliale. Des études en microscopie à fluorescence, microscopie confocale et électronique nous permettrons d'établir point par point le trafic intracellulaire de ces lipoprotéines.

Dans un second temps, nous nous intéresserons au devenir de la lipoprotéine et plus principalement de ces lipides, dans le parenchyme cérébral. L'utilisation de lipides fluorescents incorporés aux lipoprotéines nous permettra d'étudier les échanges lipidiques entre le sang et le cerveau, ainsi que le métabolisme de ces lipides par les cellules nerveuses. Nous déterminerons le rôle des astrocytes dans la recomposition et la distribution des lipides aux cellules du système nerveux central.
## \*Recherche pharmacologique

Nos travaux nous permettent d'envisager l'utilisation des lipoprotéines en tant que vecteurs de médicaments à destinée cérébrale. En effet, un des problèmes majeurs lors de cancers primaires à métastases cérébrales, est la présence de la P-glycoprotéine au niveau de l'endothélium cérébral, qui prend en charge et expulse les médicaments anti-cancéreux qui pour ces raisons ne peuvent pas atteindre le cerveau. Ainsi, dès qu'une métastase cérébrale s'installe, l'utilisation de la chimiothérapie est vaine et le pronostic vital des patients dépasse rarement les 6 mois. Or lors de la prolifération de cellules cancéreuses, celles-ci, pour fabriquer leur membrane, ont besoin d'un apport important de cholestérol. Compte tenu de nos résultats quant à l'uprégulation du récepteur LDL lorsque les astrocytes sont déprimés en cholestérol et l'augmentation de la transcytose qui s'en suit, il serait concevable d'envisager d'incorporer des substances anti-cancéreuses dans les LDL. Cette approche de "drug delivery" aurait deux avantages importants :

- cibler les cellules tumorales qui si, notre hypothèse s'avère exacte, conduirait a une augmentation locale de la perméabilité de la BHE au LDL.

- contourner l'action de la P-glycoprotéine. En effet, les substances anticancéreuses se trouvant dans les LDL, seraient véhiculées à l'intérieur de vésicules "caveolae" et d'endosomes. Compte tenu du fait que les LDL ne sont pas dégradées lors de la transcytose, à aucun moment ces médicaments ne se retrouvront dans le cytoplasme de la cellule et pour ces raisons, ne seront pas expulsés par la P-glycoprotéine.

## BIBLIOGRAPHIE

•

- Alaupovic P., Lee D.M. and MC Conaty W.J. (1972).
   Studies of composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoproteins families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. Biochim. Biophys. Acta 60, 689.
- Albrecht U., Seuberger H., Schwarz H. and Risau W. (1990). Correlation of blood-brain barrier function and HT7-protein distribution in chick brain circumventricular organs. Brain Res. In press.
- Anderson J.M., Balda M.S. and Fanning A.S. (1993). The structure and regulation of tight junctions. Cell Biology 5, 772-778.
- Arthur F.E., Shivers R.R. and Bowman P.D. (1987).
   Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium : an efficient in vitro model. Dev. Brain Res. 36, 155-159.
- Audus K.L. and Borchardt R.T. (1986). Characterization of an in vitro blood-brain barrier model system for studying drug transport and metabolism. Pharmaceutical Res. 3, 81-87.
- Balda M.S., Gonzales-Mariscal L., Matter L., Cereijido M. and Anderson J.M. (1993). Assembly of the tight junction : the role of diacylglycerol. J. Cell Biol. 123, 293-302.
- Banks W.A., Kastin A.J., Fasold M.B., Barrera C.M. and Augereau G. (1988). Studies of the slow bidirectional transport of iron and transferrin across the blood-brain barrier. Brain Res. Bull. 21, 881-885.
- Bar R.S., Denose A., Sandra A., Peacock M.L. and Owen W.G. (1983). Insulin binding to microvascular endothelium of intact heart : a kinetic and morphometric analysis. Am. J. Physiol. 244, E447.
- Barbaras R., Puchois P., Fruchart J.C. and Ailhaud G. (1987). Cholesterol efflux from cultured adipose cells is mediated by Lp AI particules but not by Lp AI:AII particules. Biochem. Biophys. Acta 142, 63-69.
- Beck D.W., Roberts R.L. and Olson J.J. (1986).
   Glial cells influence membrane-associated enzyme activity at the blood-brain barrier. Brain Res. 381, 131-137.

- Beck D.W., Vinters H.V. Hart M.N. and Cancilla P.A. (1984).
   Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. J. Neuropath. Exp. Neurol. 43, 219-224.
- Bertler A., Falck B., Owman C. and Rosengren E. (1966). The localization of monoaminergic blood-brain mechanisms. Pharmacol. Rev. 18, 369-385.
- Bertler A., Falck B. and Rosengren E. (1964).
   The direct demonstration of a barrier mechanism in the brain capillaries. Acta Pharmacol. Toxicol. 20, 317-321.
- Betz A.L. (1983).
   Sodium transport from blood to brain : inhibition by furosemide and amiloride. J. Neurochem. 41, 1158-1164.
- Betz A.L., Csejtey J. and Goldstein G.W. (1979).
   Hexose transport and phosphorylation by capillaries isolated from rat brain. Am. J. Physiol. 236, C96-C102.
- Betz A.L., Firth J.A. and Goldstein G.W. (1980).
   Polarity of the blood-brain barrier : distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. Brain res. 192, 17-28.
- Betz A.L. and Goldstein G.W. (1978). Polarity of the blood-brain barrier : neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. Science 202, 225-227.
- Betz A.L. and Goldstein G.W. (1981).
   Developmental changes in metabolism and transport properties of capillaries isolated from rat brain. J. Physiol. 312, 365-376.
- Biedl A. and Kraus R. (1898). Über eine bisher unbekannte toxische wirkung der gallen saüren auf das zentralnervensystem. Innere Med. 47, 1185-1200.
- Birnbaum M.J., Haspel H.C. and Rosen O.M. (1986).
   Cloning and characterization of acDNA encoding the rat brain glucose-transporter protein Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5784-5788.

- Bloch K., Berg B.N. and Rittenberg D. (1943).
   The biological conversion of cholesterol to cholic acid. J. Biol. Chem. 149, 511-517.
- Boado R.J. and Pardridge W.M. (1991).
   A one-step procedure for isolation of poly A<sup>+</sup>mRNA from isolated brain capillaries and endothelial cells in culture. J. Neurochem. 57, 2136-2139.
- Boado R.J. and Pardridge W.M. (1993).
   Glucose deprivation causes post-transcriptional activation of brain capillary endothelial glucose transporter gene expression via GLUT1 mRNA stabilization. J. Neurochem. 60, 2290-2296.
- Bowman P.D., Betz A.L., Ar D., Wolinsky J.S., Penney J.B., Shivers R.R. and Goldstein G.W. (1981).
   Primary culture of capillary endothelium from rat brain. In Vitro 17, 353-362.
- Boyles J.K., Pitas R.E., Wilson E., Mahley R.W. and Taylor J.M. (1985). Apo E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nomyelinating glia of the periferal nervous system. J. Clin. Invest. 76, 1501-1513.
- Bradbury M.W.B. and Kleeman C.R. (1967). Stability of potassium content of cerebrospinal fluid and brain. J. Physiol. 213, 519-528.
- Bradbury M.W.B. and Stulcova B. (1970). Efflux mechanism contributing to the stability of the potassium concentration in cerebrospinal fluid. J. Physiol. 208, 415-430.
- Brecher P. and Kuan H.T. (1979).
   Lipoprotein lipase and acid lipase activity in rabbit brain microvessels. J. Lipid Research 20, 464-471.
- Brightman M.W. (1989).
   The anatomic basis of the blood-brain barrier. In : Implications of the blood-brain barrier and its manipulation Vol 1 pp 53-83. Edited by Neuwelt E.A. Plenum Medical Book Company New York and London.
- Brightman M.W. and Reese T.S. (1969).
   Junctions between intimaly apposed cell membranes in the vertebrate brain. J. Cell. Biol. 40, 648-677.

- Brown M.S. et Goldstein J.L. (1985).
   Les récepteurs des LDL, le cholestérol et l'athérosclérose. Pour la Science 1, 62-71.
- Brown M.S. and Goldstein J.L. (1986).
   A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. Science 232, 34-47.
- Brown M.S., Herz J., Kowal R.C. and Goldstein J.L. (1991). The low density lipoprotein : double agent or decoy ? Current Opinion in Lipidology 2, 65.
- Cancilla P.A., Berliner J.A. and Bready J.V. (1990).
   Astrocytes and the blood-brain barrier. Kinetics of astrocyte activation after injury and induction effectes on endothelium. In : Johansson B.B., Owman C. and Widner J., eds. Pathophysiology of the blood-brain barrier. Amsterdam : Elsevier 1990, 31-39.
- Carlsson J., Armstrong V.W., Reiber H., Felgenhauer K. and Seidel D. (1991).
   Clinical relevance of the quantification of apolipoprotein E in cerebrospinal fluid. Clinical Chimica Acta. 196, 167-176.
- Casella S.J., Han V.K., D'Ercole A.J., Svoboda M.E. and Van Wyk J.J. (1986). Insulin-like grow factor II binding to the type I somatomedin receptor. Evidence for two high affinity binding sites. J. Biol. Chem. 261, 9268-9272.
- Cefalu W.T. and Pardridge W.M. (1985).
   Restrictive transport of a lipid-soluble peptide (cyclosporin) through the blood-brain barrier.
   J. neurochem. 45, 1954-1956.
- Chiba H., Mitamura T., Fujisawa S.I., Ogata A., Aimoto Y., Tashiro K. and Kobayashi K. (1991).

Apolipoproteins in rat cerebrospinal fluid : a comparison with plasma lipoprotein metabolism and effect of aging. Neuroscience Letters 133, 207-210.

- Christensen H.N. (1975).

Recognition sites for material transport and information transfer. In Bonner F., kleinzeller A., eds. Current topics in membranes and transport. New York : Academic Press, 227-258.

- Citi S., Amorosi A., Franconi F., Giotti A. and Zampi G. (1991). . Cingulin, a specific protein component of tight junction, is expressed in normal and neoplastic human epithelial tissues. Am. J. Pathol. 138, 781-789.
- Citi S., Sabanay H., Jakes B., Geiger B. and Kendrick-Jones J. (1988). Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. Nature 333, 272-276.
- Claude P. and Goodenough D.A. (1973).
   fractures faces of "zonulae occludentes" from "tight" and "leaky" epithélia. J. Cell. Biol. 58, 390-400.
- Cordon-Cardo C., O'Brien J.P., Casals D., Rittman-Grauer L., Bielder J.L., Melamed M.R. and Bertino J.R. (1989).
   Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at the blood barrier sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 816 : 695-698.
- Cornford E.M. (1988).
   Zur anatomie und entwricklung der blut-hirn-schanke.Sandorama 1988. III.
- Cremer J.E., Ray D.E., Sama G.S. and Cunningham V.J. (1981).
   A study of the kinetic behaviour of glucose based on simultaneous estimates of influx and phosphorylation in brain regions of rats in different physiologic states. Brain Res. 221, 331-342.
- Crone C. (1965).
   Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. J. Physiol. 181, 103-113.
- Crone C. and Olesen S.P. (1982). Electrical resistance of brain microvascular endothelium. Brain Res. 241, 49-55.
- Cummings R.D., Kornfeld S., Schneider W.J., Hobgood K.K., Tolleshaug M., Brown M.S. and Goldstein J.L. (1983).
   Biosynthesis of N and O-linked oligosaccharides of the Low Density Lipoprotein receptor.
   J. Biol. Chem. 258, 15261-15273.
- Davidson A.N. and Wajda M. (1959).
   Persistence of cholesterol-4-<sup>14</sup>C in the central nervous system. Nature 183, 1606-1607.
- DeBault L.E. (1981).

 $\gamma$ -glutamyltranspeptidase induction mediated by glial foot process to endothelium contact in co-culture. Brain Res. 220, 432-435.

- DeBault L.E. and Cancilla P.A. (1980).
   γ-glutamyltranspeptidase in isolated brain endothelial cells : induction by glial cells in vitro. Science 207, 653-655.
- DeBault L.E., Henriquez E., Hart M.N. and Cancilla P.A. (1981). Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture. In Vitro 17, 480-494.
- Dehouck M.P., Méresse S., Delorme P., Fruchart J.C. and Cecchelli R. (1990). An easier, reproductible and mass production method ti study theblood-brain barrier "in vitro" and in vivo" models. J. Neurochem. 54, 1790-1797.
- Delorme P. (1972).

Différenciation ultrastructurale des jonctions intercellulaires de l'endothelium des capillaires télencéphaliques chez l'embryon de poulet. Z. Zellforsch. 133, 571-582.

- Delorme P., Gayet J. and Grignon G. (1970). Ultrastructural study on transcapillary exchanges in the developing telencephalon of the chicken. Brain Res. 22, 269-283.
- Delorme P., Gayet J. and Grignon G. (1975).
   Diffusion of horseradish peroxidaxe perfused through the lateral ventricle of the chock telencephalon. Cell Tiss. Res. 157, 535-540.
- Delorme P., Grignon G. and Gayet J. (1968).
   Ultrastructure des capillaires dans le télencéphale de poulet au cours de l'embryogénèse et de la croissance post-natale. Z. Zellforsch 87, 592-602.
- Descamps L., Dehouck M-P., Fruchart J.C., Torpier G. and Cecchelli R.
   Receptor mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells.
   Am. J. Physiol. Soumis
- Diglio C.A., Grammas P., Giacomelli F and Wiener J. (1982).
   Primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells. Lab. Invest. 46, 554-563.

- Dobbing J. (1963). The entry of cholesterol into rat brain during development. J. of Neurochem. 10, 739-742.
- Dorovini-Zis K., Anders J.J. and Brightman M.W. (1980).
   Cerebral endothelium, blood-brain barrier and the astrocyte membrane. In : the blood-retinal barriers. Edited by Jose G. Cunha-Vaz (Plenum Publishing Corporation).
- Drenckhahn D. and Dermietzel R. (1988).
   Organization of the actin filalment cytoskeleton in the intestinal brush border : a quantitative and qualitative immunoelectron microscope study. J. Cell Biol. 107, 1037-1048.
- Duckrow R.B. (1988).
   Glucose transfer into rat brain during acute and chronic hyperglycemia. Metab. Brain Dis. 3, 201-209.
- Duffy V.R., Cha T.B. and Pardridge W.M. (1986).
  In vivo evidence that brain insulin originates from blood. Clin. Res. 34, 57A.
- Duffy D.R., Pardrigde W.M. and Rosenfeld R.G. (1988).
   Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor. Metabolism 37, 136-140.
- Eckel R.H. and Robinson R.J. (1984).
   Lipoprotein lipase in produced, regulated and functional in rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7604-7607.
- Ehrlich P. (1885).
   Das sauerstoffbedürfniss des organismus. Ein farbenanalistische studie. A. Hirschwald Edit., Berlin, 1885.
- Eisenberg H.M. and Suddith R.L. (1979).
   Cerebral vessels have the capacity to transport sodium and potassium. Science 206, 1083-1085.
- Elshourbagy N.A., Liao W.S., Mahley R.W. and Taylor J.M. (1985). Apolipoprotein E mRNA is abundant in the brain and adrenals, as well as in the liver, and is present in other peripheral tissues of rats and marmosets. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 203-207.

- Esser V., Limbird L.E., Brown M.S., Golstein J.L., Russel D.W. (1988).
   Mutational analysis of the ligand binding domain of the receptor. J. Biol. Chem. 263, 13282.
- Estrada C., Bready J., Berliner J. and Cancilla P.A. (1990).
   Choline uptake by cerebral capillary endothelial cells in culture. J. Neurochem. 54, 1467-1473.
- Farrell C.L. and Pardridge W.M. (1991).
   Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrical by distributed on brain capillary endothelial lumenal and ablumenal plasma menbrane : An electron microscopic immunogold study. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 5779-5783.
- Fishman J.B., Rubin J.B., Handrahan J.V., Connor J.R. and Fine R.E. (1987).
   Receptor -mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. J. Neurosci.
   Res. 18, 299-304.
- Frank H.J.L., Jankovic-Vokes T., Pardridge W.M. and Morris W.L. (1985).
   Enhanced insulin binding to blood-brain barrier in vivo and to brain microvessels in vitro in newborn rabbits. Diabetes 34, 728-733.
- Frank H.J.L. and Pardridge W.M. (1981).
   A direct in vitro demonstration of insulin binding to isolated brain microvessels. Diabetes 30, 757.
- Frank H.J.L., Pardridge W.M., Morris W.L., Rosenfeld R.C. and Choi T.B. (1986).
   Binding and internalization of insulin-like growth factors by isolated brain microvessels.
   Diabetes 35, 654-661.
- Friden P.M., Walus L.R., Musso G.F., Taylor M.A., Malfroy B. and Starzyk R.M. (1991).

Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 4771-4775.

- Furuse M., Hirase T., Itoh M., Nagafuchi A., Yonemura S., Tsukita S and Tsukita S. (1993).

J. Cell Biol. 123, 1777-1788.

- Ganong W.F. (1989).

Circulation through special regions. In Review of Medical Physiology. pp, 514-532. Prentice-Hall International Inc.

- Gavin L.A., Cavalieri R.R., Moeller M., Mc Mahon F.A., Castle J.N. and Gulli R. (1987). Brain lipoprotein lipase is responsive to nutritional and hormonal modulation. Metabolism 36, 919-924.
- Gelman B.B., Rifai N., Bouldin T.W. and Krigman M.R. (1987). Apolipoprotein E is released by rat sciatic nerve during segmental demyelinisation and remyelinisation. J. Neuropathol. exp. Neurol. 46, 644-652.
- Goetz I.E., Warren J., Estrada C., Roberts E. and Krause D. (1985).
   Long-term serial cultivation of arterial and capillary endothelium from adult bovine brain. In Vitro Cellular and Development Biology 21, 172-180.
- Goldmann E.E. (1913).
   Vitalfärbung am zentral nerven system. Beitrag zur physiologie des plexus choroïdus und der hirnhaute (Berlin).
- Goldstein G.W. and Betz A.L. (1983). Recent advances in understanding brain capillary fonction. Ann. Neurol. 14, 389-395.
- Goldstein G. et Betz L. (1986).
  La barrière qui protège le cerveau. Pour la Science 109, 84-94.
- Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K. and Brown M.S. (1979).
   Binding site on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 333-338.
- Goodrum J.F. (1991).
   Cholesterol from degenerating nerve myelin becomes associated with lipoproteins containing apolipoprotein E. J. Neurochem. 56, 2082-2086.
- Goodrum J.F. and Novicki D.L. (1988).
   Macrophage-like cells from explant cultures of rat scyatic nerve produce apolipoprotein E. J. Neurosci. Res. 20, 457-462.

- Greenberger L.M., Yang C.P.H., Gindin E. and Horwitz S.B. (1990). Photoaffinity probes for the alpha 1 - adrenergic receptor and the calcium channel bind to a common domain in p-glycoprotein. J. Biol. Chem. 265, 4394-4401.
- Gumbiner B., Lowenkopf T. and Apatira (1991).
   Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. Proc.
   Natl. Acad. Sci. USA. 88, 3460-3464.
- Hansen A., Lund-Anderson H. and Crone C. (1977).
   K+-permeability of the blood-brain barrier investigated by aid of a K+-sensitive microelectrode. Acta Physiol. Scand. 101, 438-445.
- Hardebo J.E., Falck B. and Owman C. (1979).
   A comparative study on the uptake and subsequent decarboxylation of monoamine precursors in cerebral microvessels. Acta Physiol. Scand. 107, 161-167.
- Hardebo J.E. and Owman C. (1980).
   Barrier mechanisms for neurotransmitter monoamines and their precursor at the blood-brain barrier interface. Ann. Neurol. 8, 1-11.
- Harik S.T. and La Manna J.C. (1988).
   Vascular perfusion and blood-brain glucose transport in acute and chronic hyperglycemia. J. Neurochem. 51, 1924-1929.
- Harmut W.G., Sommerfeldt M., Papandrikopoulou A., Mischek U., Bonitj D., Frey A., Grupe M., Scheerer J. and Gassen H.G. (1990).
   Synthesis of apolipoprotein A-1 in pig brain microvascular endothelial cells. J. Neurochem. 54, 444-450.
- Hashida R., Anazimu C., Kiruma J., Ohkuma S., Yoshida Y. and Takano T. (1986).
   Transcellular transport of lipoprotein through arterial endothelial cells in monolayer culture.
   Cell Struct. Funct. 11, 31-37.
- Hauptmann A. (1926).
   Der "Weg über den liquor" (ein never zugang zum verständuis toxischer zerebrospinalerkran-kungen). Dtsch. Z. Nervenheilk. 89, 53-65.
- Higgins C.F. (1994).
   Flip-flop : The transmembrane translocation of lipids. Cell 79, 393-395.

- Hirsch M., Montcourrier P., Arguillère P. and Keller N. (1985). The structure of tight junctions in the ciliary epithelium. Curr. Eye Res. 4, 207-215.
- Hofmann S., Russel D.W., Goldstein J.L. and Brown M.S. (1987).
   mRNA for Low Density Lipoprotein receptor in brain and spinal cord of immature and mature rabbits. Proc. Acad. sci. USA 84, 6312-6316.
- Ignatius M.J., Gebicke-Haerter P.J., Skene J.H.P., Schilling J.W., Weisgraber K.H., Mahley R.W. and shooter E.M. (1986).
   Expression of apolipoprotein E during degeneration and regeneration. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1125-1129.
- Illingworth D.R. and Glover J. (1970).
   Lecithin : cholesterol acyl transferase activity in human cerebrospinal fluid. Biochim.
   Biophys. Acta 220, 610-613.
- Janzer R.C. and Raff M.C. (1987). Astrocytes induce blood-brain properties in endothelial cells. Nature 325, 253-257.
- Jefferies W.A., Brandon M.R., Hunst S.V., Williams A.F., Gatter K.C. ans Mason D.Y. (1984).

Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. Nature 321, 162-163.

- Joo' F. (1972).
   Effect of N<sup>6</sup>O<sup>2</sup>- dibutyryl cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate on the pinocytosis of brain capillaries of mice. Experientia 28, 1470-1471.
- Joo' F., Rakonczay Z. and Wollemann M. (1975).
   cAMP-mediated regulation of the permeability in the brain capillaries. Experientia 31, 582-583.
- Joo' F., Temesvari P. and Dux E. (1983).
   Regulation of the macromolecular transport in the brain microvessels : the role of cyclic GMP. Brain Res. 278, 165-174.
- Juranka P.F., Zastawny R.L. and Ling V. (1989).
   P-glycoprotein multidrug resistance and a superfamily of membrane transport proteins.FASEB J. 3, 2583-2592.

- Kenagy R., Bierman E.L., Schwartz and Albers J.J. (1984).
   Metabolism of low density lipoprotein by bovine endothelial cells as a function of cell density. Arteriosclerosis 4, 365.
- Kimelberg H. (1983). Primary astrocyte cultures-A key to astrocyte function. Cell. Mol. Biol. 3, 1-15.
- Kimelberg H.K., Bowman C., Biddlecome S. and Bourke R.S. (1979).
   Cation transport and membrane potential properties of primary astroglial cultures from neonatal rat brains. Brain Res. 177, 533-550.
- Kimelberg H. and Norenberg M. (1989). Les astrocytes. Pour la Science n°140, 78-89.
- Kowal R.C., Herz J., Weisgraber K.H., Mahley R.W., Brown M.S. and Goldstein J.L. (1990).
   Opposing effects of apolipoprotein E and C on lipoprotein binding to LRP. J. Biol. Chem.

Opposing effects of apolipoprotein E and C on lipoprotein binding to LRP. J. Biol. Chem. 265, 10771.

- Lai F.M., Udenfriend S. and Spector S. (1975).
   Presence of norepinephrine and related enzymes in isolated brain microvessels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 4622-4625.
- Lestavel S. and Fruchart J.C. (1994).
  Lipoprotein receptors. Cell. Mol. Biol. 40, 461-481.
- Lewandowsky M. (1900).
  Zur lehre von der cerebrospinalflüssigkeit. Z. Klin. Med. 40, 480-494.
- Lidinsky W.A. and Drewes L.R. (1983).
   Composition of the blood-brain barrier : protein composition of the capillaries endothelial cell membrane. J. Neurochem. 41, 1341-1348.
- Lin T.H., Sawada Y., Iga T. and Hanano M. (1987).
   Inhibition of blood-brain barrier permeability to DL-propranolol by serum from acute renal failure rats. Biochem. Pharmacol. 36, 3425-3431.

- Luc G., Lecerf J.M., Bard J.M., Hachulla E., Fruchart J.C. and Devulder B. (1991). Cholesterol et athérosclérose, Masson, Paris.
- Lund-Andersen H. (1979). Transport of glucose from blood to brain. Physiol. Rev. 59, 305-352.
- Madara J.L. (1987).
   Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. Amer. J. Physiol. 253, C171-C175.
- Madara J.L. and Pappenheimer J.R. (1987).
   Structural basis for physiological regulation for paracellular pathways in intestinal epithelia.
   J. Membr. Biol. 100, 149-164.
- Mahley R.W., Weisgrader K.H. and Innerarity T.L. (1979). Interaction of plasmalipoproteins containing apolipoproteins B and E with heparin and cell surface receptors. Biochim. Biophys. Acta 575, 581.
- Mahley R.W. and Innerarity T.L. (1983).
   Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. Biochim. Biophys. Acta 737, 197-222.
- Martin A., Swarbrick J. and Cammarata A. (1983).
   Diffusion and dissolution. In Physical Pharmacy 399-444, Lea & Febiger, Philadelphia.
- Martin-Nizard F., Méresse S., Cecchelli R., Fruchart J.C. and Delbart C. (1989).
   Interactions of high density lipoprotein 3 with brain capillary endothelial cells. Biochim.
   Biophys. Acta 1005, 201-208.
- Maxwell K., Berliner J. and Cancilla P.A. (1987).
   Induction of γ-glutamyl-transpeptidase in cultured cerebral endothelial cells by a product release by astrocytes. Brain Res. 410, 309-314.
- Maxwell K., Berliner J. and Cancilla P.A. (1989).
   Stimulation of glucose analogue uptake by cerebral microvessel endothelial cells by a product released by astrocytes. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 48, 69-80.

Méresse S. (1988)
 Récepteurs des lipoprotéines et barrière hémato-encéphalique. Thèse de Doctorat de Sciences
 Pharmaceutiques. Université de Lille II

- Méresse S., Delbart C., Fruchart J.C. and Cecchelli R. (1989).
   Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. J. Neurochem. 53, 340-345.
- Méresse S., Dehouck M.-P., Delorme P., Fruchart J.C. and Cecchelli R. (1991).
   Lipoproteins and reconstituted blood-brain barrier. Pharmaceutical Applications of Cell and Tissue Culture to Drug Transport 217-229.
- Meyer J.S., Stoica E.and Paxu I. (1973).
   Catecholamine concentration in CSF and plasma of patients with cerebral infarction and haemorrhage. Brain Res. 96, 277-288.
- Middleton B. and Middleton A. (1992).
   Cyclic AMP stimulates the synthesis and fonction of the LDL receptor in human vascular smooth muscle cells and fibroblasts. Biochem. J. 282, 853.
- Miller R.H. and Raff M.C. (1984).
   Fibrous and protoplasmic astrocytes are biochemically and developmentally distinct. J.
   Neurosci. 12, 517-534.
- Minakawa T., Bready J., Berliner J., Fisher M. and Cancill P.A. (1991).
   In vitro interaction of astrocytes and pericytes with capillary-like structures of brain microvessel endothelium. Lab. Invest. 65, 32-40.
- Mollgard K., Malinowska D.H. and Saunders N.R. (1976).
   Lack of correlation between tight junction morphology and permeability properties in developing choroïd plexus. Nature. 264, 293-294.
- Morris C.M., Keith A.B., Edwardson J.A. and Pullen R.G.L. (1992). Uptake and distribution of iron and transferrin in the adult rat brain. J. Neurochem. 59, 300-306.
- Nigam S.K., Denisenko N., Rodriguez-Boulan E. and Citi S. (1991).
   The role of phosphorylation in development of tight junction in culture renal epithelial (mdck) cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 181, 548-553.
- Oldendorf W.H. (1971).
   Brain uptake of radiolabeled aminoacids, amines, and hexoses after arterial injection. Am. J.
   Physiol. 221, 1629-1639.

- Oldendorf W.H. (1971).

Measurement of brain uptake of radiolabeled substance using a tritiated water internal standard. Brain Res. 24, 372-376.

- Oldendorf W.H. and Szabo J. (1976). Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers. Am. J. physiol. 230, 94-98.
- Orlowski M., Meister A. (1970).
   The γ-glutamyl cycle : a possible transport system for amino acids. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 67, 1248-1255.
- Pardridge W.M. (1977).
   Kinetics of competitive inhibition of neutral aminoacid transport across the blood-brain barrier. J. Neurochem. 28, 103-108.
- Pardridge W.M. (1986).
   Receptor-mediated peptide transport through the blood-brain barrier. Endocrine Rev. 7, 314-330.
- Pardridge W.M. (1991).
   Peptide drug delivery to the brain. New-york : Raven Press, 1-357.
- Pardridge W.M. (1993).
   The blood-brain barrier, cellular and molecular biology. New York : Raven Press, 395-440.
- Pardridge W.M., Boado R.J. and Farrell C.R. (1990).
   Brain type glucose transporter (GLUT 1) is selectively localized to the blood-brain barrier.
   Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. J. Biol. Chem. 265, 18035-18040.
- Pardridge W.M., Buciak J.L. and Friden P.M. (1991).
   Selective transport of an antitransferrin receptor antibody through the blood-brain barrier in vivo. J. Pharmacol. Exp. Ther. 259, 66-70.
- Pardridge W.M., Einsenberg J. and Yang J. (1985). Human blood-brain barrier insulin receptor. J. Neurochem. 44, 1771-1778.

- Pardrigde W.M. and Mietus L. (1980).
   Palmitate and cholesterol transport through the blood-brain barrier. J; Neurochem. 34, 463-466.
- Pardridge W.M. and Oldendorf W.H. (1977). Transport of metabolic substrates through the blood-brain barrier. J. Neurochem. 28, 5-12.
- Pardridge W.M., Sakiyama R. and Fierer G. (1983). Transport of propranolol and lidocaine through the rat blood-brain barrier. J. Clin. Invest.71, 900-908.
- Pardridge W.M., Sakiyama R. and Fierer G. (1984).
   Blood-brain barrier transport and brain sequestration of propranolol and lidocaine. Am. J.
   Physiol. 247, R582-R588.
- Pardridge W.M., Triguero D. and Farrell C.R. (1990).
   Down-regulation of blood-brain barrier glucose transporter in experimental diabetes.
   Diabetes 39, 1040-1044.
- Peters A., Palay S. and Webster H. de F. (1976).
   The fine structure of the nervous system : the neurons and supporting cells. W.B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, pp. 231-263.
- Pisam M. and Ripoche P. (1976).
   Redistribution of surface macromolecules in dissociated epithelial cells. J. Cell Biol. 71, 907-920.
- Pitas R.E., Boyles J.K., Lee S.H., Hui D. and Weisgraber K.H. (1987).
   Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. J. Biol. Chem. 262, 14352-14360.
- Pitas R.E., Innerarity T.L. and Mahley R.W. (1980).
   Cell surface receptor binding of phospholipid protein complexes containing different ratios of receptor-active and inactive apoE apoprotein. J. Biol. Chem. 256, 5454-5460.
- Poirier J. (1994).

Apolipoprotein E in animal models of central nervous system injury and in Alzheimer's disease. T.I.N.S. 17, 525-530.

- Poirier J., Hess M., May P.C. and Finch C.E. (1991).
   Astrocytic apolipoprotein E mRNA and GFAP mRNA in hippocampus after entorhinal cortex lesioning. Mol. Brain Res. 11, 97-106.
- Polonovski J. and Beucler I. (1983).
   Structure et métabolisme des lipoprotéines plasmatiques. Path. Biol. 31, 225.
- Puro D.G. and Agardh E. (1984).
   Insulin-mediated regulation of neuronal maturation. Science 1170-1172.
- Raub T.J. and Newton C.R. (1991).
   Recycling kinetics and transcytosis of transferrin in primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells. J. Cell Physiol. 149, 141-151.
- Raub T.J., Kuentzel S.L. and Sawada G.A. (1992). Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells in vitro : barrier tightening by a factor released from astroglioma cells. Experimental Cell Research 199, 330-340.
- Reese T.S. and Karnovski M.J. (1967).
   Fine structure localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. J. Cell Biol. 34, 207-217.
- Risau W., Dingler A., Albrecht U., Dehouck M-P. and Cecchelli R. (1992).
   Blod-brain barrier pericytes are the main source of γ-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. J. Neurochem.58, 667-671.
- Risau W., Hallmann R., Albrecht U. and Henze-Fahle H. (1986).
   Brain induces the expression of an early cell surface marker for blood-brain barrier specific endothelium. EMBO J. 5, 3179-3183.
- Risau W. and Wolburg H. (1990).
   Development of the blood-brain barrier. TINS. 13, 174-178.
- Rogan A.M., Hamilton T.C., Young R.C., Klecker J.R.W. and Ozols R.F. (1984).
   Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. Science 224, 994-996.
- Roheim P.S., Carey M., Forte T. and Vega G.L. (1979). Apolipoprotein in human cerebrospinal fluid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4646-4649.

- Rosenfeld R.G., Pham H., Keller B.T., Borchardt R.T. and Pardridge W.M. (1987).
   Demonstration and structural comparison of receptors for insulin-like growth factor-I and -II (IGF-I and -II) in brain and blood-brain barrier. Biochem. Biophys. Res. Commun. 149, 159-166.
- Rothe T. and Müller H.W. (1991).
   Uptake of endoneurial lipoprotein into schwann cells and sensory neurons is mediated by low density lipoprotein receptors and stimulated after axonal injury. Neurochem. 57, 2016-2025.
- Roux E. and Borrel A. (1898).
   Tetanos cérébral et immunité contre le tétanos. Ann. Inst. Pasteur, Paris. 4, 225-239.
- Rubin L.L., Hall D.E., Porter S., Barbu K., Cannon C., Horner H.C., Janatpour M., Liaw C.W., Manning K., Morales J., Tanner L.I., Tomaselli K.J. and Bard F. (1991).
   A cell culture model of the blood-brain barrier. J. Cell Biol. 115, 1725-1735.
- Ruetz S. and Gros P. (1994).
   Phosphatidylcholine translocase : A physiological role for the mdr 2 gene. Cell 77, 1071-1081.
- Sara V.R., Hall K., Misaki M., Fryklund L., Christensen N. and Wetterberg L. (1983).
   Ontogenesis of somatomedin and insulin receptor in the human fetus. J. Clin. Invest. 71, 1084-1094.
- Sara V.R., Hall K., Rodeck C.H. and Wetterberg L. (1981). Human embryonic somatomedin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 3175-3179.
- Saunders A.M., Strittmatter W.J., Schmechel D., St George-Hyslop P.H., Pericak-Vance M.A., Joo S.H., Rosi B.L., Gusella J.F., Crapper-Mac-Lachlan D.R., Alberts M.J., Hulette C., Crain C., Goldgaber D. and Roses A.D. (1993).
   Association of apolipoprotein E allele 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. Neurology 43, 1467-1472.
- Schinkel A.H., Smit J.J.M., van Tellingen O., Beijnen J.H., Wagenaar E., van Deemter L., Mol C.A.A.M., van der Valk M.A., Robanus-Maandag E.G., de Riele H.P.J., Berns A.J.M. and Borst H.P.J. (1994).
   Discuption of the mouse mdr 1 a p. glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain

Disruption of the mouse mdr 1 a p-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs. Cell 77, 491-502.

- Schmitz G. and Lackner K.J. (1993).
   High density lipoproteins and atherosclerosis. Current Opinion in Lipidology 4, 392.
- Schnitzer J.E. (1993).
   Update on the cellular and molecular basis of capillary permeability. Trends Cardiovasc Med. 3, 124-130.
- Schnitzer J.E., Oh P., Pinney E. and Allard J. (1994).
   Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium : reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. J. Cell Biol. 127, 1217-1232.
- Schosshauer B. and Herzog K.H. (1990).
   Neurothelin : an inducible cell surface glycoprotein blood-brain barrier-specific endothelial cells and distinct neurons. J. Cell. Biol. 110, 1261-1274.
- Seulberger H., Lottspeich F. and Risau W. (1990).
   The inducible blood-brain barrier specific molecule HT7 is a novel immunoglobulin-like cell surface glycoporotein. EMBO J. 9, 2151-2158.
- Shivers R.R., Betz A.L. and Goldstein G.W. (1984).
   Isolated rat brain capillaries possess intact, structurally complex interendothelial tight junctions; freeze facture verification of tight junction integrity. Brain Res. 324, 313-322.
- Siflinger-Birnboim A., Del Vecchio J., CooperJ.F., Blumenstock F.A. Sheppard J.M. and Malik A.B. (1987).
   Molecular Sieving characteristic of the cultured endothelial monolayer. J. Cell. Physiol. 132, 111-117.
- Simionescu M. and Simionescu N. (1988).
   Endothelial cell biology in health and disease. New York and London. Plenum Press, 69-104.
- Smith E.B. and Ashall C. (1983).
   Low-density lipoprotein concentration in interstitial fluid from human atherosclerotic lesions.
   Biochim. Biophys. Acta. 754, 249.

- Smith Q.R. and Rapoport S.I.(1984). Carrier-mediated transport of chloride across the blood-brain barrier. J. Neurochem. 42, 754-763.
- Snipes G.J., McGuire C.B., Norden J.J. and Freeman J.A. (1986).
   Nerve injury stimulates the secretion of apolipoprotein E by non-neuronal cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1130-1134.
- Spatz H. (1933).

Die bedeutung der vitalen farbung für die lehre von stoffanstausch zwischen dem zentralnervensystem und dem übrigen körper. Das morphologische substart der stoffwechselschranken im zentralorgan. Arch. Physiat. Nervenkr. 101,267-358.

- Spatz M. (1984).

Attenuated blood-brain barrier. In : Handbook of Neurochemistry, ed A. Lajtha, 7-501-543. New York : plenum.

- Spatz M., Maruki C., Abe T., Rausch W.D., Abe K. and Merkel N. (1981). The uptake and fate of the radiolabeled 5-hydroxytryptamine in isolated cerebral microvessels. Brain Res. 220, 214-219.
- Stanton L.W., White R.T., Bryant C.M., Protter A.A. and Endemann G. (1992).
   A macrophage Fc receptor for IgG is also a receptor for oxydized low density lipoprotein. J.
   Biol. Chem. 267, 22446.
- Stern L.S. et Gautier R. (1922).
   Les rapports entre le liquide céphalo-rachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal. Arch. Inter. Physiol. 17, 391-488.
- Stevenson B.R., Heintzelman M.B., Anderson J.M., Citi S. and Mooseker M.S. (1989).
   ZO-1 and cingulin : tight junction proteins with distinct identities and localizations. Am. J.
   Physiol. 257, C621-C628.
- Stevenson B.R., Siliciano J.D., Mooseker M.S. and Goodenough (1986).
   Identification of ZO-1 : a high molecular weight polypeptide associated with tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. J. Cell Biol. 103, 755-766.

- Stewart P.A. and Wiley M.J. (1981).
   Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells : a study quail-chick transplantation chimeras. Develop. Biol. 84, 183-192.
- Stoll G., Mueller H.W., Trapp B.D. and Griffin J.W. (1989).
   Oligodendrocytes but not astrocytes express apolipoprotein E after injury of rat optic nerve.
   Glia. 2, 170-176.
- Strittmatter W.J., Saunders A.M., Schmechel D., Pericak-Vance M., Enghild J., Salvesen G.S.and Roses A.D. (1993).
   Apolipoprotein E : High affinity binding to βA amyloid and increased frequency of type 4 allele in familial Alzheimer's. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1977-1981.
- Sudhoft C., Goldstein J.L., Brown M.S. and Russel D.W. (1985).
   The LDL receptor gene : a mosaic for exons shared with different proteins. Science 228, 815-822.
- Svendgaard N.A., Björklund A., Hardebo J.H. and Steneir U. (1975).
   Axonal degeneration associated with a defective blood-brain barrier in cerebral implants. Nature 255, 334-337.
- Swanson L.W., Simmon D.M., Hoffman S.L., Goldstein J.L. and Brown M.S. (1988).
   Localization of mRNA for low density lipoprotein receptor and cholesterol synthetic enzyme in rabbit nervous system by in situ hybridization. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9821-9825.
- Takemoto H., Kaneda K., Hosokawa M., Ide M. and Fukushima H. (1994). Conditioned media of glial cell lines induce alkaline phosphatase activity in cultures artery endorhelial cells. FEBS Letters 350, 99-103.
- Tamai I. and Safa A.R. (1990).
   Competitive interaction of cyclosporins with the vinca alkaloid-binding site of p-glycoprotein in multidrug-resistant cells.J. Biol. Chem. 265, 16509-16513.
- Tao-Cheng J.H. and Brightman M. (1988).
   Development of membrane interactions between brain endothelial cells and astrocytes. Int. J.
   Devl. Neurosci. 6, 25-37.

- Tao-Cheng J.M., Nagy Z. and Brightman M.W. (1990)
   Astrocytic orthogonal arrays of intramembranous particle assemblies are modulated by brain endothelial cells in vitro. J. Neurocytol. 19, 143-153.
- Tayarani I., Lefauconnier J.M., Roux F. and Bourre J.M. (1987).
   Evidence for an alanine serine and cysteine system of transport in isolated brain capillaries.
   J. Cereb. Blood Flow Metab. 7, 585-591.
- Taylor E.M., Crowe A. and Morgan E.H. (1991). Transferrin and iron uptake by the brain : effects of altered iron status. J. Neurochem. 57, 1584-1592.
- Tseng L.Y.-H., Brown A.L., Yang Y.W.-H., Romanus J.A., Orlowski C.C., Taylor T. and Rechler M.M. (1989).
   The fetal rat binding protein for insulin-like growth factor is expressed in the choroid plexus and cerebrospinal fluid of adult rats. Molec. Endocrinol. 3, 1559-1568.
- Tsuji A., Tamai I., Sakata A., Tenda Y. and Terasaki T. (1993). Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, p-glycoprotein. Biochem. Pharmacol. 46, 1096-1099.
- U H.S. and Evans-Laung M. (1983).
  Polar redistribution of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase in aggregating MDCK cells. Exp. Cell Res. 146, 192-198.
- Urien S., Pinquier J.L., Paquette B., Chaumet-Riffaud P., Kiechel J.R. and Tillement J.P. (1987).

Effect of the binding of isradipine and darodipine to different plasma proteins on their transfer through the rat blood-brain barrier : drug binding to lipoproteins does not limit the transfert of drug. J. Pharmacol. Exp. Ther. 242, 349-353.

- Van Bree J.B.M.M., De Boer A.G., Danhof M., Ginsel L.A. and Breimer D.D. (1988).
   Characterization of an in vitro blood-brain barrier : Effects of molecular size and lipophilicity on cerebrovacular endothelial transport rates of drugs. J. Pharmacol. Exp. Ther. 247, 1233-1239.
- Van Hinsberg V.W., Havekes L., Emeis J.J., Van Corven E. and Scheffer M. (1983). Low density lipoprotein metabolism by endothelial cells from human umbilical vein arteries and veins. Arteriosclerosis 3, 547.

- Van Houten M. and Posner B.I. (1979).
  Insulin binds to brain blood vessels in vivo. Nature 282, 623-625.
- Van-Iverson P., DeRosa P.M. and Brown W.V. (1988).
   Plasma lipoprotein interaction with endothelial cells. In : Endothelial cells. Ryan U.S. eds.CRC Press, Inc. Florida. 1, 179-190.
- Varon S. and Somjen G.G. (1979).
   Neuron-glia interactions. Neurosci. Res. Prog. Bull. 17, 1-239.
- Vasile E., Simionescu M. and Simionescu N. (1983).
   Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low densisty lipoprotein in the arterial endothelium in situ. J. Cell Biol. 96, 1677.
- Vigne P., Champigny G., Marsault R., Barbry P., Frelin C. and Lazdunski M. (1989).
   A new type of amiloride sensitive cationic channel in endothelial cells of brain microvessels.
   J Biol. Chem, 264, 7663-7668.
- Vigne P., Farre A.L. and Frelin C. (1994).
   Na+-K+-Cl- cotransporter of brain capillary endothelial cells. J. Biol. Chem. 269, 19925-19930.
- Viraló S., Camps L., Reina M., Perez-Clausell J., Lloberao M. and Olivecrona T. (1990).
   Localization of lipoprotein lipase to discrete areas of the guinea pig brain. Brain Research. 506, 249-253.
- Vlodavsky I., Fielding P.E., Fielding C.J. and Gospodarowicz D. (1978).
   Role of contact inhibition in the regulation of receptor-mediated uptake of low density lipoprotein in cultured vascular endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75, 356-360.
- Vorbrodt A.W., Lossinsky A.S. and Wisniewski H.M. (1982).
   Cytochemical localization of ouabain sensitive K+-dependant p-nitro-phenylphosphatase (transport ATPase) in the mouse central and peripheral nervous systems. Brain Res. 243, 225-234.
- Voyta J.C., Via D.P., Butterfield C.E. and Zetter B.R. (1984).
   Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylatedlow density lipoprotein. J. Cell. Biol. 99, 2034-2040.

- Wade L.A. and Brady H.M. (1981). Cysteine and cystine transport at the blood-brain barrier. J. Neurochem; 37, 730-734.
- Walter F.K. (1933).

Die allgemeinen grundlagen des stoffaus tauscher zwischen dem zentralnervensystem und dem übrigen körper. Arch. Psychiat. Nervenkr. 101, 195-230.

- Warden C.H., Langner C.A., Gordon J.I., Taylor B.A., McLean J.W. and LusisA.J. (1989).

Tissue-specific expression, developmental regulation, and chromosomal mapping of the lecithin : cholesterol acyltransferase gene. J. Biol. Chem. 264, 21573-21581.

 Weisgraber K.H., Mahley R.W., Kowal R.C., Herz J., Goldstein J.L. and Brown M.S. (1990).
 Apolipoprotein C-I modulates interaction of apolipoprotein E with β-migrating VLDL and

inhibits binding of  $\beta$ -VLDL to LRP. J. Biol. Chem.265, 22453.

- Werther G.A., Abate M., Hogg A., Chessman H., Oldfield B., Hards D., Hudson P., Power B., Freed K. and Herington A.C. (1990).
   Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridizationrelationship to IGF-I receptors. Molec. Endocrinol. 4, 773-778.
- Westergaard E. (1977).

The blood-brain barrier of horseradish peroxidase under normal and experimental conditions. Acta Neuropath. (Berl) 39, 181-187.

- Wiklund O., Carew T.E. and Steinberg D. (1985).
   Role of the low density lipoprotein receptor in penetration of low density lipoprotein into rabbit aortic wall. Arteriosclerosis 5, 135.
- Wilkin G.P., Marriott D.R. and Cholewinski A.J. (1990). Astrocyte heterogeneity. TINS. 13, 43-46.
- Wolburg H. and Berg K. (1988).
   Distribution of orthogonal arrays of particles in the Müller cell membrane of the mouse retina. Glia 1, 246-252.
- Wolburg H., Neuhaus J., Kniesel U., Krauß B., Schmid E.M., Öcalan M., Farrell C. and Risau W. (1994).

Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells : effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. J. Cell Sci. 107, 1347-1357.

- Wolf B.B., Beatriz m., Lopes S., Vanden Berg S.R. and Gonias S.L. (1992). Characterization and immunohistochemical localization of α<sub>2</sub>-macroglobulin receptor (lowdensity lipoprotein receptor-related protein) in human brain. American Journal of Pathology 141, 37-42
- Wolff J.R. and Bär T. (1972).
  'Seamless' endothelia in brain capillaries during development of the rat's cerebral cortex. Brain Res. 41, 17-24.
- Yamashima T., Ohnishi T., Nakajima Y., Tanaka M., Yamashita J., Sasaki T. and Tsuji A. (1993).

Uptake of drugs and expression of p-glycoprotein in the rat 9L glioma. Exp. Brain Res. 95, 41-50.

- Yang C.Y., Kim T.W., Weng S.A., Lee B., Yang M. and Gotto Jr A.M. (1990).
   Isolation and characterization of sulfhydryl and disulfide peptides of human apolipoprotein B100. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 5523-5527.
- Zhong Y., Saitoh T., Minase T., Sawada N., Enomoto K. and Mori M. (1993).
   Monoclonal antibody 7H6 reacts with junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. J. Cell Biol. 120, 477-483.

