

50376.
1999-
151

**UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
DE LILLE I**

**THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

présentée par

Laurence FENART



**MISE EN EVIDENCE D'UNE VOIE ORIGINALE DE TRANSCYTOSE
A TRAVERS LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE *IN VITRO*.
APPLICATION A LA VECTORISATION DE MEDICAMENTS
VERS LE CERVEAU.**

Soutenue et présentée le 10 juin 1999
devant le jury composé de :

Président	Verbert A.	Université de Lille I
Rapporteurs	Lasbennes F. Lemaire M.	Université Louis Pasteur, Strasbourg Laboratoires Novartis, Bâle, Suisse
Examineurs	Betbeder D. Cecchelli R. Pierce A. Torpier G.	Laboratoires Biovector TM therapeutics, Labège Université d'Artois, Lens Université de Lille I INSERM U325, Institut Pasteur de Lille

***Je dédie ce travail à ma famille et plus particulièrement à mes parents
qui ont supporté au quotidien la genèse de cette thèse !***

*Vous, qui tout au long de ma vie, m'avaient enseigné ce que travail,
courage, rigueur et persévérance veulent dire.
Vous serez à jamais mes guides...*

*Ne trouvant pas de mots assez forts, j'ajouterai seulement que
« là où il y aura du blanc, lisez que je vous remercie et vous aime »*

Je remercie vivement les membres de ce jury,

Roméo,

Tu as guidé mes premiers pas dans le domaine de la recherche. Même s'ils furent au début un peu hésitants, la confiance que tu m'as toujours témoignée m'a beaucoup aidé dans la réalisation de ce travail. J'ai toujours pu compter sur tes compétences scientifiques qui m'ont permis de mener à bien ce projet. J'ai appris énormément à tes côtés. Je tiens également à te remercier pour m'avoir permise de me forger une expérience dans l'enseignement. Enfin, je tiens à t'exprimer mes très sincères remerciements pour ta grande patience et ton exceptionnelle disponibilité. Que cette thèse soit l'expression de mon plus profond respect, de mon admiration et de ma très grande reconnaissance.

Monsieur le Professeur André Verbert,

Je suis très honorée que vous ayez accepté de présider ce jury. Recevez ici l'expression de mes plus vifs remerciements et de mon plus profond respect.

Monsieur le Professeur François Lasbennes,

Je suis particulièrement honorée que vous ayez accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je vous suis également reconnaissante de la disponibilité et de la gentillesse que vous m'avez témoignées. Recevez ici l'expression de mes plus sincères remerciements et de mon plus profond respect.

Monsieur le Docteur Michel Lemaire,

Vos compétences scientifiques et votre notoriété dans le domaine de la barrière hémato-encéphalique font de votre avis et de vos conseils, un apport inestimable dans ce travail. Votre venue en tant que rapporteur m'honore particulièrement. Trouvez dans ce mémoire le témoignage de mon admiration et de mon plus profond respect.

Madame le Docteur Annick Pierce,

Je trouve ici l'occasion de vous remercier pour m'avoir si chaleureusement accueillie dans votre laboratoire pour une petite escapade dans le «monde de la biologie moléculaire». Vous me faites l'honneur et le plaisir de siéger dans ce jury, soyez assuré de ma respectueuse et très sincère gratitude.

Monsieur le Docteur Didier Betbeder,

Je suis particulièrement honorée de vous compter parmi les membres de ce jury. Notre collaboration aura contribué à l'élaboration d'une partie de nos résultats. Sensible à l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail, à votre disponibilité, à vos conseils, et à votre rigueur scientifique, je vous prie de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Gérard Torpier,

Je vous suis très reconnaissante de la confiance et de la bienveillance que vous m'avez témoignées au cours des quelques mois de travail en commun. Très touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant de siéger dans ce jury, trouvez dans ce travail tous mes remerciements et l'expression de mon plus profond respect.

Je tiens également à remercier tout particulièrement,

Marie-Pierre, pour tout ce que tu m'as appris mais également pour ta gentillesse et ton exceptionnelle disponibilité. Pour avoir su me faire profiter de tes compétences scientifiques et pour tes précieux conseils, je te remercie très sincèrement.

Bénédicte, pour ta disponibilité et tes conseils avisés quant à la rédaction de ce mémoire, je te remercie très sincèrement.

Tous les membres de l'équipe BHE,

Joëlle, Christian, pour votre soutien moral, votre bonne humeur, je tiens à vous témoigner ma très sincère amitié. Travailler à vos côtés a été un réel plaisir. Merci à vous pour ces si réconfortantes parties de fou-rires....

Stéphanie S, Stéphanie D, Julien. Vous nous avez rejoints depuis peu, trouvez ici l'expression de toute ma sympathie.

Mais également tous les ex-membres de l'équipe BHE,

Laurence, Monique, Céline. Ces quelques années à travailler à vos côtés furent un réel plaisir. Trouvez ici l'expression de ma très sincère amitié.

Merci à tous les membres du SERLIA,

Je remercie en bloc et dans le désordre : *Muriel, Christophe, Olivier, Antoine, Corinne, Sophie, Philippe P, Philippe H, Pascal, Sylvia, Marie Hélène, Caroline, François et al...* Soyez remerciés pour vos précieux conseils, votre gentillesse, votre disponibilité, votre soutien et/ou votre amitié.

Enfin, mes derniers remerciements seront destinés à mes amies de toujours *Charlotte, Chrystelle, Dorothée, Estelle ...* Je trouve ici l'occasion de vous remercier sincèrement pour tous ces merveilleux souvenirs de franche rigolade lors de vacances passées ensemble ou sur les bancs du collège, du lycée ou de la Fac... Merci à toutes pour votre fidèle amitié et votre soutien tout au long de mes «quelques années » d'étude !!!

Je remercierai également *vos maris* pour leur amitié mais surtout pour nous laisser sans problèmes évoquer nos vieux souvenirs de jeunesse !!!

Trouvez dans ces quelques lignes, l'expression de ma plus sincère amitié.

Vous qui avez croisé ma route un peu plus tard, *Fanny, Etienne, Fanny, Sophie, Greg, Guéna, Cédric, Amélie, Isabelle, et les autres...* Trouvez ici l'expression de mes plus sincères remerciements pour votre présence et votre amitié...

SOMMAIRE

	PAGES
RESUME	1
ABSTRACT	2
ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION	4
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	12
I. LES CAPILLAIRES CEREBRAUX : SUPPORT ANATOMIQUE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	14
II. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UNE BARRIERE PHYSIQUE ET METABOLIQUE	16
<u>II.1. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UNE BARRIERE PHYSIQUE</u>	16
II.1.1. Les jonctions serrées	16
II.1.1.a. Localisation.....	16
II.1.1.b. Structure et fonction	17
II.1.1.c. Les mécanismes de régulation.....	24
II.1.2. Les vésicules et canaux transendothéliaux	28
II.1.2.a. Les vésicules.....	28
II.1.2.b. Les canaux transendothéliaux.....	28
II.1.3. Conclusion	29
<u>II.2. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UNE BARRIERE METABOLIQUE</u>	30
II.2.1. La monoamine oxydase	30
II.2.2. La P-glycoprotéine	32
II.2.2.a. Structure.....	32
II.2.2.b. Fonction.....	33
II.2.2.c. Mode d'action et modulation.....	36

<u>II.3. INDUCTION DES PROPRIETES PHYSIQUES ET METABOLIQUES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE.</u>	41
II.3.1. Influence de l'environnement cérébral.....	41
II.3.2. Influence des astrocytes.....	42
II.3.2.a. Situation stratégique des astrocytes.....	42
II.3.2.b. Influence des astrocytes sur les cellules endothéliales.....	44
II.3.2.c. Influence des cellules endothéliales sur les astrocytes.....	46
II.3.3. Conclusion.....	47
<u>II.4. CONCLUSION</u>	47
III. PERMEABILITE SELECTIVE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE	48
<u>III.1. LE TRANSPORT DES IONS, DU GLUCOSE ET DES ACIDES AMINES</u>	48
III.1.1. Le transport des ions.....	48
III.1.2. Le transport du glucose.....	51
III.1.3. Le transport des acides aminés neutres.....	53
III.1.3.a. Un système de transport sodium indépendant :	
Le système L.....	53
III.1.3.b. Des systèmes de transport sodium-dépendants :	
Les systèmes A, ASC et N.....	54
<u>III.2. LE TRANSPORT DES PEPTIDES ET PROTEINES</u>	56
III.2.1. Le transport de l'insuline.....	56
III.2.2. Le transport des facteurs de croissance	
« insulin-like » (IGF-I et II).....	56
III.2.3. Le transport de la transferrine.....	57
<u>III.3. LE TRANSPORT DES LIPIDES</u>	60
III.3.1. Le transport des acides gras polyinsaturés.....	60
III.3.1.a. Le transport des acides gras polyinsaturés non estérifiés.....	61
III.3.1.b. Le transport des acides gras polyinsaturés estérifiés :	
Les lysophosphatidylcholines.....	63
III.3.2. Le transport des lipoprotéines de basse densité (LDL).....	64
<u>III.4. CONCLUSION</u>	66

IV. STRUCTURES CELLULAIRES IMPLIQUEES DANS LES TRANSPORTS SPECIFIQUES	67
<u>IV.1. LES VESICULES RECOUVERTES DE CLATHRINE</u>	68
<u>IV.2. LES CAVEOLES</u>	70
IV.2.1. Structure des cavéoles.....	70
IV.2.1.a. Le rôle de la cavéoline-1.....	70
IV.2.1.b. Les techniques de purification des cavéoles.....	71
IV.2.1.c. Assemblage des cavéoles.....	75
IV.2.2. Les fonctions des cavéoles.....	76
IV.2.2.a. Cavéoles et signalisation.....	77
IV.2.2.b. Cavéoles et internalisation.....	79
IV.2.2.c. Cavéoles et pathologies.....	82
<u>IV.3. CONCLUSION</u>	83
V. CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	84
TRAVAUX PERSONNELS	86
I. CARACTERISATION DU MODELE <i>IN VITRO</i> DE BHE : mise en évidence de la P-glycoprotéine (P-gp).	86
<u>Article1</u> : Inhibition de la P-glycoprotéine : Evaluation rapide de son implication sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et sur le transport des médicaments vers le cerveau grâce à un modèle de barrière hémato-encéphalique <i>in vitro</i>	88
Conclusions de l'article 1.....	99
II. ETUDE DES MECANISMES DE TRANSPORT TRANSCELLULAIRE AU NIVEAU DE LA BHE.	102
<u>Article2</u> : Une nouvelle fonction du récepteur aux LDL : la transcytose des LDL à travers la barrière hémato-encéphalique.	103
Conclusions de l'article 2.....	119

Article3 : Transcytose dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux : Mise en évidence d'un compartiment Lamp1 positif, légèrement acide impliqué dans l'endocytose dépendante de récepteurs, via la voie des cavéoles.	121
Conclusions de l'article 3	169
Article4 : Evaluation de l'effet de la présence d'une charge ou d'une bicouche lipidique sur la capacité de nanoparticules à traverser un modèle de barrière hémato-encéphalique <i>in vitro</i> .	171
Conclusion de l'article 4	200

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE	201
--	-----

I. MISE EN EVIDENCE D'UNE VOIE ORIGINALE DE TRANSCYTOSE DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES DE CAPILLAIRES CEREBRAUX.	201
II. UTILISATION DE LA TRANSCYTOSE COMME NOUVELLE STRATEGIE DE VECTORISATION DE MEDICAMENTS VERS LE CERVEAU.	206
III. PERSPECTIVES	213

BIBLIOGRAPHIE	215
----------------------	-----

DOCUMENTS

	PAGES
<u>ARTICLE 1</u> : Inhibition of P-glycoprotein : Rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain by an in vitro model of the blood-brain barrier.	91
<u>ARTICLE 2</u> : A new function for the LDL receptor : transcytosis of LDL through the blood-brain barrier.	106
<u>ARTICLE 3</u> : Transcytosis in blood-brain capillary endothelial cells : Occurrence of a Lamp1 positive, mildly acidic compartment involved in caveola receptor-mediated endocytosis.	124
<u>ARTICLE 4</u> : Evaluation of the effect of charge and lipid coating on the ability of 60 nm nanoparticles to cross an in vitro model of blood-brain barrier.	173

ILLUSTRATIONS

	PAGES
FIGURE 1 : Echanges entre les différents compartiments cérébraux (d'après Smith, 1989).	13
FIGURE 2 : Structure des capillaires cérébraux (d'après Lentz pour la paroi vasculaire et Delorme pour les structures sous-endothéliales).	14
FIGURE 3 : Complexe jonctionnel des cellules épithéliales et endothéliales (d'après Denker et Nigam, 1998).	16
FIGURE 4 : Représentation schématique de l'organisation des jonctions serrées (d'après Denker et Nigam, 1998).	21
FIGURE 5 : Schéma hypothétique de l'organisation protéique au sein des jonctions serrées (d'après Tsukita <i>et al.</i> , 1997).	21
FIGURE 6 : Cascade hypothétique d'événements déclenchés par le contact cellulaire et provoquant la formation des jonctions serrées (d'après Anderson <i>et al.</i> , 1993).	24
FIGURE 7 : Comparaison des capillaires cérébraux et non cérébraux (d'après Cornford, 1988).	29
FIGURE 8 : Synthèse et dégradation des neurotransmetteurs monoaminergiques (d'après Hardebo et Owman 1980).	31
FIGURE 9 : Structure de la P-glycoprotéine humaine : insertion dans la membrane plasmique (d'après Gottesman et Pastan, 1993).	32
FIGURE 10 : Corrélation entre fixation/transport du substrat et fixation/hydrolyse de l'ATP (d'après Wang <i>et al.</i> 1998).	37
FIGURE 11 : Représentation fonctionnelle de la P-glycoprotéine (d'après Ford, 1996).	38
FIGURE 12 : Prolongements pédiculés des astrocytes (1) formant un manchon continu autour des capillaires cérébraux (d'après Ganong, 1989).	42
FIGURE 13 : Situation stratégique et rôle des astrocytes : maintien de l'environnement neuronal (d'après Kimelberg, 1983).	43
FIGURE 14 : Modèle de sécrétion des ions K ⁺ au niveau de la BHE. (d'après Vigne <i>et al.</i> , 1994)	49
FIGURE 15 : Transport et métabolisme du glucose au niveau de la BHE (d'après Pardridge, 1993).	52

FIGURE 16 : Transport des acides aminés neutres (système A et L, d'après Goldstein et Betz, 1986).	54
FIGURE 17 : Transport de glutamine (d'après Lee <i>et al.</i> , 1998).	55
FIGURE 18 : Endocytose de la serotransferrine et recyclage de son récepteur (d'après Dautry-Varsat <i>et al.</i> , 1983).	57
FIGURE 19 : Hypothèses de transport du fer au niveau de la BHE.	58
FIGURE 20 : Schéma représentant les différents processus de transports intervenant dans la perméabilité d'un capillaire continu. (d'après Schnitzer, 1993).	67
FIGURE 21 : Schéma représentant les différents processus intervenant dans la perméabilité d'un capillaire cérébral.	67
FIGURE 22 : Assemblage et dissociation de vésicules recouvertes de clathrine au niveau de la membrane cellulaire lors d'une endocytose dépendante d'un récepteur (d'après Brodsky, 1997).	68
FIGURE 23 : Mécanisme d'assemblage des cavéoles (d'après Anderson, 1998).	75
FIGURE 24 : Modèle de potocytose dépendante du récepteur au folate (d'après Anderson <i>et al.</i> , 1992).	79
FIGURE 25 : Les voies de la potocytose (d'après Anderson, 1998).	81
FIGURE 26 : Voies d'endocytose rencontrées chez les cellules de mammifères (d'après Lamaze et Schmid, 1995).	83
FIGURE 27 : Schéma du modèle <i>in vitro</i> de BHE	87
FIGURE 28 : Conséquences de l'inhibition de la P-glycoprotéine.	99
FIGURE 29 : Rôle du récepteur apo(B, E) dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux en croissance et différenciées.	119
TABLEAU 1 : Les protéines des jonctions serrées (d'après Denker et Nigam, 1998).	18
TABLEAU 2 : Agents anticancéreux intervenant dans le phénotype de résistance (d'après Oudard <i>et al.</i> , 1996).	34
TABLEAU 3 : Sélection d'agents pharmacologiques ayant la capacité de lever la MDR (d'après Oudard <i>et al.</i> , 1996).	39
TABLEAU 4 : Liste non exhaustive des molécules enrichies dans les cavéoles (d'après Anderson, 1998).	74

RESUME

Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux, support anatomique de la **barrière hémato-encéphalique (BHE)**, présentent des caractéristiques structurales et métaboliques qui restreignent considérablement les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral et assurent ainsi le maintien de l'homéostasie du système nerveux central. L'expression de ces propriétés est induite par l'environnement cérébral et notamment par la population astrocytaire.

Afin de recréer les interactions qui existent *in vivo*, **un modèle de BHE *in vitro*** qui consiste en une coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes a été mis au point. Utilisant ce modèle, nous avons démontré que, comme *in vivo*, les cellules endothéliales, en culture, expriment la **P-glycoprotéine**. Cette protéine joue le rôle de pompe d'efflux actif limitant l'entrée de médicaments vers le cerveau. Ainsi, l'utilisation de ce modèle nous a permis d'évaluer les effets d'une inhibition spécifique de cette protéine sur le transport de différents médicaments à travers la BHE.

En dépit de toutes ces caractéristiques qui restreignent les échanges entre le sang et le cerveau, la BHE ne peut être absolue. Le transport des nutriments essentiels au bon fonctionnement du système nerveux central fait appel à des transports spécifiques. A l'inverse de l'endothélium des autres organes, l'endothélium des capillaires cérébraux exprime un **récepteur aux lipoprotéines de basse densité (LDL)**. Nos résultats établissent un rôle nouveau de ce récepteur; le transport des lipoprotéines à travers la BHE. Ce transport spécifique est régulé par le statut lipidique des astrocytes. Les premières étapes de ce transport ont été caractérisées et démontrent l'implication **des cavéoles** dans la transcytose des LDL. La mise en évidence de cette voie originale de transcytose, court-circuitant le compartiment lysosomal, nous a permis d'envisager l'utilisation de cette voie pour **vectoriser des protéines** incorporées dans des vecteurs synthétiques, vers le cerveau.

ABSTRACT

The maintenance of the homeostasis of brain interstitial fluid, which constitutes the special microenvironment for neurons, is established by the presence of the **blood-brain barrier (BBB)** at the transition area from endothelial cells (ECs) to brain tissue. 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 demonstrated. Astrocytes, the nearest neighbour of brain capillaries, have been shown to induce some of the specialised properties of the ECs.

In attempts to investigate such interactions, an *in vitro* model of the BBB has been developed by culturing brain capillary ECs and astrocytes on opposite sides of a filter. Using this model, we have demonstrated that the **P-glycoprotein (P-gp)** is expressed, like *in vivo*, at the EC luminal side. This protein acts as an active efflux pump limiting drug delivery to the brain. Furthermore, the use of this model permit us to predict the becoming of a P-gp dependent drug when this drug is associated with a specific P-gp inhibitor.

In spite of all these characteristics which highly restrict the passage of substances from the blood to the brain, the BBB cannot be absolute. Nutrients needed for brain cells are delivered to the brain by means of specific transports. The occurrence of a **low density lipoprotein (LDL) receptor** on the BBB has recently been demonstrated. Our results established a new function for the LDL receptor; the transport of lipids to the brain. This receptor-mediated LDL transport is regulated by the lipid state of astrocytes. The first steps of this transport have been characterised and demonstrated that uncoated plasmalemmal vesicles, **caveolae**, are involved LDL transcytosis. The existence of this original transcytotic pathway, bypassing the lysosomal compartment allowed us to investigate the use of this pathway to deliver proteins inserted in synthetic vectors to the brain.

ABBREVIATIONS

A	adrénaline
AAD	aromatic L-amino acid decarboxylase
AG	acide gras
AGPI	acide gras polyinsaturé
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
Apo	apolipoprotéine
ATP	adénosine triphosphate
BHE	barrière hémato-encéphalique
DA	dopamine
DOPA	3,4-dihydroxyphénylalanine
γ -GT	gamma-glutamyl transpeptidase
GPI	glycosylphosphatidylinositol
GTP	guanosine triphosphate
5-HT	5-hydroxytryptamine
5-HTP	5-hydroxytryptophane
IGF	insulin like growth factor
IP3	inositol triphosphates
IPG	inositolphosphoglycane
LCR	liquide céphalo-rachidien
LDL	low density lipoprotein
LysoPC	lysophosphatidylcholine
MAO	monoamine oxydase
MDCK	Mardine Darby canine kidney
MDR	multidrug resistance
NA	noradrénaline
NGF	nerve growth factor
OAP	orthogonal arrays of particles
P-gp	P-glycoprotéine
PKC	protéine kinase C
PTK	protéine tyrosine kinase
SNC	système nerveux central
ZO	zonula occludentes

INTRODUCTION

L'homéostasie du liquide interstitiel qui baigne les neurones est un élément essentiel au bon fonctionnement du système nerveux central. Pour éviter que des modifications brutales de sa composition ne viennent perturber l'activité nerveuse, l'évolution a doté les organismes complexes d'une barrière entre le sang et le cerveau : **la barrière hémato-encéphalique (BHE)**.

Le support anatomique de la BHE est l'endothélium des capillaires cérébraux. Celui-ci présente des caractéristiques structurales différentes de l'endothélium des autres organes. Il se différencie par la présence de jonctions serrées, la rareté des vésicules de pinocytose et l'absence de fenestrations. A ces propriétés physiques s'ajoutent des caractéristiques métaboliques dues à l'expression de protéines enzymatiques telle que la monoamine oxydase. L'ensemble de ces caractéristiques, physiques et métaboliques, va restreindre considérablement les échanges non spécifiques entre le sang et le parenchyme cérébral.

L'expression et le maintien de ces propriétés sont induits par l'environnement cérébral et notamment par la population astrocytaire avoisinant l'endothélium. En effet, la présence des astrocytes est essentielle à l'expression de protéines impliquées notamment dans le métabolisme des cellules endothéliales ou dans l'établissement des jonctions serrées.

La mise au point au laboratoire **d'un modèle *in vitro* de BHE** consistant en une coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes a permis de recréer les interactions cellulaires qui existent *in vivo*. Dans ces conditions de culture, les cellules endothéliales présentent de nombreuses caractéristiques de l'endothélium de la BHE *in vivo*. Bon nombre d'entre elles, tant physiques que métaboliques, ont déjà pu être mises en évidence sur ce modèle (Dehouck *et al.*, 1992 ; 1995). Cependant, la présence de la P-glycoprotéine, mise en évidence *in vivo* par Cordon-Cardo *et al.* en 1989, n'avait pas été testée. L'expression de cette protéine par les cellules endothéliales permet d'expliquer les faibles perméabilités de certaines molécules lipophiles à travers la BHE.

C'est pourquoi, le premier objectif de notre travail a été de vérifier que, comme *in vivo*, **la P-glycoprotéine** était non seulement exprimée par les cellules endothéliales

de capillaires cérébraux de notre modèle *in vitro* de BHE, mais qu'elle y était fonctionnelle pouvant alors être responsable de la faible perméabilité de molécules lipophiles. Nous avons ensuite étudié les effets d'un agent pharmacologique, inhibiteur de la P-glycoprotéine *in vivo*, sur le transport de trois de ces molécules à travers la monocouche de cellules endothéliales.

Ces études, réalisées lors du DEA, ont contribué à la caractérisation du modèle faisant de celui-ci un modèle de BHE aux propriétés très proches de celles décrites *in vivo*.

Ainsi l'activité de P-glycoprotéine exprimée par les cellules endothéliales va contribuer à restreindre les échanges entre le sang et le cerveau. Elle appartient à ce titre à ce que Betz a appelé la barrière métabolique.

Pourtant, malgré ses importantes capacités de synthèse, le cerveau ne peut être autonome; des échanges entre les compartiments sanguin et cérébral sont indispensables au bon fonctionnement du système nerveux central. En conséquence, le passage des nutriments constitutifs et énergétiques à travers la BHE fait appel à des transports spécifiques. Si les transports du glucose, des acides aminés, de l'insuline sont aujourd'hui clairement définis, les modalités de transfert des lipides, et notamment des lipoprotéines, du sang vers le cerveau sont peu connues.

La seconde partie de nos travaux s'inscrit dans l'un des thèmes développés par le SERLIA : **lipoprotéines et BHE**. Il fait suite aux travaux de Stéphane Méresse qui a mis en évidence un récepteur aux lipoprotéines de basse densité (LDL) *in vivo* sur des capillaires cérébraux de bœuf. Afin d'étudier le rôle de ce récepteur, il a mis au point une culture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et a montré que ces cellules fixent, internalisent les LDL mais ne les dégradent pas. Les études ont ensuite été poursuivies par Bénédicte Dehouck qui, sur le modèle *in vitro* de BHE montre que, comme *in vivo*, les cellules endothéliales de capillaires cérébraux expriment un récepteur aux LDL. Son expression est augmentée lorsque les cellules sont cocultivées en présence d'astrocytes. De plus, elle est modulée par le statut lipidique des astrocytes.

Ainsi, contrairement à l'endothélium des autres organes, le récepteur aux LDL est exprimé au niveau de l'endothélium cérébral. De plus, son expression est hautement régulée. L'ensemble de ces résultats a permis d'envisager son intervention dans le transport des lipides à travers la BHE.

Nous nous sommes donc intéressés **au rôle de ce récepteur au niveau de la BHE** et nos résultats ont confirmé cette hypothèse, établissant un rôle nouveau du récepteur aux LDL : **le transport des lipides à travers la BHE**. Nous avons tout d'abord caractérisé les modalités de transport des LDL. Ce transport est spécifique et régulé par le statut lipidique des astrocytes. Puis, les premières étapes de ce transport ont été caractérisées et démontrent **l'implication des cavéoles dans la transcytose des LDL**.

Enfin, la mise en évidence de cette voie endogène spécifique du trafic intracellulaire, court-circuitant la voie de dégradation par les lysosomes, nous a permis d'envisager **l'utilisation de cette voie pour vectoriser des médicaments vers le cerveau**.

Nos recherches ont fait l'objet des PUBLICATIONS suivantes :

Publications dans des revues à comité de lecture :

1. Dehouck B., **Fenart L.**, Dehouck M.P., Cecchelli R. and Fruchart J.C.
Cross-talk between brain capillary endothelial cells and astrocytes : upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier.
1997. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 7 : 225-230.
2. Dehouck B., **Fenart L.**, Dehouck M.P., Pierce A., Torpier G and Cecchelli R.
A new function for the LDL receptor : transcytosis of LDL across the blood brain barrier.
1997. *J. Cell. Biol.* 138(4).877-889.
3. **Fenart L.**, Buée- Scherrer V., Descamps L., Duhem C., Poullain M.G., Cecchelli R. and Dehouck M.P.
Inhibition of P-glycoprotein : Rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain by an in vitro model of the blood-brain barrier.
1998. *Pharm.Res.* 15 (7) : 993-1000.

4. **Fenart L.**, Cecchelli R. and Torpier G .
Transcytosis in blood-brain capillary endothelial cells : Occurrence of a Lamp1 positive, mildly acidic compartment involved caveola receptor-mediated endocytosis
J. Cell. Biol. Soumis.
5. **Fenart L.**, Casanova A., Dehouck B., Duhem C., Slupek S., Cecchelli R. and Betbeder D.
Evaluation of the effect of charge and lipid coating on the ability of 60nm nanoparticles to cross an in vitro model of blood-brain barrier.
J. Pharm. Exp . Ther. Soumis.

Revue générale :

Cecchelli R., Dehouck B., Descamps L., **Fenart L .**, Buée- Scherrer V., Lundquist S., Rentfel M., Torpier G. and Dehouck M.P.
In vitro model for evaluating drug transport across the Blood-brain barrier.
1999. *Advanced drug delivery reviews* .36 : 165-178.

Chapitre d'ouvrage :

- 1 **Fenart L.**, Dehouck B., Dehouck M.P., Torpier G. and Cecchelli R.
Interactions of lipoproteins with the blood brain barrier.
1997. In *Pardridge : An introduction to the blood brain barrier*. Cambridge University Press.221-226.
2. Cecchelli R, Dehouck B., Descamps L., **Fenart L.**, Buée-Scherrer V., Duhem C., Torpier G., and Dehouck M.P.
In vitro models of the blood-brain barrier ant their use in drug transport.
1999. In *Blood brain barrier and drug delivery to the CNS*. Edts Begley J., Bradbury M.N. and KreuterJ.

Des recherches réalisées en collaboration ont fait l'objet des PUBLICATIONS suivantes :

1. Chopineau J., Robert S., **Fenart L.**, Cecchelli R., Lagoutte B., Paitier S., Dehouck M.P. and Domurado D.
Physicochemical characterization and in vitro interaction with brain capillary endothelial cells of artificially monoacylated ribonucleases A.
1997. *Letters in Peptide Science* 4 : 1-9
2. Leveugle B., Wanhong D., **Fenart L.**, Dehouck M.P., Scanameo A., Cecchelli R. and Fillit H.
Heparin oligosaccharides that pass the blood-brain barrier inhibit β -amyloid precursor protein secretion and heparin binding to β -amyloid peptide.
1998. *J. Neurochem.* 70 : 736-744.
3. Chopineau J., Robert S., **Fenart L.**, Cecchelli R., Lagoutte B., Paitier S., Dehouck M.P. and Domurado D.
Monoacylation of ribonuclease A enables its transport across an in vitro model of the blood-brain barrier.
1998. *J. Control. Release.* 56 : 231-237.
4. Bernoud N., **Fenart L.**, Bénistant C., Pageaux J.F., Dehouck M.P., Molière P., Lagarde M., Cecchelli R. and Lecerf J.
Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells « in vitro ».
1998. *J. Lipid Res.* 39 : 1816-1824.
5. Bernoud N., **Fenart L.**, Molière P., Dehouck M.P., Lagarde M., Cecchelli R., and Lecerf J.
Facilitated transfer of 2-docosahexaenoyl-1-lysophosphatidylcholine through an « in vitro » blood-brain barrier over that of unesterified docosahexaenoic acid .
1999. *J. Neurochem* 72 : 338-345.
6. Fillebeen C., Descamps L., Dehouck M.P., **Fenart L.**, Benaïssa M., Spick G., Cecchelli R. and Pierce A.
Receptor mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier.
1999. *J. Biol. Chem.* 274 : 7011-7017.
7. Girod J., **Fenart L.**, Regina A., Dehouck M.P., Hong G., Scherrmann J.M., Cecchelli R. and Roux F.
Transport of cationized antitetanus Fab'2 fragments across an in vitro blood-brain barrier model : involvement of the transcytosis pathway.
1999. *J. Neurochem.* Soumis.
8. Olivier J.C., **Fenart L.**, Chauvet R., Pariat C., Cecchelli R. and Couet W.
Indirect evidence that drug brain targeting using tween 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity
1999. *Pharm. Res.* Soumis.

Les COMMUNICATIONS ORALES suivantes ont été présentées :

1. **Fenart L.***, Dehouck B., Torpier G., Dehouck M.P. et Cecchelli R. (* présentateur)
Une nouvelle fonction du LDL récepteur : transcytose des LDL au travers de la barrière hémato-encéphalique.
Journée des jeunes chercheurs. Institut Pasteur, 18 Novembre 1996, Lille.
2. **Fenart L.***, Cecchelli R et Dehouck M.P.
P-glycoprotéine et barrière hémato-encéphalique in vitro : conséquences de son inhibition sur la pénétration cérébrale de médicaments.
Colloque ULB-Lille, 9 Janvier 1997, Bruxelles.
3. **Fenart L.***, Cecchelli R et Dehouck M.P.
P-glycoprotéine et barrière hémato-encéphalique in vitro : conséquences de son inhibition sur la pénétration cérébrale de médicaments.
Club BHE., 7 Février 1997, Paris.
4. Dehouck M.P.*, **Fenart L.** and Cecchelli R.
Transport of P-glycoprotein dependent drugs across an in vitro blood-brain barrier model. Effect of reversing agents.
Astra, 16 Juin 1997, Stockholm.
- 5 Bernoud N*, **Fenart L.**, Dehouck M.P., Lagarde M., Lecerf J. and Cecchelli R.
Astrocytes facilitates the transfer of lysophosphatidylcholine DHA through the blood-brain barrier over that unesterified DHA.
4th International Congress on essential fatty acids and eicosanoids, 20-24 juillet 1997, Edinburg.
6. **Fenart L.***, Dehouck B., Torpier G., Dehouck M.P. et Cecchelli R.
Une nouvelle stratégie de vectorisation de protéines vers le cerveau : transcytose à travers la barrière hémato-encéphalique.
Gésa 27, 12-15 Octobre 1997, Biarritz.
- 7 **Fenart L.***, Dehouck B., Dehouck M.P, Torpier G and Cecchelli R.
A new function for the LDL-receptor : transcytosis of LDL across the blood-brain barrier.
Présentation sur invitation au *Satellite symposium « signal transduction pathways in the blood-brain barrier »*. *Forum of european Neuroscience 1 juillet 1998, Berlin.*
8. Fillebeen C.*, Descamps L., **Fenart L.**, Dehouck et al., M.P., Benaissa M., Spik G., Cecchelli R. and Pierce A.
Receptor mediated-transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier.
European Iron club Meeting. 9-12 Juillet 1998 Utrecht.
9. **Fenart L.***, Dehouck M.P. and Cecchelli R.
P-glycoprotéine et barrière hémato-encéphalique in vitro : conséquences de son inhibition sur la pénétration cérébrale de médicaments.
Journée Jeunes Chercheurs, Institut Pasteur, 4 Mai 1999, Lille

Proceedings of international symposium :

1. Dehouck M.P., Dehouck B., **Fenart L.** and Cecchelli R.
Blood-brain barrier in vitro. Rapid evaluation of strategies for achieving drug targeting to the central nervous system.
Biology and Physiology of the blood-brain barrier, edited by Couraud and Scherman. Plenum Press, New York, 1996
2. Cecchelli R., **Fenart L.**, Descamps L., Torpier G and Dehouck M.P.
Receptor mediated transcytosis of blood borne molecules through blood-brain barrier endothelial cells : drug targeting by endogenous transport routes.
24th International Symposium on controlled release of bioactive materials, 12-14 juin 1997, Stockholm.
3. Dehouck M.P., **Fenart L.**, Dehouck B. and Cecchelli R.
In vitro blood-brain barrier : assessment of drug transport to the brain.
In Van Zutphen L.F.M. and Balls M (eds). Animal alternatives, welfare and ethics. Developments in animal and veterinary sciences, 27. Elsevier. 869-872
4. **Fenart L.**, Descamps L., Dehouck M.P., Torpier G. and Cecchelli R.
Receptor mediated transcytosis of blood-borne molecules through blood-brain barrier endothelial cells : drug targeting by endogenous transport routes.
Alfred Benzon Symposium 43.17-24 Aout 1997, Copenhagen.

Les COMMUNICATIONS AFFICHEES suivantes ont été présentées :

1. Dehouck M.P., Descamps L., Plateel M., **Fenart L.**, Tessier E., Torpier G. and Cecchelli R.
Un modèle de barrière hémato-encéphalique.
Colloque Lille-ULB, 30 Mai 1995, Villeneuve d'Ascq.
2. Dehouck M.P., Dehouck B., Descamps L., Plateel M., **Fenart L.**, Tessier E., Torpier G. and Cecchelli R.
Blood-brain barrier in vitro : rapid evaluation of strategies for achieving drug targeting to the central nervous system.
Conférence de biologie cérébro-vasculaire, 10-12 Juillet 1995, Paris.
3. **Fenart L.**, Poullain M.G., Giroux B., Cecchelli R. and Dehouck M.P.
In vitro studies of S9788 as a reversing agent of P-glycoprotein dependent drug transport across the blood-brain barrier.
7^{ème} congrès de la société de pharmacologie et de toxicologie cellulaire 13-15 Mars 1996, Bordeaux.
4. **Fenart L.**, Dehouck M.P., Cecchelli R. and Torpier G
Receptor mediated endocytosis of blood-borne molecules through the blood-brain barrier : implication of caveolae.
European research conferences, 13-18 Septembre 1997, San Feliu de Guixols, Espagne.

5. **Fenart L.**, Poullain M.G., Cecchelli R. and Dehouck M.P.
Inhibition of P-glycoprotein : rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain.
Keystone Symposium. Endothelium, 22-28 Mars 1998, Incline village, Nevada, USA.
6. Cecchelli R., **Fenart L.**, Dehouck B., Torpier G and Dehouck M.P.
A new function for the LDL-receptor : transcytosis of LDL across the blood-brain barrier.
Keystone Symposium. Endothelium, 22-28 Mars 1998, Incline village, Nevada, USA.
7. **Fenart L.**, Poullain M.G., Cecchelli R. and Dehouck M.P.
Inhibition of P-glycoprotein : rapid assessment of its implication in blood-brain barrier integrity and drug transport to the brain.
Smithkline Beecham Pharmaceuticals Meeting, 2 Novembre 1998, Harlow, UK.
8. Girod J., **Fenart L.**, Regina A., Dehouck M.P., Hong G., Scherrmann J.M. Cecchelli R. and Roux F.
Brain targeting of cationized Fab'2 fragments directed against tetanus toxin : involvement of the transcytosis pathway.
Smithkline Beecham Pharmaceuticals Meeting, 2 Novembre 1998, Harlow, UK.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le système nerveux central (SNC) a longtemps été considéré comme une structure «supérieure» différente et isolée du reste de l'organisme. Cette notion d'isolement, tout d'abord empirique, fut visualisée à la fin du XIXème siècle, par Ehrlich. En 1885, ce pharmacologiste allemand montre qu'après injection intraveineuse d'un colorant vital se fixant aux protéines plasmatiques, la coeruleïne S, tous les organes de la souris sont colorés excepté le cerveau. Il en conclut que ce colorant ne présente pas d'affinité pour le cerveau. En 1909, Goldmann reprend les travaux d'Ehrlich et constate que le bleu Trypan injecté par voie intraveineuse ne colore pas le cerveau.

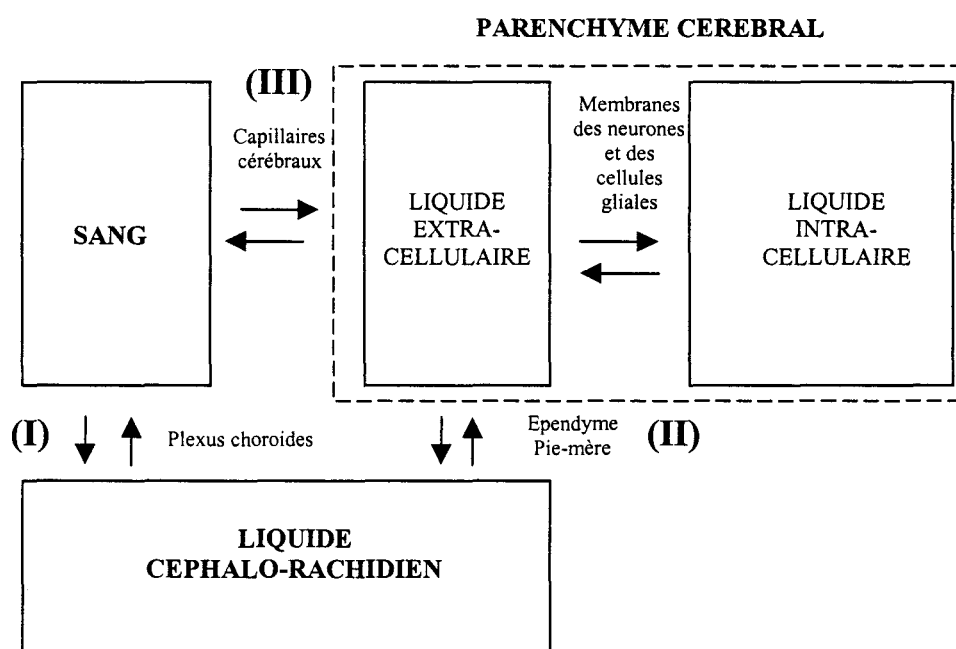
Si le développement du microscope électronique a permis de définir plus précisément l'organisation structurale cérébrale, il aura également conduit à de mauvaises interprétations des expériences précédemment décrites. En effet, les premières observations de coupes fines de cerveau ont montré que ce milieu n'était pas homogène mais constitué de structures enchevêtrées décrites comme des prolongements cellulaires. Il y avait, en réalité, très peu d'espace entre les différentes cellules. Ainsi, l'absence de passage des colorants, du sang dans le système nerveux central, a longtemps été interprétée comme l'absence d'un espace extracellulaire suffisant pour y laisser pénétrer ces colorants.

Ignorée pendant de nombreuses années, la deuxième expérience de Goldmann réfutait pourtant cet argument. En effet, dès 1913, Goldmann montre que le bleu Trypan, injecté directement dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) se fixe et colore la totalité du cerveau, démontrant non seulement que le colorant est affine pour le cerveau mais également qu'il peut y diffuser largement. Les expériences de Goldmann démontraient donc sans équivoque **l'existence d'une barrière localisée au niveau des vaisseaux cérébraux, limitant les échanges entre le sang et SNC**. L'existence d'une barrière entre le sang et le cerveau permettait alors d'interpréter de nombreuses expériences et notamment celle de Biedl et Kraus, qui en 1898, remarquaient que l'injection intraveineuse d'acides biliaires, puissants neurotoxiques, ne provoquait pas les troubles graves observés après leur injection directe dans le LCR.

Le terme de **barrière hémato-encéphalique (BHE)** est cité pour la première fois dans la littérature française en 1922, par Stern et Gautier qui la définissent comme « un mécanisme spécial réglant le passage de diverses substances du sang dans le

liquide céphalo-rachidien et dans les centres nerveux cérébraux spinaux » et la localisent au niveau des plexus choroïdes. En effet, à cette époque, l'idée prévaut que toute substance injectée dans le sang ne peut pénétrer dans le SNC que si elle atteint, par le biais des plexus choroïdes, le LCR (Lewandowsky, 1900).

Il faut attendre les années 30 pour que le LCR perde sa prédominance dans les mécanismes d'échanges entre le sang et le SNC. Walter (1933) et Spatz (1933) montrent qu'il n'existe pas un site unique d'échange entre le sang et le SNC mais que celui-ci se compose de trois entités qui peuvent se définir comme suit (Figure 1).



- (I) **La barrière hémato-liquidienne** : barrière entre le sang et le LCR, située au niveau des plexus choroïdes et plus particulièrement au niveau de leur épithélium.
- (II) **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 qualificatif de barrière.
- (III) **La barrière hémato-encéphalique** : barrière entre le sang et le parenchyme cérébral, située au niveau des capillaires cérébraux.

L'importance du rôle des capillaires cérébraux dans le transport des substances vers le cerveau fut sujet à controverses pendant plusieurs années. En 1941, Broman fit taire une partie des discussions en démontrant que quantitativement, la surface de la BHE est plus importante que celle de la barrière hémato-liquidienne. Plus tard, la

surface occupée par les capillaires cérébraux sera estimée à 5000 fois celle des plexus choroïdes (Crone, 1971). **Les capillaires cérébraux devenaient alors le site principal d'échange entre le sang et le système nerveux central.**

I. LES CAPILLAIRES CEREBRAUX : SUPPORT ANATOMIQUE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE.

Les capillaires cérébraux (Figure 2) sont constitués d'une monocouche de cellules endothéliales jointives reposant sur une lame basale continue dans laquelle se trouve enchâssé, par endroits, un deuxième type cellulaire : les péricytes. Les capillaires ainsi constitués, sont entourés d'un manchon ininterrompu de pieds astrocytaires

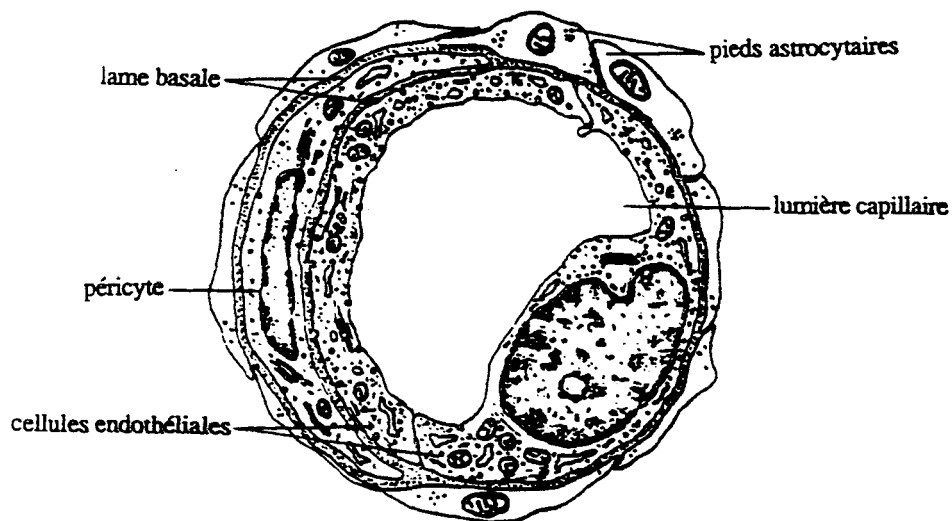


Figure 2: Structure des capillaires cérébraux (d'après Lentz pour la paroi vasculaire et Delorme pour les structures sous-endothéliales).

De la périphérie vers la lumière du capillaire, on trouve :

- **La membrane basale** servant de support aux cellules endothéliales qu'elle entoure totalement (Peters *et al.*, 1991). Elle est produite par les cellules qui y sont apposées i.e. par les cellules endothéliales mais aussi par les péricytes (Mandarino *et al.*, 1993). Elle est composée essentiellement de collagène de type IV, de laminine et de fibronectine. Elle présente également des charges anioniques portées, d'une part, par des protéoglycanes riches en héparanes sulfates et d'autre part, par des glycoprotéines riches en acides sialiques. La structure tridimensionnelle en réseau du collagène et la présence de charges anioniques font de cette membrane un filtre tout à fait sélectif. En plus de ce rôle structural, de récentes expériences réalisées *in vitro*, montrent que les

composants de la membrane basale auraient une influence sur la différenciation des cellules endothéliales en induisant notamment la formation des jonctions serrées (Tilling et al., 1998).

- **Les péricytes** entourés complètement par cette lame basale dédoublée. Leur position au sein du capillaire laisse supposer que ces cellules y jouent un rôle majeur mais celui-ci reste encore à définir. En effet, les fonctions phagocytaires et contractiles des péricytes démontrées *in vitro* (Hermann et D'Amore 1985 ; Dehouck *et al.*, 1997) ont été infirmées *in vivo* (Boado et Pardridge 1994). En produisant du TGF β , les péricytes inhiberaient la prolifération des cellules endothéliales (Antonelli-Orlidge et al, 1989). En 1992, Risau *et al.* ont montré qu'une grande partie de l'activité γ -GT (activité enzymatique caractéristique des capillaires d'origine cérébrale) était concentrée dans les péricytes, les cellules endothéliales ne présentant qu'une faible activité. Ceci démontre que toutes les caractéristiques des capillaires cérébraux ne sont pas nécessairement associées aux cellules endothéliales mais que les péricytes peuvent également prendre part à ces propriétés.

- **Les cellules endothéliales** définies comme étant le siège de la BHE. Il a fallu attendre la fin des années 60 pour que Reese et Karnovsky (1967) et Brightman et Reese (1969) reprennent les expériences de Goldmann en injectant des traceurs visualisables en microscopie électronique et montrent ainsi que **l'endothélium des capillaires cérébraux constitue l'élément anatomique de la BHE**, responsable de la restriction des échanges entre le sang et le cerveau. **L'endothélium** des capillaires cérébraux présente des caractéristiques structurales et métaboliques différentes de l'endothélium capillaire des autres organes. Toutes ces propriétés, en régulant les échanges entre le sang et le système nerveux central, vont contribuer au maintien de l'homéostasie cérébrale. L'ensemble de ces propriétés est largement détaillé dans les chapitres suivants.

II. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UNE BARRIERE PHYSIQUE ET METABOLIQUE.

I. 1. LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UNE BARRIERE PHYSIQUE

L'une des caractéristiques morphologiques qui différencie l'endothélium des capillaires cérébraux aux capillaires des autres organes est **la présence d'un réseau de «zonulae occludentes» ou jonctions serrées** qui relient de façon continue chacune des cellules endothéliales à ces voisines (Reese et Karnovsky, 1967 ; Brightman et Reese, 1969 ; Delorme *et al.*, 1970). Cette propriété va contribuer à restreindre les échanges non spécifiques entre le sang et le parenchyme cérébral.

I. 1. 1. Les jonctions serrées

II. 1. 1. a. Localisation

Les cellules d'épithélia et d'endothélia sont unies aux pôles apicaux par des complexes de jonction (Figure 3).

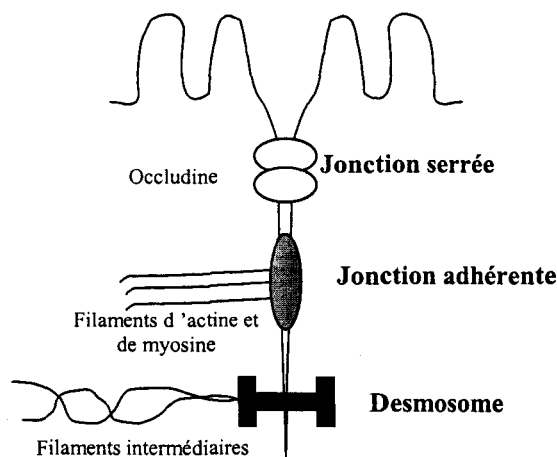


Figure 3: Complexe jonctionnel des cellules épithéliales et endothéliales.
(d'après Denker et Nigam., 1998 The American Physiology Society. F1-F9)

Ces complexes sont composés de jonctions individuelles disposées dans un ordre précis par rapport à la lumière : **la jonction serrée ou zonulae occludentes** est la plus

superficielle, puis vient la jonction intermédiaire ou zonulae adherens, et sous celle-ci, présent uniquement dans les épithélia, le desmosome ou macula adherens. Chaque jonction a un rôle spécifique dans la coordination de la fonction de l'épithélium ou de l'endothélium.

II. 1. 1. b. Structure et fonction

En microscopie électronique, les jonctions serrées apparaissent comme des zones de contact entre cellules voisines caractérisées par une fusion apparente des feuillettes externes de la membrane plasmique de cellules adjacentes (Farquhar et Palade, 1963). Ces zones de contact sont des bandes anastomosées qui forment un anneau continu autour de chaque cellule.

La technique de cryodécapage a permis de préciser l'ultrastructure de ces jonctions et a montré que l'occlusion de l'espace intercellulaire ne se produit en fait qu'au niveau de certains contacts ponctuels ; il n'y a pas à proprement parler de fusion, mais simple accollement des feuillettes externes au niveau des bandes filiformes formant un réseau à plus ou moins nombreux entrecroisements.

Ainsi l'endothélium des capillaires cérébraux peut être considéré comme un endothélium de type «continu ». L'établissement de ces jonctions va considérablement restreindre la diffusion des ions (Hansen *et al.*, 1977) et le transport de substances hydrophiles non-électrolytes (Oldendorf, 1971). Cette *imperméabilité* va conférer à l'endothélium, une résistance électrique élevée. Jusqu'à ce jour, la résistance électrique de l'endothélium cérébral *in vivo* n'a pu être mesurée que dans les vaisseaux de la pie mère et non dans ceux qui irriguent le parenchyme cérébral. Ces résistances peuvent atteindre des valeurs de $2000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ chez la grenouille (Crone et Olesen, 1982) jusqu'à $5900 \Omega \cdot \text{cm}^2$ dans les artères de la pie-mère du rat nouveau-né (Abbott et Revest, 1991).

Ces jonctions serrées participent également à l'élaboration et au maintien de la polarité cellulaire. Elles assurent en effet la distribution asymétrique des protéines au sein de la membrane plasmique (Betz *et al.*, 1980 ; Lidinski et Drewes, 1983). Lorsque

les jonctions serrées d'un tissu ou de cellules en culture sont rompues, leur polarité est perdue (Galli *et al.*, 1976 ; Hoi-Sang *et al.*, 1979).

La présence de protéines au sein de ces jonctions a longtemps été controversée. Mais on sait aujourd'hui que les jonctions ne sont pas composées uniquement de lipides mais que des protéines associées y jouent un rôle prépondérant (Stevenson et Goodenough., 1984 ; Stevenson *et al.*, 1988). Une liste non exhaustive des protéines associées aux jonctions serrées est présentée dans le tableau 1.

PROTEINES INTEGRALES ET PERIPHERIQUES			PROTEINES DE SIGNALISATION		
Nom	Kda	Références	Nom	Kda	Références
Occludin	62-82	Furuse <i>et al.</i> , 1993	PKC- ζ	81	Dodane et Kachar, 1996
ZO-1	210-225	Stevenson et Goodenough;1984	PKC- α	81	Stuart et al., 1995
ZO-2	160	Stevenson <i>et al.</i> ,1986			Rosson <i>et al.</i> , 1997
		Beatch <i>et al.</i> , 1996	G α_{i-2}	41	De almeida <i>et al.</i> , 1994
ZO-3 (p130)	130	Balda <i>et al.</i> , 1993	G α_0^*	39	Denker <i>et al.</i> , 1996
		Haskins <i>et al.</i> , 1998			Denker <i>et al.</i> , 1996
Cingulin	140-160	Citi <i>et al.</i> , 1989	G α_{12}^*	40	Hamilton et Nathason, 1997
7H6	155-175	Zhong <i>et al.</i> , 1993	G α_s^*	45	Dodane et Kachar, 1996
Symplekin	150	Kéon <i>et al.</i> , 1996	Rab 13	41	Weber <i>et al.</i> , 1994
p330 ?	330	Stuart <i>et al.</i> , 1995	Rab 3B	25	Zahraoui <i>et al.</i> , 1994
P65 ?	65	Stuart <i>et al.</i> , 1995	Src substrate	120	Reynolds <i>et al.</i> , 1994
Fodrin	240	Itoh <i>et al.</i> , 1993	c-Yes	$\approx$ 60	Tsukita <i>et al.</i> , 1991
		Tsukamoto et Nigam, 1997			
Claudin 1 et 2	22	Furuse <i>et al.</i> , 1998	ZO-1-associated kinase	?	Balda <i>et al.</i> , 1996

Tableau 1 :Les protéines des jonctions serrées.
 Liste des protéines identifiées dans ou à proximité des jonctions serrées. Les protéines associées à la membrane ont été séparées des protéines connues comme étant des molécules de signalisation. * peut être spécifique du type cellulaire.(d'après Denker et Nigam,1998).

Les protéines ZO (Zonulae occludentes)

La protéine **ZO-1** fut isolée par Stevenson *et al.* (1986) à partir d'hépatocytes de souris. Cette protéine est une phosphoprotéine monomérique de 220 kDa. Présente au niveau de cellules ne possédant pas de jonctions serrées telles que les fibroblastes (Itoh *et al.*, 1991), les astrocytes et les cellules de Schwann (Howarth *et al.*, 1992) elle n'est, par conséquent, pas spécifique de ce type de jonction. De plus, dans les cellules unies par des jonctions serrées, la protéine ZO-1 est présente à la fois au niveau des *zonula occludentes* et des *zonula adherens*. Toutefois, la protéine ZO-1 semble jouer un rôle majeur dans l'intégrité des jonctions serrées. En effet, Chang *et al.* (1997) montrent que la présence de sérum dans le milieu de culture de cellules épithéliales de rétine entraîne une diminution de la résistance électrique et une augmentation de la perméabilité consécutive à une diminution de l'expression de la protéine ZO-1.

En 1992, Willot *et al.* ont décrit 2 isoformes de ZO-1 qui diffèrent par un domaine interne (α) de 80 acides aminés résultant d'un épissage alternatif. La forme ZO-1 α^+ est exprimée dans toutes les cellules des épithélia alors que ZO-1 α^- est exprimée exclusivement dans les cellules endothéliales et les cellules épithéliales hautement spécialisées (cellules de Sertoli des tubules séminifères et les podocytes du glomérule rénal). L'expression de ce domaine α serait directement liée à la plasticité des jonctions (Balda and Anderson, 1993).

La protéine **ZO-2** est une protéine de 160 kDa (Gumbinder *et al.*, 1991) localisée face cytoplasmique des jonctions serrées d'épithélia et d'endothélia (Jesaitis et Goodenough., 1994). Elle présente de fortes homologues de séquence avec la protéine ZO-1 mais serait, contrairement à celle-ci, spécifique des jonctions serrées.

ZO-1 et ZO-2 font toutes deux parties de la famille des protéines de signalisation **MAGUK** (Membrane Associated Guanylate Kinase) (Pour revue voir Anderson JM., 1996). Très récemment, un nouveau membre de cette famille, la protéine **ZO-3**, a été isolé, identifié et partiellement séquencé (Haskins *et al.*, 1998). Cette protéine correspond à la protéine de 130 kDa (**p130**) décrite par Balda *et al.* en 1993. Celle-ci, localisée face cytoplasmique des jonctions serrées interagit directement avec la protéine ZO-1, mais pas avec ZO-2.

Les membres de cette nouvelle famille de protéines de signalisation sont souvent localisés aux points de contact entre les cellules et permettraient de coupler le message extracellulaire aux différentes voies de signalisation intracellulaires via le cytosquelette.

La Cinguline

La **cinguline** a été isolée à partir de cellules épithéliales intestinales (Citi *et al.*, 1988) puis détectée au niveau de cellules épithéliales pancréatiques, rénales, hépatiques et de cellules endothéliales (Citi *et al.*, 1989). Il existe deux cingulines de poids moléculaires différents (108 kDa et 140kDa) résultant de taux de phosphorylation différents. L'analyse biochimique de la forme 108 et son clonage partiel ont permis de révéler que cette protéine présentait des propriétés structurales proches de certaines protéines du cytosquelette (Citi *et al.*, 1989). Des études de microscopie électronique ont montré que la cinguline est localisée face cytoplasmique des jonctions serrées (Stevenson *et al.*, 1989). Enfin, comme la protéine ZO-2, la cinguline est spécifique des jonctions serrées.

La protéine 7H6

En 1993, Zhong *et al.* ont isolé une nouvelle protéine associée aux jonctions serrées d'hépatocytes de rat, en utilisant un anticorps monoclonal (7H6) obtenu à partir de fractions enrichies en membranes de cellules des canalicules biliaires. La **protéine 7H6** présente une immunoréactivité différente des protéines ZO et de la cinguline. Son poids moléculaire peut varier de 155 kDa à 175 kDa selon les tissus (rat et chien respectivement). Cette protéine est une phosphoprotéine dont la phosphorylation est nécessaire à sa localisation au voisinage des jonctions serrées (Zhong *et al.*, 1994). En 1996, Satoh *et al.* ont montré que la protéine 7H6 jouait un rôle majeur dans l'assemblage et la régulation des jonctions serrées non seulement au niveau des cellules épithéliales mais aussi dans les cellules endothéliales vasculaires. Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a montré la présence de cette protéine au sein des tissus ne possédant pas de jonctions serrées.

L'occludine et les « claudin »

En 1993, Furuse *et al.* ont mis en évidence la première protéine intégrale des jonctions serrées des cellules endothéliales et épithéliales : **l'occludine**. Cette protéine

de 65 kDa a été isolée à partir d'une préparation d'hépatocytes de poulet. Plus récemment, elle a également été mise en évidence dans des cellules de mammifères (Ando-Akatsuka *et al.*, 1996 ; Saitou *et al.*, 1997).

L'occludine constituée de 4 domaines transmembranaires, 3 domaines cytoplasmiques et 2 boucles extracellulaires est caractéristique des jonctions serrées (Figure 4).

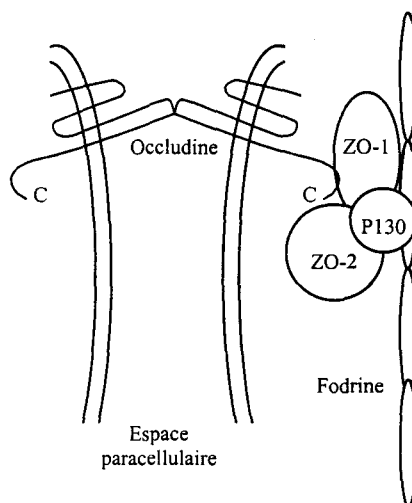


Figure 4: Représentation schématique de l'organisation protéique des jonctions serrées. (d'après Denker et Nigam, 1998)

Les 2 boucles extracellulaires sont orientées vers l'espace intercellulaire et vont interagir (directement ou par l'intermédiaire d'une ou de plusieurs protéines) avec celles de l'occludine exprimée par la cellule adjacente, scellant ainsi l'espace intercellulaire. Par sa séquence COOH terminale, l'occludine est capable de fixer la protéine ZO-1 (Figure 5).

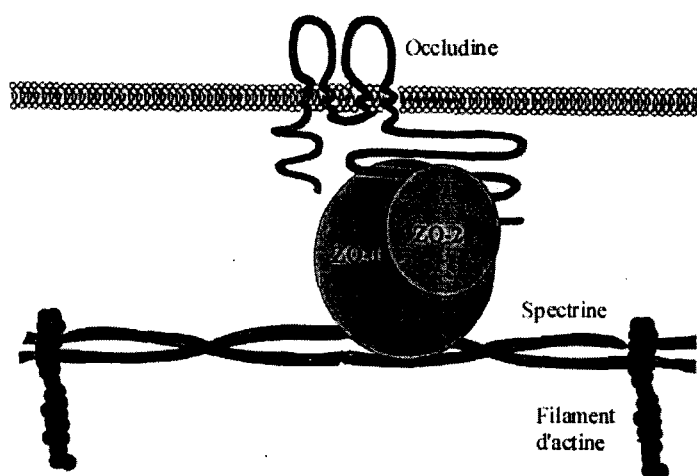


Figure 5 : Schéma hypothétique de l'organisation protéique au sein des jonctions serrées. (D'après Tsukita *et al.*, 1997).

L'interaction entre ces deux protéines est indispensable à leur localisation au niveau des jonctions serrées. Furuse *et al.* (1994) ont montré qu'une délétion de la partie COOH terminale de l'occludine empêchait sa localisation au sein des jonctions. L'expression d'une protéine tronquée de sa partie COOH terminale va en effet modifier la polarité des cellules, l'occludine n'assurant plus son rôle d'obstacle à la diffusion des lipides entre la face apicale et basolatérale des cellules (Balda *et al.*, 1996). En 1997, Van Itallie et Anderson ont montré que l'organisation spatiale de l'occludine dans les membranes des fibroblastes nécessitait la coexpression de ZO-1 dans les cellules. Récemment, Haskins *et al.* (1998) ont montré que l'occludine est capable de se fixer également à la protéine ZO-3 (ou p130).

L'occludine est une phosphoprotéine. Son degré de phosphorylation va influencer directement sa localisation cellulaire. Les formes les moins phosphorylées seront localisées dans la membrane basolatérale, le cytoplasme et les jonctions serrées alors que la forme la plus phosphorylée va se concentrer exclusivement au niveau des jonctions serrées (Sakakibara *et al.*, 1997).

La localisation de l'occludine au sein des jonctions serrées laisse supposer que cette protéine y joue un rôle majeur. En effet, la surexpression de l'occludine dans les cellules MDCK entraîne une augmentation de la résistance électrique transépithéliale (Balda *et al.*, 1996). De plus, Yamada *et al.* (1997) ont souligné l'importance d'une des deux boucles extracellulaires dans la perméabilité paracellulaire. Enfin, Hirase *et al.* (1997) ont montré que l'occludine était fortement exprimée dans les cellules endothéliales cérébrales où elle se répartit uniformément à la périphérie des cellules. A l'inverse, les cellules endothéliales non cérébrales (intestinales, rénales et cardiaques) expriment peu l'occludine qui se répartit alors de manière discontinue dans les membranes cellulaires. L'expression de l'occludine semble donc être liée à la complexité des jonctions serrées établies entre les cellules.

L'ensemble de ces résultats semble confirmer toute l'importance de l'occludine dans la formation et le maintien des jonctions serrées. Cependant, des travaux récents montrent que l'inactivation du gène de l'occludine ne modifie pas la structure des jonctions serrées de cellules épithéliales laissant plutôt supposer que cette protéine n'est pas indispensable ou/et n'est pas la seule protéine responsable de l'intégrité des

jonctions (Saitou *et al.*, 1998). Cette hypothèse a été confirmée très récemment puisque Furuse *et al.* (1998) ont identifié 2 nouvelles protéines intégrales des jonctions serrées : les **claudin 1 et 2**. Ces protéines de 22kDa sont constituées respectivement de 211 et 230 acides aminés. Chacune d'elle possède, comme l'occludine, 4 domaines transmembranaires mais ne présente aucune homologie de séquence avec cette protéine. Le rôle de ces protéines et leurs interactions avec les autres protéines associées aux jonctions serrées restent à déterminer.

Les petites protéines G

La protéine **rab13** est une petite protéine G, capable de fixer le GTP, qui participerait à la transduction des signaux nécessaires à la mise en place et au maintien des jonctions serrées. Des études de microscopie confocale ont montré que, dans les cellules Caco-2, rab 13 colocalise avec ZO-1 au niveau de complexe jonctionnel de nombreux épithélia (intestin, rein, foie) et d'endothélia. Dans les cellules dépourvues de jonctions serrées, rab 13 se trouve associée à des vésicules réparties dans tout le cytoplasme de la cellule.

D'autres petites protéines G telles que rab3B (Weber *et al.*, 1994), $G\alpha_{i-2}$ et plus récemment $G\alpha_{12}$ (Denker *et al.*, 1996) ont été identifiées au voisinage des jonctions serrées. Toutes ces protéines participent au maintien et/ou à la régulation des jonctions.

Le cytosquelette

De nombreux auteurs montrent que les jonctions serrées sont associées au cytosquelette (Madara, 1987 ; Madara et Pappenheimer, 1987 ; Drenckhahn et 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 absence de jonctions serrées, l'actine filamenteuse est diffuse et répartie dans tout le cytoplasme de la cellule endothéliale. A l'inverse, 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.

II. 1. 1. c. Les mécanismes de régulation

De nombreuses études ont démontré que les jonctions serrées sont des structures dynamiques. En effet, ces jonctions doivent s'assembler et se dissocier partiellement ou complètement au cours du développement et au cours de divers processus physiologiques. Plusieurs mécanismes sont connus pour participer à la régulation de ces jonctions serrées. Les chercheurs ne sont qu'au début de l'identification et la compréhension de ces mécanismes. Au regard du rôle majeur que jouent le calcium extracellulaire et les protéines kinases lors de l'établissement des jonctions serrées, ils ont été décrits comme des régulateurs de ces jonctions.

En 1993, Anderson *et al.* ont décrit une cascade d'événements impliqués lors de l'établissement des jonctions serrées (Figure 6).

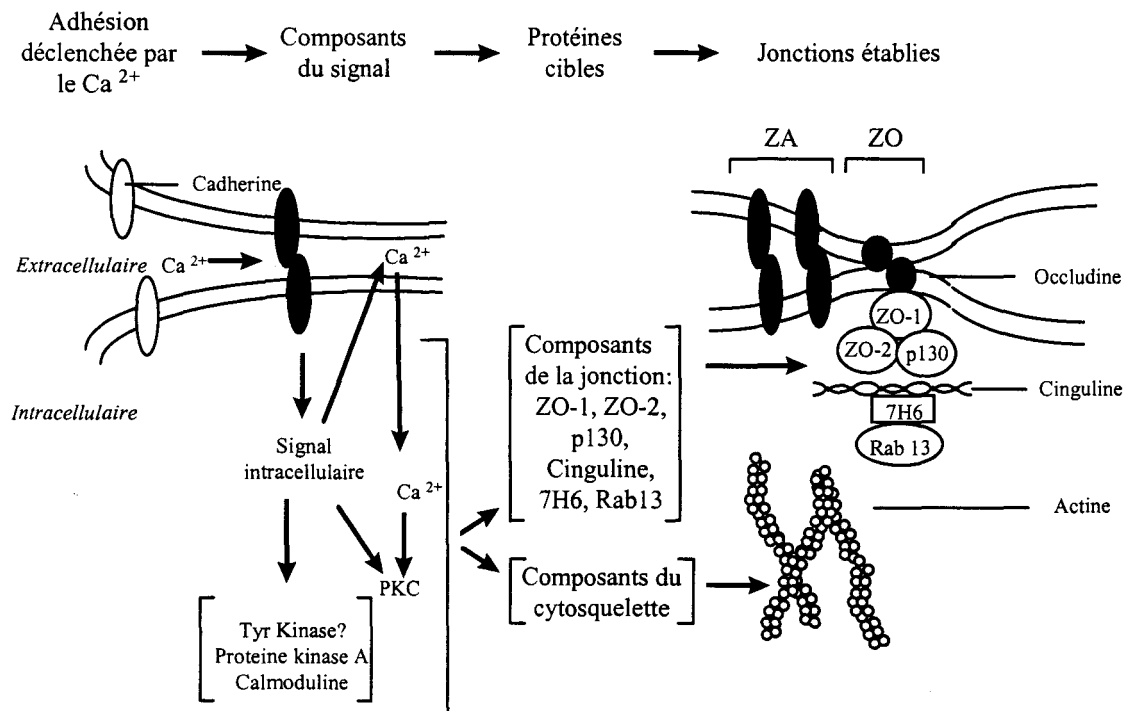


Figure 6: Cascade hypothétique d'événements déclenchés par le contact cellulaire et provoquant la formation des jonctions serrées : rôle du calcium. ZO : Zonula Occludentes ; ZA : Zonula Adherens. (D'après Anderson *et al.*, 1993).

Dans ce modèle, le calcium extracellulaire induirait l'association des cadhérines de deux cellules voisines permettant ainsi l'association de leurs membranes cellulaires. Ainsi, la formation des jonctions serrées dépend de la formation préalable des jonctions intermédiaires (zonula adherens) (Gumbiner and Simons 1986). Les cadhérines doivent ensuite s'associer avec des protéines cytoplasmiques : les caténines (Ozawa *et al.*,

1989). Cette association cadhérine-caténine est indispensable à la formation des jonctions serrées même si aucune de ces protéines n'est localisée au sein de ces jonctions. Cette association provoquerait une élévation du taux de calcium intracellulaire ainsi qu'une activation de la protéine kinase C et d'autres enzymes dépendantes du calcium. Ceci aurait pour conséquence l'apparition, au niveau de la membrane, de l'occludine et l'assemblage des protéines ZO. La cinguline, les protéines rab 13 et 7H6, ainsi que les filaments d'actine se répartiraient alors dans le cytoplasme en un site proche des jonctions. D'autres éléments semblent être impliqués dans l'établissement des jonctions comme les protéines G, la phospholipase C et la calmoduline (Balda *et al.*, 1991).

Rôle du calcium extracellulaire

La présence de calcium dans le milieu extracellulaire initie les interactions cadhérine-cadhérine entraînant la formation rapide des jonctions serrées. La capacité du calcium à induire la formation des jonctions serrées est très spécifique puisque l'addition d'autres cations multivalents (Mg^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} et La^{3+}) aux cellules MDCK cultivées dans un milieu pauvre en calcium n'entraîne pas d'augmentation de la résistance électrique trans-épithéliale (Gonzalez-Mariscal *et al.*, 1985 ; Contreras *et al.*, 1992).

De nombreuses études ont démontré l'impact énorme du calcium extracellulaire sur l'assemblage et l'intégrité des jonctions serrées. L'absence de calcium dans le milieu de culture de cellules MDCK va entraîner une redistribution des protéines associées aux jonctions (Siliciano and Goodenough, 1988 ; Citi, 1992) sans modifier leur taux de phosphorylation (Balda *et al.*, 1993 ; Citi and Denisenko, 1995). En effet, des études d'immunolocalisation de la protéine ZO-1 et de la cinguline ont montré qu'en présence d'un chélateur du calcium dans le milieu de culture, le marquage observé n'est plus localisé en périphérie des cellules mais est diffus dans le cytoplasme (Siliciano et Goodenough, 1988 ; Nigam *et al.*, 1991). Des résultats similaires ont été observés par Nagy *et al.* (1985) sur des microvaisseaux cérébraux isolés.

Toutefois, le maintien de l'intégrité des jonctions serrées serait vraisemblablement le résultat d'un effet indirect du calcium sur des éléments des jonctions adhérentes (les cadhérines) plus qu'un effet direct sur les protéines des

jonctions serrées. En effet, en milieu depourvu de calcium, les cellules MDCK (Martinez-Palomo *et al.*, 1980 ; Gumbiner et Simons, 1986) et les cellules endothéliales (Rutten *et al.*, 1987) perdent leurs jonctions serrées consécutivement à une rupture des jonctions adhérentes.

Rôle du cytoplasme et de la phosphorylation

Même si différentes molécules intracellulaires peuvent modifier la structure des jonctions serrées et la perméabilité, le rôle précis du cytoplasme dans la régulation des jonctions serrées reste obscure.

L'**AMP cyclique (AMPC)** joue un rôle dans la régulation de la perméabilité paracellulaire mais son effet varie en fonction des systèmes étudiés. Au niveau des capillaires cérébraux, son action est controversée. En effet, des études réalisées *in vivo* ont montré que l'administration d'un dérivé liposoluble de l'AMPC augmentait le passage de l'albumine du sang vers le cerveau (Joo, 1972). En revanche, des études réalisées *in vitro* ont montré qu'une augmentation du taux d'AMPC dans les cellules endothéliales cérébrales induisait une augmentation de la résistance électrique et une reorganisation des protéines du cytosquelette associées aux jonctions, notamment de la F-actine (Rubin *et al.*, 1991). Les mêmes résultats ont été obtenus avec des cellules endothéliales périphériques (Stelzner *et al.*, 1989 ; Langelier et Van Hinsberg, 1991). Selon Madara *et al.* (1989), l'AMPC pourrait contrôler l'ouverture des jonctions serrées de manière indirecte en induisant des modifications au niveau des protéines du cytosquelette.

Il apparaît également que de multiples protéines kinases sont impliquées dans la régulation des jonctions serrées.

Un grand nombre d'agonistes et d'antagonistes de la **protéine kinase C (PKC)** ont été utilisés pour élucider quelques mécanismes impliqués dans la formation et la régulation des jonctions serrées. L'activation de la PKC entraîne une augmentation de la perméabilité et une diminution de la résistance électrique des cellules MDCK (Ojakian *et al.*, 1981). Des esters de phorbol, agonistes spécifiques de la PKC, entraînent une augmentation de la perméabilité au saccharose dans les cellules endothéliales d'aorte (Oliver *et al.*, 1990). Chez le rat, Nathanson *et al.* (1992) ont montré que l'activation de

la PKC augmentait la perméabilité des jonctions serrées. Dans les cellules MDCK, les inhibiteurs de PKC ont des effets contradictoires : ils empêchent la dissociation des jonctions serrées induite par la diminution du calcium extracellulaire (Citi, 1992) mais empêchent également leur assemblage, lorsque les cellules sont placées en milieu contenant du calcium (Balda *et al.*, 1992 ; Nigam *et al.*, 1991).

Toutefois le mécanisme d'action de la PKC dans la régulation des jonctions serrées reste à déterminer. En effet, Balda *et al.* (1992) montrent que l'activation de la PKC ne modifie pas le taux de phosphorylation des protéines associées aux jonctions alors que Stuart et Nigam (1995) démontrent que la protéine ZO-1 est la cible directe de cette kinase.

De nombreuses protéines associées aux jonctions sont phosphorylées (Anderson *et al.*, 1988) ; leur taux de phosphorylation peut influencer la perméabilité des jonctions serrées. En effet, une augmentation du taux de phosphorylation de la protéine ZO-1 entraîne une diminution de la résistance électrique transépithéliale (Stevenson *et al.*, 1989).

Les **src-like tyrosines kinases** associées aux jonctions intermédiaires des cellules épithéliales et endothéliales sont également impliquées dans la régulation des jonctions serrées. (Tsukita *et al.*, 1991 ; Achen *et al.*, 1995). L'addition de vanadate, un inhibiteur des tyrosine kinases, entraîne la contraction des fibres d'actine dans la partie apicale de la cellule entraînant la rupture de la barrière paracellulaire (Hadari *et al.*, 1993 ; Anderson *et al.*, 1995). D'autre part, l'oxyde phénylarsine, un inhibiteur spécifique des tyrosine phosphatases entraîne une diminution de la résistance électrique sans entraîner de modifications morphologiques majeures (Staddon *et al.*, 1995).

La **F-actine** semble jouer un rôle important dans la régulation de la perméabilité paracellulaire (Madara, 1987 ; Madara et Pappenheimer, 1987 ; Drenckhahn et Dermietzel, 1988). En effet, la cytochalasine B, un agent destructurant des filaments d'actine, entraîne une diminution de la résistance et une augmentation du flux paracellulaire de mannitol dans différentes lignées épithéliales. En général, la stabilisation des fibres d'actine va diminuer la perméabilité endothéliale et l'inhibition de leur assemblage va l'augmenter (Nybom et Magnusson, 1994).

Des études récentes ont montré que **Rho A** et **rac1** (appartenant à la superfamille des GTPases monomériques Ras) sont impliqués dans la régulation des jonctions serrées (Jou *et al.*, 1998). La cible précise de ces protéines au sein du complexe jonctionnel reste à déterminer.

Les jonctions entre les cellules endothéliales ne sont pas les seuls éléments qui régulent la perméabilité des capillaires. En général, les molécules dont la taille moyenne dépasse 2 nm empruntent pour leur transport **des vésicules et des canaux transendothéliaux**.

I. 1. 2. Les vésicules et canaux trans-endothéliaux

I. 1. 2. a. Les vésicules

Les vésicules sont réparties sur les faces lumineales et ablumineales des cellules endothéliales. Celles-ci se déplacent librement de la face lumineale vers la face ablumineale des cellules, participant ainsi au transport des molécules plasmatiques ou dans la direction opposée, transportant les molécules présentes au sein des fluides interstitiels. Ces vésicules participent au transport de type « fluid-phase », qui permet le passage non spécifique des molécules du sang vers les tissus (Bruns et Palade, 1968). La charge, mais aussi la taille des molécules influencent ce type de transport. Simionescu et Simionescu (1991) ont décrit ces vésicules comme étant la voie principale de transport des protéines plasmatiques dans les endothelia périphériques.

II. 1. 2. b. Les canaux transendothéliaux

Les canaux transendothéliaux proviennent de la fusion de plusieurs vésicules (Simionescu *et al.*, 1975) et seraient aussi impliqués dans les échanges sang-tissus. Ces canaux ne sont pas constitutifs et la rareté de telles structures suggère que leur participation dans les échanges entre le plasma et les fluides interstitiels est faible. Ces canaux permettraient, comme les vésicules, le transport non spécifique des molécules.

Il faut noter que les transports par « fluid-phase » font intervenir des mécanismes de simple diffusion et ne sont efficaces que pour des protéines dont la concentration plasmatique est élevée.

Au niveau des capillaires cérébraux, des études réalisées *in vivo* ont montré que les vésicules de pinocytose sont rares et les canaux transendothéliaux inexistants réduisant le transport par « fluid-phase » (Reese et Karnovski, 1967 ; Delorme *et al.*, 1970).

II. 1. 3. Conclusion

Comme le montre la figure 7, la présence de jonctions serrées, la rareté des vésicules de pinocytose et l'absence de fenestration, en restreignant les phénomènes de diffusion non spécifiques du sang vers le parenchyme cérébral, jouent un rôle prépondérant dans le maintien de l'homéostasie du SNC (Figure 7).

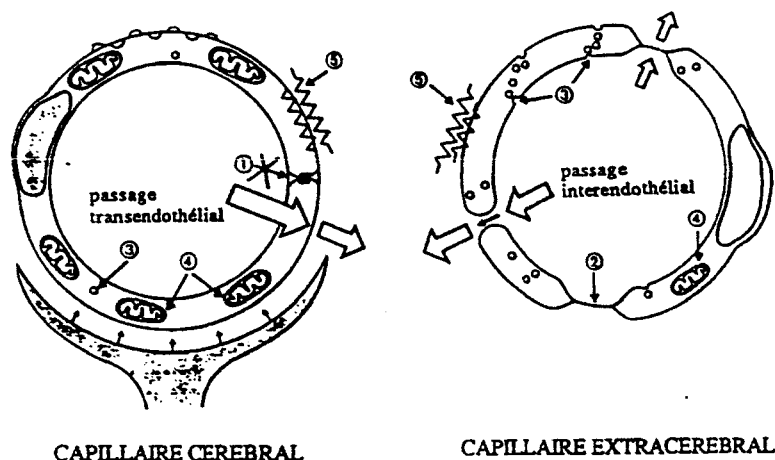


Figure 7: Comparaison des capillaires cérébraux et non cérébraux :

1. les jonctions serrées sont caractéristiques des capillaires cérébraux
 2. les fenestrations n'existent pas dans les capillaires cérébraux
 3. les vésicules de pinocytose sont rares dans les capillaires cérébraux
 4. les mitochondries sont plus nombreuses dans les capillaires cérébraux
 5. la résistance électrique des capillaires cérébraux est très élevée
- (D'après Cornford, 1988).

A ces propriétés structurales s'ajoutent des **caractéristiques métaboliques** qui participent aussi à la régulation des échanges sang-cerveau.

II.2.LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE : UNE BARRIERE METABOLIQUE.

II. 2. 1. La monoamine oxydase

Bertler *et al.* (1964) ont montré 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 mais aussi dans les péricytes, d'une enzyme : **la monoamine oxydase (MAO)** (Bertler *et al.*, 1966 ; Lai *et al.*, 1975 ; Hardebo *et al.*, 1979).

La MAO est une enzyme mitochondriale qui existe sous deux formes : MAO-A et MAO-B. Elles diffèrent par leur spécificité de substrats : la MAO-A dégradant préférentiellement la 5HT et la DA, et la MAO-B la benzylamine, tryptamine et phényléthylamine (Nagatsu, 1973 ; Baranczyk-Kuzma *et al.*, 1986). Ces deux isoformes sont présentes dans les tissus cérébraux, les plexus choroïdes, les microvaisseaux et les capillaires chez l'homme et chez de nombreuses espèces animales (Abe *et al.*, 1980 ; Lai *et al.*, 1975 ; Lindvall *et al.*, 1980 ; Spatz and Mrsulja, 1982).

En fait, la DA, la 5-HT, la NA et l'A sont hydrosolubles et ne possèdent pas de transporteurs spécifiques dans les membranes lumineales des capillaires cérébraux. Leur pénétration dans la cellule endothéliale se limite à une simple diffusion (Oldendorf, 1971). 3 à 5% seulement des neurotransmetteurs monoaminergiques circulants pénètrent dans les cellules endothéliales et y sont inactivés par la MAO (Figure 8)

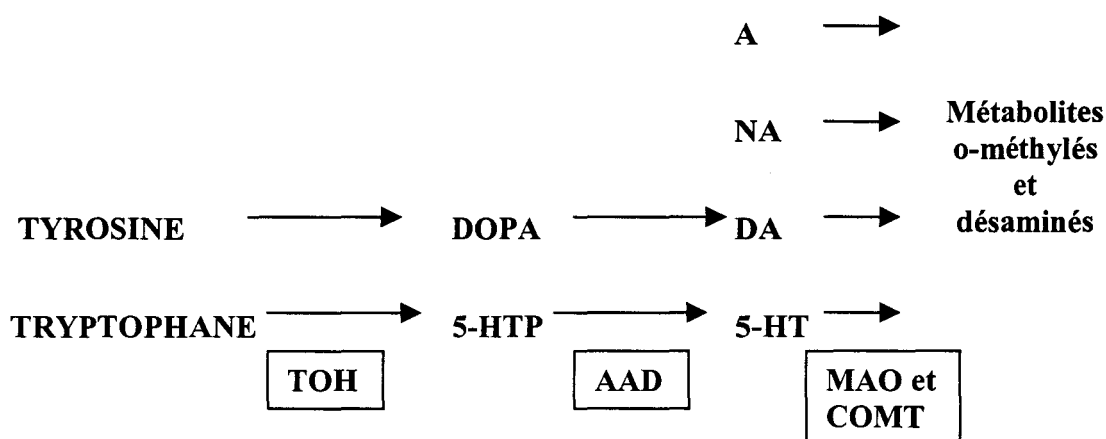


Figure 8: Synthèse et dégradation des neurotransmetteurs monoaminergiques.

(D'après Hardebo et Owman, 1980). A : adrénaline, NA : noradrénaline, DOPA : 3,4-dihydroxyphénylalanine, DA : dopamine, 5-HTP : 5-hydroxytryptophane, TOH : tyrosine hydroxylase, AAD : aromatic L-amino acid décarboxylase, MAO : monoamine oxydase, COMT : catechol-o-methyltransferase.

En revanche, les précurseurs de ces neurotransmetteurs, le 5-hydroxytryptophane (5-HTP) et la 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) pénètrent dans les cellules endothéliales en empruntant le transporteur des acides aminés neutres (Oldendorf et Szabo, 1976 ; Pardridge, 1977). L'enzyme impliquée dans la synthèse des neurotransmetteurs (la décarboxylase des acides aminés aromatiques ou ADD) est présente dans les capillaires cérébraux (Bertler *et al.*, 1966 ; Hardebo *et al.*, 1979). L'ADD transforme la DOPA et la 5-HTP respectivement en dopamine et sérotonine dans les cellules endothéliales, où elles seront ensuite dégradées par la MAO. Celle-ci empêche les amines circulantes de pénétrer dans le cerveau mais inactive également les neurotransmetteurs libérés par les neurones dans le liquide interstitiel cérébral. En effet, les neurotransmetteurs monoaminergiques sont activement prélevés du côté abluminal puis métabolisés dans les capillaires cérébraux (Meyer *et al.*, 1973 ; Spatz *et al.*, 1981). Des expériences d'inhibitions compétitives ont démontré que les neurotransmetteurs n'empruntaient pas les systèmes de transport A ou L des acides aminés mais plutôt des récepteurs de type α et β adrénergiques (Abe *et al.*, 1980 ; Hardebo et Owman, 1980).

La monoamine oxydase des cellules endothéliales de capillaires cérébraux participe à ce que Betz a appelé la « barrière métabolique », empêchant les échanges transcellulaires des neurotransmetteurs monoaminergiques et de leur précurseurs (Betz *et al.*, 1980).

II. 2. 2. La P-glycoprotéine

II. 2. 2. a. Structure

La P-glycoprotéine (pour phosphoglycoprotéine) est une protéine membranaire dont le poids moléculaire peut varier de 140 à 180kDa en fonction du taux de glycosylation d'un site spécifique présent sur la première boucle extracellulaire située du côté N-terminal de la protéine (Gros *et al.*, 1986).

Chez l'homme, elle est composée de 1280 acides aminés qui s'organisent en deux parties homologues correspondant approximativement chacune à la moitié de la protéine, ce qui suggère une duplication génique (Figure 9).

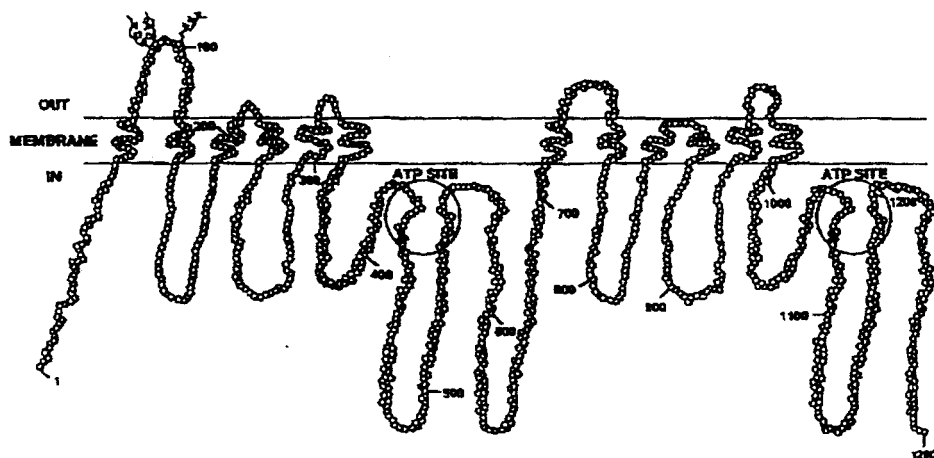


Figure 9: Structure de la P-glycoprotéine humaine : insertion dans la membrane plasmique. (D'après Gottesman et Pastan, 1993). Chaque cercle représente un acide aminé.

La protéine traverse 12 fois la membrane cellulaire, créant une conformation ondulée caractéristique d'une protéine responsable d'un système de transport. La partie

cytoplasmique contient deux sites de liaison à l'ATP (Fojo *et al.*, 1987 ; Rothenberg et Ling, 1989), suggérant que l'activité de cette protéine nécessite de l'énergie. Les sites de fixation de l'ATP s'avèrent extrêmement conservés au cours de l'évolution et se retrouvent dans plusieurs autres protéines membranaires tant chez les organismes procaryotes que chez les eucaryotes (Higgins, 1992). En raison de l'homologie de leur site de fixation de l'ATP, ces protéines sont regroupées dans une superfamille de gènes désignée ABC (pour ATP-Binding-Cassette). Des mutations au niveau de ces deux sites de fixation conduisent à une perte de fonction de la protéine, démontrant le caractère essentiel de chacun de ces sites (Azzaria *et al.*, 1989). Toutefois, ces mutations n'empêchent pas la liaison de l'ATP, attestant qu'une étape ultérieure, probablement l'hydrolyse de l'ATP, est requise pour l'activation de la P-gp (Shapiro et Ling, 1994).

II. 2. 2. b. Fonction

Au niveau des tissus tumoraux :

La P-glycoprotéine a été découverte par Juliano et Ling en 1976 à la surface de cellules de lignées tumorales. Ces cellules rendues résistantes à un cytostatique particulier développaient une résistance croisée envers d'autres cytotoxiques de structure et de fonction différentes et présentaient alors un phénotype de « multi-résistance » (MDR, pour multidrug resistance). L'apparition de ce phénotype est liée à l'expression de la P-gp.

La P-gp est codée par une famille multigénique dont les séquences sont hautement conservées (Juranka *et al.*, 1989). Cette famille comprend chez l'homme deux gènes MDR1 et MDR2 (aussi appelé MDR3) (Gottesman et Pastan., 1993), chez les rongeurs, trois gènes, *mdr1* (ou *mdr1b*), *mdr2* et *mdr3* (ou *mdr1a*) (Gros et Buschman, 1993).

L'implication des gènes *mdr* dans la résistance cellulaire aux médicaments a été formellement démontrée par transfection. Ainsi, l'expression des gènes murins *mdr1* et *mdr3*, de même que celle du gène humain MDR1, dans les cellules sensibles aux médicaments permet l'acquisition d'une résistance multiple (Ueda *et al.*, 1987). Des expériences similaires ont toutefois montré que les gènes murins *mdr2* et humain MDR2 ne sont pas impliqués dans le phénotype de résistance croisée aux médicaments.

Les médicaments intéressés par le phénomène MDR contiennent un noyau aromatique hydrophobe et sont issus de plantes ou de micro-organismes. Les principaux agents anticancéreux concernés sont les anthracyclines, les poisons du fuseau, les épipodophyllotoxines, l'actinomycine D, la mitracyne, les taxoïdes et le topotecan (Tableau 2).

<i>Vinca-alcaloïdes</i>	
Vinblastine	
Vincristine	
Navelbine	
	<i>Epipodophyllotoxines</i>
	Etoposide
	Ténoposide
<i>Taxoïdes</i>	
Taxol	
Taxotère	
	<i>Autres</i>
	Mitoxantrone
	Actinomycine D
	Amsacrine
<i>Anthracyclines</i>	Trimetrexate
Doxorubicine	Mithramycine
Daunorubicine	Topotecan
Epirubicine	
Idarubicine	

Tableau 2 : Agents anticancéreux intervenant dans le phénotype de résistance.
(D'après Oudard *et al.*, 1996)

Au niveau des tissus sains :

La P-gp est aussi localisée dans plusieurs tissus sains. Son expression, sous contrôle tissulaire précis, laisse supposer que la P-gp remplit des fonctions physiologiques importantes.

L'expression des gènes *mdr2* chez la souris et *MDR2* chez l'homme est restreinte presque qu'exclusivement au foie (Thiebault *et al.*, 1987). La P-gp produite par ces gènes est présente au niveau des canalicules biliaires où elle participe à la formation de la bile en facilitant la translocation des phosphatidylcholines du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane cellulaire (Higgins, 1994).

L'expression de *mdr1* à des sites tels que les ductules pancréatiques, l'endomètre de souris gravides et le cortex surrénalien suggère qu'elle joue un rôle dans le transport d'un substrat physiologique. Des travaux ont montré que la P-gp pouvait transporter certaines hormones stéroïdes telles que le cortisol, l'aldostérone, l'hormone synthétique dexaméthasone et la corticostérone. (Ueda *et al.*, 1992 ; Wolf et Horwitz, 1992). Van Helvoort *et al.* (1996) ont montré que la P-gp produite par les gènes *MDR1* et *mdr1a* est

capable de transloquer les lipides membranaires : phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine, céramide, sphingomyéline. Elle aurait donc, comme mdr2, un rôle de flippase mais serait beaucoup moins sélective.

En 1989, Cordon-Cardo *et al.* localisent la P-gp au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et testiculaires humains. Elle a également été détectée dans les capillaires cérébraux de rat (Thibault *et al.*, 1989), de souris et de porc (Hegmann *et al.*, 1992), suggérant que la présence de la P-gp soit une propriété générale de la BHE des mammifères.

Même si le rôle physiologique précis de la P-gp fut difficile à déterminer, de nombreuses informations ont pu être apportées suite à l'inactivation des gènes mdr chez la souris. En effet, la production de souris mutantes, dont le gène mdr3 (mdr1a) a été invalidé par recombinaison homologue, révèle que l'absence de la P-gp au niveau des cellules endothéliales de la BHE n'est pas létal. Toutefois, ces souris mdr3 (-/-) sont devenues hypersensibles à un certain nombre de composés connus pour être pris en charge par la P-gp (Schinkel *et al.*, 1995, 1996 ; Mayer *et al.*, 1996). Le traitement des souris mdr3 (-/-) à l'ivermectine (acaricide utilisé contre la gâle), normalement sans conséquence chez les souris sauvages, provoque une augmentation dramatique de sa concentration cérébrale, entraînant la mort des animaux (Schinkel *et al.*, 1994).

En cultivant des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, Tsuji *et al.* (1992), Ohnishi *et al.* (1995), Shirai *et al.* (1994) ont montré que la vincristine, la doxorubicine et la cyclosporine, malgré leur caractère lipophile, ne pénétraient pas dans le cytoplasme de la cellule. Ces trois molécules, connues pour être prises en charge par la P-gp dans les cellules tumorales MDR, seraient expulsées hors de la cellule endothéliale; ce qui expliquerait la faible perméabilité de la BHE pour ces molécules.

Ces résultats démontrent que la P-gp participe à l'effet « barrière » de cet endothélium en empêchant l'entrée de xénobiotiques dans le compartiment cérébral. Ceci permettrait d'expliquer d'une part, l'efficacité limitée de la chimiothérapie dans le traitement des tumeurs cérébrales et, d'autre part, les effets secondaires observés chez les patients traités avec des agents tumoraux en combinaison avec des inhibiteurs de la P-gp tels que la cyclosporine (Barbui *et al.*, 1992).

La localisation précise de la P-gp au sein des capillaires cérébraux est sujet à controverse. Des études de microscopie électronique ont montré que la P-gp était exprimée face luminale des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, en contact direct avec le compartiment sanguin (Sugawara, 1990 ; Tanaka *et al.*, 1994). Beaulieu *et al.* (1997) ont confirmé ces observations par des méthodes biochimiques, démontrant que les membranes luminales présentaient un enrichissement important (17 fois) en P-gp comparées aux capillaires isolés. A l'inverse, Pardridge *et al.* (1997) ont montré que la P-gp était exprimée majoritairement au niveau des pieds astrocytaires et non au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux, confirmant alors, les travaux réalisés *in vivo* par Tishler *et al.* (1995).

Même si, jusqu'à présent, toutes les études *in vitro* concernant la P-gp ont été réalisées sur des cellules endothéliales de capillaires cérébraux confirmant sa présence sur leur face luminale, aucune étude n'exclut qu'elle soit également exprimée au niveau des pieds astrocytaires.

II. 2. 2. c. Mode d'action et modulation

Même si le mode d'action permettant l'expulsion du composé reste à déterminer, des expériences de photoaffinité ont permis de démontrer que, dans les cellules MDR, il nécessite une liaison physique entre la P-gp et ses substrats tels que l'adriamycine (Busche *et al.*, 1989), la vinblastine et la colchicine (Safa *et al.*, 1986 ; 1989). Selon Higgins (1994), l'interaction entre le substrat lipophile et la P-gp nécessite, dans un premier temps, la pénétration du substrat lipophile dans la double couche lipidique. Une fois intégré, il peut se fixer à la P-gp et peut être 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, interagit à son tour avec la P-gp. Ainsi, progressivement, le substrat est chassé de la cellule.

La P-gp agirait comme une pompe d'efflux membranaire, expulsant les substrats hors du cytoplasme de la cellule, elle crée un gradient de concentration permanent de part et d'autre de la membrane cellulaire. Ce gradient est maintenu grâce à l'énergie

fournie par l'hydrolyse de l'ATP (Hamada et Tsurro, 1988). Bien que la P-gp présente deux sites de fixation de l'ATP, Senior *et al.* (1995) ont montré que le transport des différents substrats ne nécessite l'intervention que d'un seul de ces deux sites qui fonctionneraient donc en alternance. En effet, le site actif va modifier la conformation de la protéine inhibant l'activité de l'autre site. Le choix du site actif pourrait dépendre du site de fixation du substrat.

Ainsi, au cours de son cycle catalytique, la P-gp va présenter différentes conformations. ATP et substrats semblent tout deux capables d'induire des modifications conformationnelles de la protéine (Liu et Sharom, 1996). Récemment, Wang *et al.* (1998) ont proposé un modèle de fonctionnement de la P-gp, reliant fixation et transport d'un substrat (en l'occurrence la vinblastine) avec le cycle catalytique de la protéine (Figure 10).

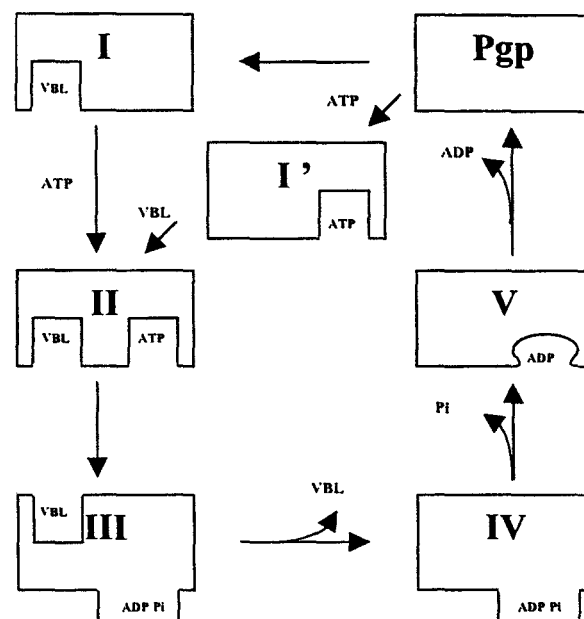


Figure 10: Correlation entre fixation/transport du substrat et fixation/hydrolyse de l'ATP. (D'après Wang *et al.*, 1998). La liaison de la Vinblastine (VBL) ou de l'ATP induit les conformation I ou I'. La liaison de la VBL et de l'ATP induit la conformation II. L'hydrolyse de l'ATP modifie la conformation de la P-gp (III) entraînant le déplacement de la VBL vers la face opposée de la membrane. La libération de la VBL induit la conformation IV. La libération du phosphate induit la conformation V. La libération de l'ADP permet à la P-gp d'entamer un nouveau cycle.

Plusieurs sites de fixation des substrats ont été décrits : le premier au niveau des segments transmembranaires 5 et 6 et le second au niveau des segments transmembranaires 11 et 12 (pour revue voir Germann, 1996). D'autres travaux suggèrent qu'il existerait, en réalité, au moins deux sites de fixation distincts mais que

certains d'entre eux pourraient se chevaucher, chacun ayant une affinité différente pour des médicaments distincts (Gros et Shustik. 1991 ; Loo et Clarke 1994).

Certains substrats peuvent partager le même site de fixation et peuvent par conséquent entrer en compétition pour se fixer sur la P-gp. Tamai et Safa (1990) ont montré que l'administration de cyclosporine supprime la résistance à la vincristine et potentialise la toxicité de la vinblastine dans les cellules MDR. De même, l'injection de vérapamil sensibilise les cellules cancéreuses ovariennes à l'action de l'adryamicine (Rogan *et al.*, 1984).

Ainsi, il est possible de moduler l'activité de la P-gp. En inhibant la P-gp exprimée au niveau de la BHE, il serait possible d'augmenter la concentration des anticancéreux dans le compartiment cérébral et espérer ainsi limiter les échecs des chimiothérapies. Si dans la majorité des cas, le mode d'action des agents modulateurs est une inhibition compétitive de l'expulsion du cytotoxique, le modulateur peut parfois, en se fixant sur la P-gp entraîner un changement de sa conformation empêchant ainsi la fixation du substrat (Figure 11).

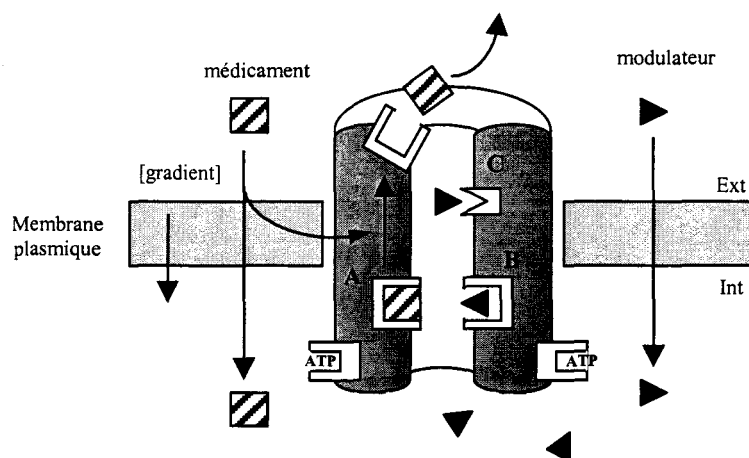


Figure 11: représentation fonctionnelle de la P-gp. La P-gp utilise l'ATP pour transporter le substrat de part et d'autre de la membrane plasmique (A). Un modulateur peut agir comme un inhibiteur compétitif, occupant le site de fixation du substrat (B) ou comme un inhibiteur non compétitif (C). (D'après Ford. 1996)

Joly *et al.* (1996) ont montré que certains modulateurs pouvaient également agir directement sur la transcription du gène MDR1. En effet, en présence de vérapamil, le taux d'ARN messagers codant pour la P-gp exprimée dans des cellules tumorales humaines se trouve fortement diminué.

De nombreux modulateurs ont été décrits et peuvent être classés, selon Oudard *et al.* (1996), en plusieurs catégories (Tableau 3) : les antagonistes calciques, les inhibiteurs de la calmoduline, les analogues des vinca-alcaloïdes, les composés hydrophobes, cationiques, de haut poids moléculaires, la cyclosporine et ses dérivés et, enfin, les nouveaux composés de synthèse.

<i>Antagonistes calciques</i>	<i>Cyclosporine et dérivés</i>
Vérapamil (6-10µM)	Cyclosporine A (0,8-2µM)
Nifédipine (35µM)	SDZ PSC 833 (0,1µM)
Niguldipine (10µM)	SDZ 28-446 (0,1µM)
Bépridil (4µM)	FK506 (3µM)
PAK-200 (5µM)	
Ro 11-2933 (2-6µM)	
<i>Inhibiteurs de la calmoduline</i>	<i>Antibiotiques</i>
Trifluoropérazine (3-5µM)	Céfopérazone (1000µM)
Prochlorpérazine (4µM)	Ceftriaxone (1000µM)
Fluphénazine (3µM)	Erythromycine (650µM)
Trans-Flupenthixol (3µM)	
<i>Analogues des vinca-alcaloïdes</i>	<i>Autres</i>
Vindoline (20-50µM)	Dipyridamole (5-10µM)
Thaliblastine (2µM)	BIBW 22 (1µM)
	Quinidine (10µM)
	Choroquine (10-50µM)
	Terfénadine (3-6µM)
<i>Stéroïdes</i>	Réserpine (5µM)
Progestérone (2µM)	Amiodarone (4µM)
Tamoxifène (2-10µM)	Méthadone (75µM)
Toremifène (5µM)	S9788 (1-3µM)
Mégesterol acétate (5µM)	GF 120918 (0,02-0,1µM)
17β-Estradiol glucuronide (100µM)	Tolyphosphine (0,1-0,5µM)

Tableau 3: Sélection des agents pharmacologiques ayant la capacité de lever la MDR. (D'après Oudard *et al.*, 1996). Les concentrations entre parenthèses sont celles ayant montré une réversion des cellules tumorales présentant une MDR *in vitro*.

Le meilleur modulateur serait celui dont on pourrait obtenir un taux sérique supérieur à celui nécessaire, *in vitro*, pour inhiber complètement la P-gp, diffusant bien dans le tissu tumoral *in vivo* et dénué de toxicité. La toxicité de ces différents agents modulateurs est effectivement le facteur limitant pour leur utilisation en clinique. Les premiers modulateurs utilisés, le vérapamil et la cyclosporine aux taux plasmatiques requis pour obtenir une activité maximale *in vitro*, provoquent *in vivo* un bon nombre d'effets secondaires. C'est pourquoi, plus récemment, de nouvelles molécules ont été spécialement développées sur la base de relation structure-activité. Ces composés, comme le PSC 833 ou le S9788 se révèlent, *in vitro*, être beaucoup plus efficaces que

les composés de première génération, sans présenter d'effets secondaires notables *in vivo* (Twentyman et Bleehen, 1991). Toutefois, des études réalisées chez la souris montrent qu'à la dose maximale tolérée, le PSC833 est incapable d'inhiber complètement la P-gp (Mayer *et al.*, 1997). Cette perte d'efficacité semble être la conséquence de sa liaison aux protéines plasmatiques. Ce problème de biodisponibilité, *in vivo*, est rencontré pour de nombreux autres modulateurs (Lehnert *et al.*, 1996). C'est pourquoi de nouvelles stratégies se développent afin de moduler, plus efficacement et/ou plus spécifiquement, l'activité de la P-gp :

- Utilisation d'anticorps monoclonaux, qui se fixant sur des épitopes extracellulaires de la P-gp peuvent en moduler l'activité (Hamada et Tsuruo, 1986 ; Arceci *et al.*, 1993 ; Mechetner et Roninson, 1992).
- Utilisation d'oligonucléotides anti-sens qui en empêchant la traduction des ARN messagers codant pour la P-gp vont réduire son expression dans les membranes cellulaires (Tominaga *et al.*, 1995).
- Utilisation de facteurs régulant l'expression du gène MDR1 (Ford, 1995)
- Utilisation d'inhibiteur de la PKC. En effet, la P-gp est une phosphoprotéine dont l'activité nécessite sa phosphorylation par la PKC. Le traitement des cellules avec des activateurs de la PKC entraîne une diminution de l'accumulation des médicaments dans les cellules (Ido *et al.*, 1986 ; Ferguson et Chen, 1987). A l'inverse, l'inhibition de cette protéine kinase va entraîner une diminution de l'activité de la P-gp (Hamada *et al.*, 1987 ; Fine *et al.*, 1988). Ces résultats laissent supposer qu'en inhibant spécifiquement la PKC, il serait possible de moduler l'activité de la P-gp.

Comme la MAO, La P-gp des cellules endothéliales de capillaires cérébraux participe à la « barrière métabolique », empêchant le passage de xénobiotiques et en particulier d'anticancéreux vers le cerveau. Cette propriété pourrait être une conséquence d'un rôle plus physiologique qui permettrait le maintien de la polarité lipidique entre les feuillettes externe et interne de la membrane apicale.

Ainsi l'endothélium des capillaires cérébraux présente des caractéristiques structurales et métaboliques spécifiques, indispensables au maintien de l'homéostasie cérébrale. Ces propriétés le différencient de l'endothélium des capillaires périphériques. Pourtant, les travaux de Reeze et Karnovsky (1967) montrent qu'il serait, en réalité, très peu différent de l'endothélium des capillaires des autres organes. En effet, seul le milieu

environnant et non l'origine des capillaires serait responsable de l'induction de ces caractéristiques.

II.3 INDUCTION DES PROPRIETES PHYSIQUES ET METABOLIQUES DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE.

I.3.1 influence de l'environnement cérébral

Svendgaard et al (1975) sont les premiers à montrer que le parenchyme cérébral est à l'origine de l'établissement de certaines propriétés métaboliques des capillaires cérébraux. Ils réalisent une expérience de transplantation de tissu cérébral dans la chambre de l'œil. Les capillaires de l'iris vascularisent le greffon cérébral et présentent alors les activités MAO et DOPA-décarboxylase caractéristiques de la BHE. A l'inverse, dans un fragment d'iris transplanté dans le cerveau et revascularisé par des capillaires d'origine cérébrale, la MAO et la DOPA-décarboxylase disparaissent. D'autres expériences de transplantation ont permis de confirmer que l'environnement cérébral était capable de réinduire des propriétés physiques et métaboliques de la BHE dans des cellules endothéliales d'origine périphérique : réinduction des jonctions serrées, de la phosphatase alcaline et de la cholinestérase (Stewart et Wiley., 1981), de la protéine HT7 (Risau *et al.*, 1986).

Même si ces expériences démontrent l'importance de l'environnement cérébral dans l'établissement de la BHE, elles ne permettent pas de déterminer qu'elles sont précisément **les cellules responsables de l'induction de ses propriétés.**

Alors qu'on attribue généralement le fonctionnement du cerveau humain à l'activité neuronale, il faut noter que la moitié des cellules cérébrales sont en fait des cellules non neuronales parmi lesquelles **les astrocytes** de part leur nombre, sont les plus importantes d'entre elles. Elles constituent en effet la moitié des cellules gliales, l'autre moitié comprenant les oligodendrocytes et la microglie. C'est pourquoi, **la responsabilité des astrocytes dans l'induction des propriétés de la BHE** a rapidement été envisagée.

II.3.2. Influence des astrocytes

Plus que leur importance numéraire, la localisation des astrocytes au voisinage des capillaires cérébraux a été à l'origine des nombreuses études cherchant à leur imputer un rôle dans l'induction des propriétés de la BHE.

II.3.2.a. Situation stratégique des astrocytes

En effet, Les **astrocytes** sont en contact avec les capillaires cérébraux par l'intermédiaire de leurs prolongements pédiculés qui forment une gaine autour de la membrane basale des cellules endothéliales (Figure 12)

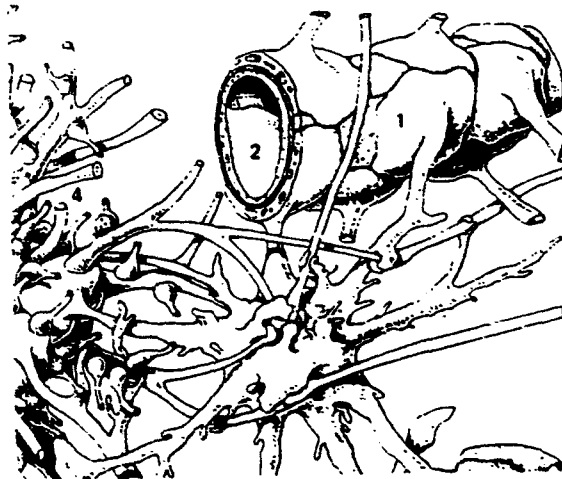


Figure 12 : Prolongements pédiculés des astrocytes (1) formant un manchon continu autour des capillaires cérébraux (2). (d'après Ganong, 1989).

Ces astrocytes protoplasmiques ou vélamenteux se distinguent des astrocytes fibrillaires, situés dans la substance blanche, principalement par leurs caractéristiques morphologiques mais aussi par leurs différences fonctionnelles (Wilkin *et al.*, 1990). Leurs prolongements entourent également les synapses neuronales, forment les couches sous-piales et sous épendymaires (Figure 13) et couvrent toutes les surfaces libres des neurones (surfaces non couvertes par d'autres neurones ou par des prolongements oligodendrocytaires). En contact, à la fois avec les cellules endothéliales et les neurones, les astrocytes auront des influences sur les deux types cellulaires.

De nombreuses études montrent que les astrocytes sont nécessaires au fonctionnement du système nerveux central. Ainsi, l'une des premières fonctions attribuées aux astrocytes fût **leur rôle dans le développement cérébral** puisqu'elles permettent la migration des neurones de leur lieu d'origine dans le système nerveux en formation jusqu'à leur destination finale dans le cerveau mature. De plus leur capacité de synthèse de facteurs de croissance neuronaux leur confère une action neurotrophique.

Les astrocytes participent également **au maintien de l'homéostasie** du milieu dans lequel baignent les neurones (Figure 13).

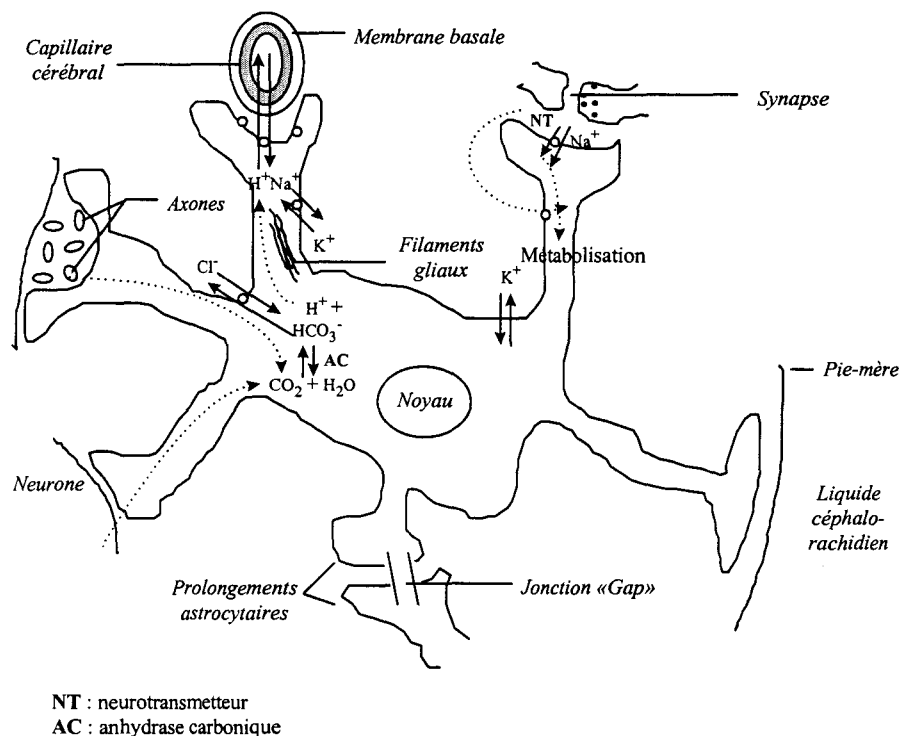


Figure 13: Situation stratégique et rôle des astrocytes : maintien de l'environnement neuronal (D'après Kimelberg, 1983). BM : membrane basale ; CAP : capillaire cérébral ; GLIAL FIL : filaments gliaux ; SYN : synapse ; NT : neurotransmetteur ; METAB : métabolisme ; CSF : liquide céphalo-rachidien ; Pia : Pie-mère ; AsP : prolongements astrocytaires ; GAP : jonctions de type gap ; CA : anhydrase carbonique.

En effet, les astrocytes sont reliés entre eux par des jonctions de type gap (Peters *et al.*, 1976) et maintiennent le pH du liquide extracellulaire cérébral en prélevant le CO_2 libéré lors du métabolisme des neurones (Kimelberg *et al.*, 1979). Ils éliminent aussi l'excès d'ions potassium libéré dans l'espace extracellulaire au cours de l'activité neuronale (Kimelberg, 1983). Au niveau des synapses, ils inactivent les neurotransmetteurs libérés en les prélevant et en les métabolisant (Varon et Somjen, 1979). Les astrocytes possèdent également des récepteurs de la plupart des neuromédiateurs, mais leur rôle est encore inconnu (Kimelberg et Norenberg, 1989). La

présence de ces récepteurs suggère que ces cellules ne sont pas des éléments passifs au sein du système nerveux central.

Parmi les fonctions attribuées aux astrocytes, leur capacité à **réinduire les propriétés de la BHE** est sans conteste la plus étudiée. En effet, la présence d'un manchon continu de pieds astrocytaires autour des capillaires ne pouvait que suggérer l'existence d'interactions entre astrocytes et capillaires cérébraux et en particulier entre astrocytes et cellules endothéliales.

II.3.2.b influence des astrocytes sur les cellules endothéliales

Delorme et al (1968) ainsi que Wolf et Bär (1972) ont été les premiers à observer 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. D'autres travaux ont montré, *in vivo*, que les astrocytes seraient impliqués dans l'établissement des **jonctions serrées** au niveau des cellules endothéliales (Janzer et Raff, 1987), ainsi que dans l'expression de la γ -GT (Cancilla *et al.*, 1990). Ces résultats précisent l'origine astrocytaire de l'induction des propriétés de l'endothélium des capillaires cérébraux.

D'autres études réalisées, *in vitro*, ont permis de mieux appréhender le rôle des astrocytes dans l'induction des propriétés structurales et métaboliques de l'endothélium cérébral. Deux stratégies ont été suivies afin de comprendre les mécanismes responsables de l'induction des propriétés de la BHE : **l'utilisation de milieu conditionné d'astrocytes et la coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes.**

Les cellules endothéliales de capillaires cérébraux mises en culture se différencient et perdent les caractéristiques propres à leur origine cérébrale. Lorsque les cellules endothéliales sont cultivées en présence de milieu de culture d'astrocytes (milieu conditionné), l'expression des jonctions serrées peut être réinduite (Rubin *et al.*, 1991 ; Pardridge *et al.*, 1990 ; Wolburg *et al.*, 1994). Toutefois, Rubin *et al.* (1991) ont montré que le milieu conditionné est nécessaire mais n'est pas suffisant et que l'ajout d'AMPc est indispensable à cette réinduction. L'augmentation de la résistance serait accompagnée d'une diminution de la perméabilité au saccharose et une réorganisation de la F-actine corticale.

Le milieu conditionné possède aussi la propriété de réinduire certaines caractéristiques métaboliques de l'endothélium cérébral.

Takemoto *et al.* (1994) ont montré que la culture de cellules endothéliales d'artère de poumon en présence de milieu conditionné de cellules gliales humaines réinduit l'expression de la phosphatase alcaline. A l'inverse, les résultats obtenus quant à la réinduction de l'activité γ -GT sont contradictoires. En effet, cette activité disparaît lorsque les cellules sont mises en culture (DeBault *et al.*, 1981 ; Diglio *et al.*, 1982 ; Goetz *et al.*, 1985). Contrairement à Maxwell *et al.* (1987), DeBault et Cancilla (1980), ont montré que le milieu conditionné de cellules gliales provenant d'un gliome de rat (cellules C6) ne permet pas la réinduction de l'activité γ -GT au niveau des cellules endothéliales. Il faut noter que des travaux récents ont montré qu'une grande partie de la γ -GT des capillaires cérébraux est concentrée dans les péricytes, les cellules endothéliales n'ayant qu'une faible activité γ -GT (Risau *et al.*, 1992).

Il semblerait donc que les astrocytes sécrètent un ou des facteurs solubles indispensables à l'établissement des propriétés de la BHE. Cependant, le milieu conditionné semble, dans certaines conditions, insuffisant. Une seconde voie de recherche dans ce domaine, consiste à étudier la réinduction de ces caractéristiques en réalisant **des cocultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes** et ce, afin de recréer les conditions décrites *in vivo*.

Tao-Cheng et Brightman (1988) ont montré qu'une coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes réinduit la formation des **jonctions serrées** dont l'étendue et la complexité ressemblent à celles décrites *in vivo*.

Dehouck *et al.* (1990), en réalisant une coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes de part et d'autre d'un filtre, ont observé une augmentation de la résistance électrique de la monocouche des cellules endothéliales, accompagnée d'une diminution de la perméabilité au saccharose et à l'inuline. Les mêmes résultats sont obtenus lorsque la coculture est réalisée avec des astrocytesensemencés dans le fond d'une boîte de Pétri et des cellules endothélialesensemencées sur un filtre (Dehouck *et al.*, 1994). Dans ce cas, il n'y a plus de contacts directs entre les deux types cellulaires impliquant l'intervention **de facteurs solubles** dans ces phénomènes. Des résultats similaires sont

obtenus par Raub *et al.* (1992) avec des cocultures de cellules gliales C6 et de cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux. Ramsahoye et Fritz (1998) montrent que ce(s) facteur(s) ne semblent pas être de nature protéique.

Les astrocytes sont aussi capables de réinduire certaines propriétés métaboliques (caractéristiques ou non) des cellules endothéliales de capillaires cérébraux telles que l'activité de la phosphatase alcaline (Beck *et al.*, 1986) ou l'activité γ -GT au niveau des cellules endothéliales lorsque celles-ci sont cultivées en présence de cellules C6 (DeBault, 1981 ; Raub *et al.*, 1992) ou de cultures primaires d'astrocytes (Dehouck *et al.*, 1990). Les résultats concernant l'activité de la P-gp sont contradictoires. En effet, Lechardeur et Scherman (1995) montrent que le niveau d'expression de la P-gp dans les cellules endothéliales en culture primaire est identique à celui des capillaires isolés, suggérant que les cellules gliales n'aient aucun effet sur l'expression de cette protéine. A l'inverse, Joly *et al.* (1996) montrent que la culture de cellules endothéliales en présence d'astrocytes induit une augmentation de l'activité de la P-gp.

Le milieu conditionné par les astrocytes apparaît parfois insuffisant pour le rétablissement des propriétés de la BHE, l'ajout de facteurs supplémentaires tel que l'AMPc s'avère souvent nécessaire. Les études de coculture font apparaître de meilleurs résultats, suggérant que la présence des cellules endothéliales peut influencer la sécrétion par les astrocytes des facteurs responsables de la réinduction des caractéristiques propres à l'endothélium cérébral.

1.3.2.c : Influence des cellules endothéliales sur les astrocytes.

En effet, les cellules endothéliales ont également une influence sur les astrocytes. Elles libèrent des cytokines qui induisent la prolifération des astrocytes (Estrada *et al.*, 1990), possèdent un effet chimiotactique envers les astrocytes (Cancilla *et al.*, 1990 ; Minikawa *et al.*, 1991) et jouent un rôle prépondérant dans la formation des OAPs (Orthogonal arrays of particules) (Tao-Cheng et Brightman, 1988 ; Tao-Cheng *et al.*, 1990). Ces particules présentent, *in vivo*, la même distribution que celle des sites de conductance aux ions potassium (Wolburg et Berg, 1988) et participent au maintien de l'homéostasie dans le cerveau.

Il existe donc des échanges réciproques entre les astrocytes et les cellules endothéliales de capillaires cérébraux qui s'avèrent indispensables à l'élaboration des propriétés de la BHE.

II.3.3. Conclusion

Si l'endothélium des capillaires cérébraux constitue le support anatomique de la BHE, l'ensemble de ces travaux souligne l'importance de l'environnement cérébral, et en particulier des astrocytes, lors de l'établissement de certaines des caractéristiques des cellules endothéliales d'origine cérébrale, notamment à l'établissement de l'une de ses grandes fonctions qui est de **restreindre les échanges entre les compartiments sanguins et cérébraux.**

II. 4. CONCLUSION

La présence de jonctions serrées et l'absence de fenestration empêchent tous phénomènes de diffusion entre les cellules endothéliales. De plus, la rareté des vésicules de pinocytose et l'existence de protéines capables de reconnaître, puis de dégrader ou d'expulser certaines molécules entrées dans la cellule endothéliale, permettent de restreindre activement les échanges entre le sang et le cerveau. Toutes ces caractéristiques, propres à l'endothélium des capillaires cérébraux sont induites et maintenues par la présence des cellules gliales et en particulier par les astrocytes.

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 également au niveau de l'endothélium cérébral qui restreint mais peut aussi réguler le passage des molécules entre le sang et le cerveau.

Comme la présence de jonctions serrées élimine l'espace paracellulaire et empêche toute diffusion de molécules entre les cellules endothéliales de capillaires cérébraux, pour passer du sang vers l'espace extracellulaire cérébral, toute substance devra franchir successivement la membrane luminale, le cytoplasme et la membrane abluminale de la cellule endothéliale. **Ce passage transcellulaire, très régulé, nécessite l'intervention de transporteurs et de récepteurs spécifiques.**

III. PERMEABILITE SELECTIVE DE LA BARRIERE HEMATO-ENCEPHALIQUE.

La pénétration d'une molécule à travers la BHE nécessite le plus souvent des systèmes de transport spécifiques. En effet, la diffusion passive est restreinte à quelques molécules de petites tailles, non ionisées, non liées aux protéines et possédant une bonne perméabilité pour franchir les membranes lipidiques endothéliales. C'est le cas du gaz carbonique, de l'oxygène ainsi que les substances très lipophiles, telles que la nicotine, l'éthanol, l'héroïne ; leur passage est alors uniquement gouverné par le gradient de concentration entre le sang et le liquide extracellulaire cérébral.

Les molécules plasmatiques, en majorité anioniques et hydrophiles, sont incapables de franchir la BHE par simple diffusion. Il existe donc à la surface des cellules endothéliales des **transporteurs et des récepteurs spécifiques**, exprimés face luminale et/ou abluminale de la cellule, qui permettent les échanges nécessaires entre les compartiments sanguin et cérébral.

III. 1. LE TRANSPORT DES IONS, DU GLUCOSE ET DES ACIDES AMINES.

Le transport des ions, du glucose et des acides aminés, molécules hydrophiles et de haut poids moléculaire, nécessite l'intervention d'un **transporteur protéique spécifique**. Intégré dans la membrane plasmique de la cellule endothéliale, il facilite les échanges entre le sang et le cerveau ou participe activement au transport des molécules au travers de la BHE.

III. 1. 1. Le transport des ions

La perméabilité de la BHE pour la plupart des ions monovalents (Na^+ , Cl^- , K^+) est faible (Smith et Rapoport, 1986). Toutefois, il existe un transport net de Na^+Cl^- et d'eau à travers la BHE, du sang vers le cerveau (Betz, 1983) et un transport net de K^+ dans le sens inverse, i.e. du cerveau vers le sang (Hansen *et al.*, 1977).

En effet, les ions K^+ jouent un rôle important dans la transmission de l'influx nerveux. Leur concentration dans le liquide interstitiel cérébral doit rester constante (2.8mM, Bradbury et Kleeman, 1967), alors qu'elle peut varier dans le sang (3 à 5mM).

Une des fonctions majeures de la BHE est donc de réguler la concentration en K^+ dans le liquide céphalo-rachidien en l'expulsant activement vers le sang (Katzman, 1976). Bradbury et Stulcova (1970) ont montré que l'efflux de K^+ vers le sang se fait par un système de transport saturable. Ce transporteur est inhibé par l'ouabaïne ; il s'agirait donc d'une **Na/K ATPase** (Goldstein, 1979 ; Eisenberg et Suddith, 1979). Localisée majoritairement face abluminale des cellules endothéliales (Betz *et al.*, 1980), cette protéine n'est pas absente de la face luminale (Vorbordt *et al.*, 1982) mais son activité y est plus faible (Spatz, 1984). Cette répartition asymétrique de la protéine serait induite par les cellules gliales et notamment par les astrocytes (Beck *et al.*, 1986).

Amenés dans la cellule endothéliale par cette Na/K ATPase, les ions K^+ peuvent atteindre le compartiment sanguin en empruntant des canaux potassiques (Vigne *et al.*, 1989). (Figure14).

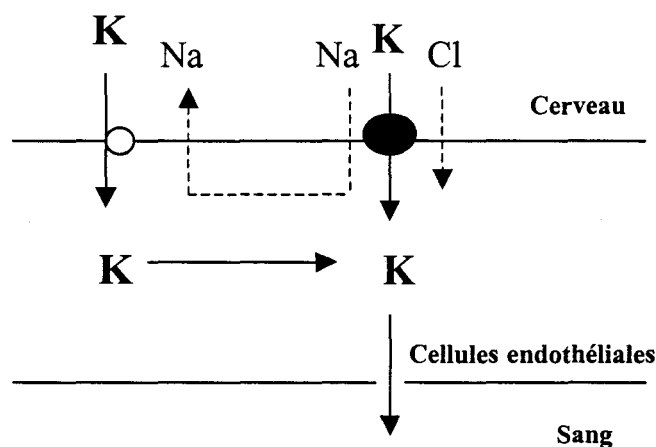


Figure 14: Modèle de sécrétion des ions K^+ au niveau de la BHE. (d'après Vigne *et al.*, 1994)

Toutefois, l'activité de la Na/K ATPase est également couplée à celle d'un canal localisé face abluminale des cellules qui, en recyclant une partie des ions K^+ vers le cerveau, limite ainsi leur sécrétion vers le sang (Hoyer *et al.*, 1991).

L'activité de la Na/K ATPase va nécessiter l'entrée d'ions Na^+ des cellules endothéliales. A ce jour, 2 systèmes de transport des ions Na^+ ont été décrits :

- un **canal Na^+/H^+** inhibé par l'amiloride et probablement équivalent aux canaux sodiques des cellules épithéliales (Betz, 1983 ; Ennis *et al.*, 1996 ; Vigne *et al.*, 1989). L'influx de Na^+ suggère que ce transporteur soit présent au moins face luminale des cellules endothéliales.

- un système de **cotransport $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$** mis en évidence, *in vitro*, par O'Donnel *et al.* en 1995. Leurs travaux montrent que cette activité est induite et/ou maintenue par les astrocytes. Sa localisation n'est pas clairement définie. De plus, son expression est controversée puisque ce système n'est pas détecté *in vivo* (Ennis *et al.*, 1996).

Ainsi, le Na^+ pénètre dans la cellule suivant un gradient de concentration par l'intermédiaire des ces transporteurs. La Na/K ATPase va transporter activement le Na^+ du cytoplasme de la cellule vers le liquide interstitiel cérébral. Notons que cette activité va entraîner la création d'un gradient de Na^+ qui permettra le transport des acides aminés par les systèmes A, ASC et N (Betz et Goldstein, 1978).

L'anion Cl^- va permettre de maintenir la neutralité (Smith et Rapoport, 1984) tandis que l'eau suit le flux net de Na^+Cl^- du sang vers le cerveau, maintenant ainsi l'isotonicité. Même si le transport des ions Cl^- est saturable, on ne sait toujours pas aujourd'hui si le mouvement de cet ion s'effectue par voie transcellulaire ou paracellulaire. A l'inverse des ions K^+ , les concentrations des ions Na^+ et Cl^- ne sont pas régulées. Ceci reflète l'incapacité du cerveau, à long terme, de maintenir un gradient osmotique entre lui-même et le sang, et indique que tout mouvement d'ions Na^+ et Cl^- à travers la BHE va entraîner un mouvement net d'eau.

Une distribution asymétrique de canaux ioniques entre les faces luminale et abluminale des cellules ajoutée à l'expression d'une Na/K ATPase sont considérées comme les structures de base du transport des ions à travers les épithélia (Gögelein, 1990). Un mécanisme similaire doit être mis en place pour le transport polarisé des ions

à travers la BHE. Alors qu'il est clairement établi qu'une répartition abluminale préférentielle existe pour la Na^+/K^+ ATPase exprimée par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux, une distribution asymétrique des canaux ioniques n'est toujours pas clairement définie. Toutefois, leur activité semble soumise à une régulation qui permet d'ajuster le mécanisme de sécrétion des ions K^+ à l'activité neuronale (Vigne *et al.*, 1994 ; 1995 ; Van Renterghem *et al.*, 1995 ; Kawai *et al.*, 1997).

III. 1. 2. Le transport du glucose

Le glucose est la source d'énergie principale des cellules nerveuses (Hawkins et Mans, 1983). Au niveau du parenchyme cérébral, Cremer *et al.* (1981) montrent que 65 % du glucose est renouvelé chaque minute. Sachant que le cerveau ne présente pas de capacité de stockage suffisante, cette forte consommation nécessite un apport énergétique constant.

Crone (1965) fut le premier à émettre l'hypothèse de l'existence d'un système de transport du glucose à travers la BHE. Ce transport est saturable, stéréospécifique et indépendant de l'énergie ou des gradients ioniques (Betz *et al.*, 1976, Pardridge 1983). Différentes isoformes de transporteurs ont été décrites mais seule l'isoforme GLUT 1 serait exprimée au niveau de la BHE (Pardridge *et al.*, 1990a). Son expression y est élevée puisqu'elle peut représenter jusqu'à 5% du taux de protéines membranaires totales.

Cette protéine est présente à la fois sur les faces luminale et abluminale des cellules endothéliales (Betz *et al.*, 1979). Selon Farrell et Pardridge (1991), sa distribution serait asymétrique, le nombre de transporteurs situés sur la face abluminale des cellules étant supérieur à celui de la face luminale (Figure 15). Cette dissymétrie permettrait aux molécules de glucose ayant pénétrées dans les cellules endothéliales d'arriver rapidement vers les fluides baignant les neurones et les cellules gliales. Toutefois cette répartition est controversée; certaines études décrivent en effet, une distribution symétrique des transporteurs du glucose au niveau de la BHE (Gerhart *et al.*, 1989 ; Lee *et al.*, 1997).

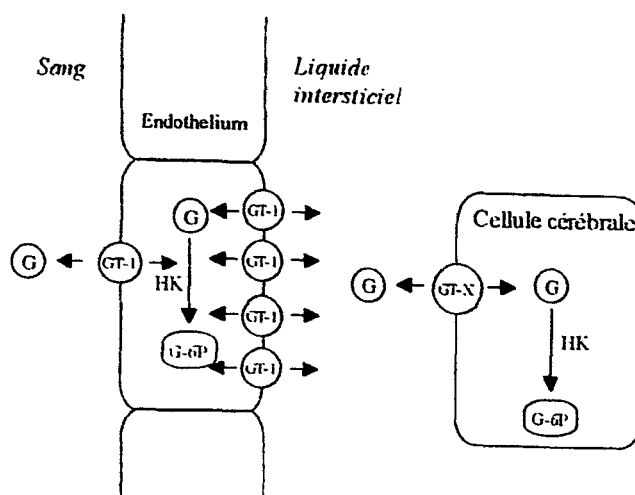


Figure 15: Transport et métabolisme du glucose au niveau de la BHE (d'après Pardridge, 1993). G : glucose ; GT-1 : transporteur du glucose de type 1 (GLUT 1) ; G-6P : glucose 6-phosphatase ; HK : Hexokinase ; ISF : Fluides interstitiels ; GT-X : transporteurs du glucose présents au niveau des neurones et des astrocytes.

L'expression du transporteur de glucose GLUT1 au niveau de l'endothélium cérébral est une des caractéristiques de la BHE. Son expression est régulée. Cette régulation met en jeu divers mécanismes qui agiront à différents niveaux et notamment sur la transcription du gène. En effet, la glycémie plasmatique va réguler le taux d'ARNm codant pour la protéine GLUT1 au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux (Boado et Pardridge, 1991 , 1993) Ainsi, le transport du glucose à travers la BHE sera fonction de son taux plasmatique (Harik et La Manna, 1988 ; Duckrow, 1988 ; Pardridge *et al.*, 1990b).

De plus, il a été démontré *in vitro* que l'expression du transporteur du glucose au niveau des cellules endothéliales peut être augmentée après incubation de ces cellules en présence d'homogénats de cerveau, indiquant que des facteurs cérébraux sont capables de moduler l'expression de ce transporteur au niveau de la BHE (Boado *et al.*, 1994 ; Boado *et al.*, 1995). La présence des pieds astrocytaires au voisinage des cellules endothéliales laisse supposer que ces facteurs aient une origine astrocytaire. Aucune étude à ce jour ne permet de déterminer si cette augmentation de l'expression du transporteur est due à une augmentation de sa synthèse ou à un recrutement de transporteurs préexistants.

En effet, une quantité non négligeable (18-45%) des protéines GLUT 1 totales a été détectée dans divers compartiments cytoplasmiques des cellules endothéliales. Ces protéines cytoplasmiques pourraient représenter une forme de stockage du transporteur qui serait exprimé en surface en réponse à un signal chimique externe. Un tel mécanisme permettrait d'augmenter localement le transport du glucose à travers la BHE lors d'une augmentation de sa consommation consécutive à une activation neuronale. Cette hypothèse reste aujourd'hui à confirmer.

III.1.3. Transport des acides aminés neutres

Les acides aminés sont essentiels pour la synthèse cérébrale des protéines et des neuromédiateurs. Classiquement, on distingue trois grands groupes de systèmes de transport : celui des acides aminés neutres, des acides aminés acides et enfin, celui des acides aminés basiques. **Les plus connus sont ceux des acides aminés neutres.** Parmi ces derniers, sont décrits :

III.1. 3. a. Un système de transport sodium-indépendant : Le système L.

Le **système L (L pour leucine)** permet le passage des acides aminés neutres de haut poids moléculaire et notamment des acides aminés essentiels tels que la phénylalanine, la méthionine, l'histidine, la tyrosine, le tryptophane, la leucine, l'isoleucine et les précurseurs des neurotransmetteurs (DOPA et α -hydroxytryptophane). Ces précurseurs (DOPA et α -hydroxytryptophane) seront transformés, dans les cellules endothéliales, par la décarboxylase des acides aminés aromatiques respectivement en dopamine et sérotonine où elles seront dégradées par la MAO empêchant ainsi leur pénétration dans le parenchyme cérébral.

Le transporteur, exprimé à la fois face luminale et abluminale des cellules endothéliales, est symétrique puisqu'il transporte les acides aminés dans le sens sang-cerveau, mais aussi cerveau-sang (Betz et Goldstein, 1978) (Figure 16).

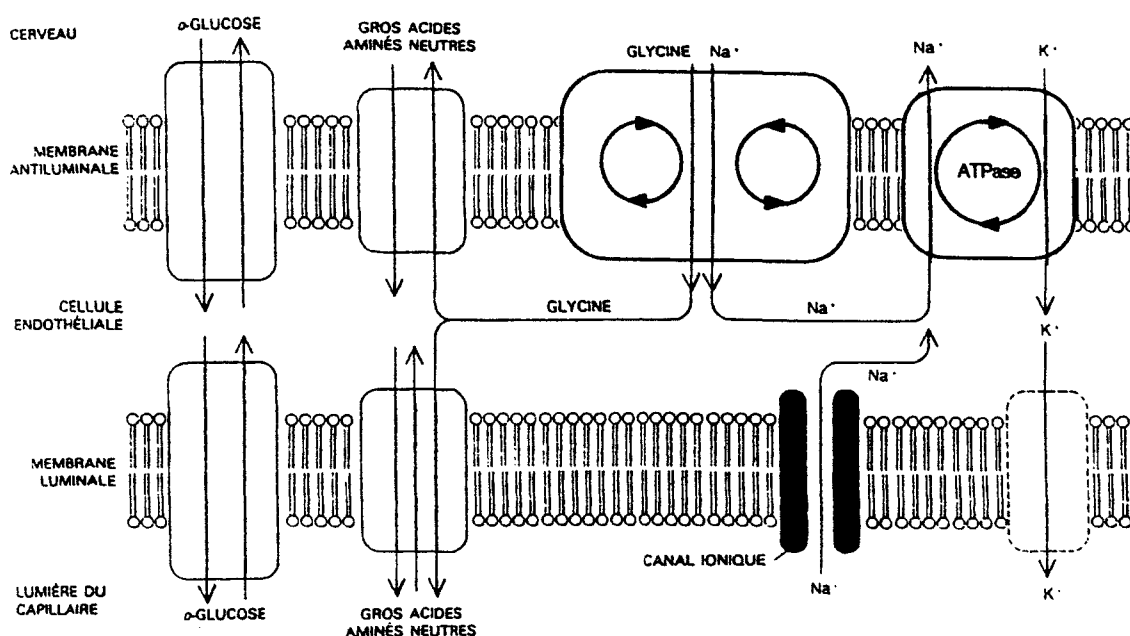


Figure 16: Transport des acides aminés neutres. (Système A et L, d'après Goldstein et Betz, 1986).

Comme il n'existe qu'un seul type de récepteur pour un grand nombre d'acides aminés, l'influx cérébral d'un acide aminé donné sera déterminé par sa concentration plasmatique et son affinité pour le transporteur, mais aussi par la concentration plasmatique et l'affinité pour ce même récepteur des autres acides aminés neutres (Pardridge, 1977). Ainsi, chez les malades atteints de phénylcétonurie, l'accumulation dans la circulation générale de phénylalanine limite, par inhibition compétitive, le transport des autres acides aminés vers le cerveau, provoquant de graves carences chez les jeunes enfants.

III.1.3.b.Des systèmes de transport sodium-dépendants : les systèmes A, ASC et N.

Ces systèmes sont exclusivement localisés face abluminale des cellules endothéliales (Betz et Goldstein, 1978 ; Tayarani *et al.*, 1987a ; Lee *et al.*, 1998) et permettent le transport des acides aminés uniquement dans le sens cerveau-sang. Ce

transport se fait contre un gradient de concentration et nécessite donc de l'énergie. Cette énergie est fournie par le déplacement des ions sodium du cerveau dans les cellules endothéliales.

Le **système A (A pour alanine)** est spécifique du transport des acides aminés neutres de faible poids moléculaire comme la glycine ou l'alanine. Une fois dans la cellule, ces acides aminés passeraient dans le sang probablement par l'intermédiaire du système L (Goldstein et Betz, 1986 ; Figure 16). La glycine étant un neuromédiateur inhibiteur de l'activité neuronale, sa concentration au voisinage des cellules nerveuses doit rester inférieure à sa concentration plasmatique.

L'existence du **système ASC (ASC pour alanine, sérine, cystéine)** est controversée. Tayarani *et al.* (1987b) sont en faveur de la présence de ce système face abluminale des cellules endothéliales, tandis que Sanchez del Pino *et al.* (1995) ne l'ont pas détecté.

Le **système N** présente une spécificité élevée pour les acides aminés neutres possédant un groupement azote comme la glutamine et l'asparagine (Kilberg *et al.*, 1993). Une étude récente (Lee *et al.*, 1998) met en évidence l'existence de ce système au niveau de la face abluminale des cellules endothéliales cérébrales (Figure 17).

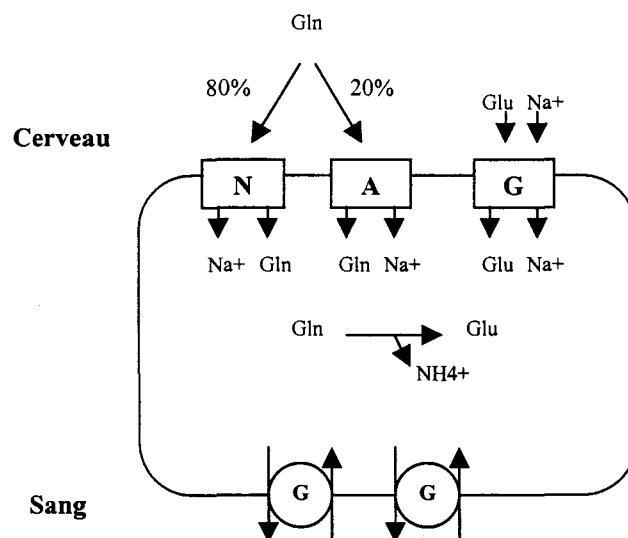


Figure 17 : Transport de la glutamine (d'après Lee *et al.*, 1998). Gln : glutamine ; Glu : glutamate ; Glnase : glutaminase ; A : système A Na^+ -dépendant ; N : système N Na^+ -dépendant ; G : transporteur du glutamate Na^+ -dépendant.

Ainsi, les cellules endothéliales des capillaires cérébraux expriment à leur surface des transporteurs spécifiques pour les molécules de faible poids moléculaire. L'existence de récepteurs spécifiques permettant le transport de molécules de haut poids moléculaire a également été démontrée.

III.2. LE TRANSPORT DES PEPTIDES ET PROTEINES.

III.2.1. Le transport de l'insuline.

Van Houten et Posner (1979), Frank et Pardridge (1981) ont mis en évidence le récepteur de l'insuline au niveau des membranes lumenale et abluminal des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Toutefois, Miller *et al.* (1994) montrent, sur des cellules de capillaires cérébraux de bœuf, que seul le récepteur exprimé face apicale présente une haute affinité pour l'insuline. Ce récepteur permet le transport de l'insuline du sang vers le cerveau (Pardridge *et al.*, 1985 ; Duffy *et al.*, 1986 ; Frank *et al.*, 1986).

Lund-Andersen (1979) a montré que l'insuline n'a aucune incidence sur le transport du glucose à travers la BHE. Elle jouerait un rôle dans le développement du cerveau et notamment dans la maturation neuronale (Sara *et al.*, 1983 ; Puro et Agardh, 1984). Ceci expliquerait les taux d'insuline cérébraux plus élevés chez le nouveau-né que chez l'adulte ainsi que le nombre de récepteur trois fois plus important dans les capillaires cérébraux (Frank *et al.*, 1985). De plus, Pardridge (1986) a montré qu'une déficience en récepteur à l'insuline chez les enfants s'accompagne toujours d'un retard mental.

III.2.2. Le transport des facteurs de croissance « insulin-like » (IGF-I et II).

Les IGFs sont des polypeptides d'environ 7kDa de structure voisine de l'insuline. Leur rôle au niveau du cerveau n'est pas encore défini, mais il semblerait qu'ils interviennent lors du développement cérébral. En effet, Sara *et al.* (1981) ont montré que dans certains cas de déficiences mentales (Syndrome de Down), les taux en IGFs sont faibles. La présence d'ARNm codant pour les IGF-I et les IGF-II au niveau cérébral (Werther *et al.*, 1990) indique que ces peptides y sont synthétisés. La synthèse

de l'IGF-II au niveau des plexus choroïdes expliquerait sa présence dans le LCR (Tseng *et al.*, 1989).

Toutefois Frank *et al.* (1986) montrent l'existence d'une fixation et d'une internalisation des IGFs au niveau des capillaires cérébraux, suggérant que ceux-ci puissent être transportés du sang vers le cerveau. Le taux d'internalisation de l'IGF-II est plus important que celui de l'IGF-I. Chez le rat et le bœuf, les récepteurs décrits au niveau des capillaires cérébraux sont les récepteurs de type I et II décrits dans le reste de l'organisme (Rosenfeld *et al.*, 1987). Chez l'homme, les capillaires cérébraux ne présentent qu'un seul type de récepteurs pour les deux types d'IGFs (Duffy *et al.*, 1988)

III.2.3. Le transport de la transferrine.

Pollitt et Leibel (1982) ont décrit l'importance du fer pour le fonctionnement du SNC. Le fer circule dans le sang lié à la transferrine, (une glycoprotéine de 80 kDa) qui le distribue à tous les tissus de l'organisme. Jefferies *et al.* (1984) ont mis en évidence la présence d'un nombre important de récepteurs de la transferrine au niveau des capillaires cérébraux par rapport aux lits vasculaires des autres organes. Cette observation suggère que le récepteur de la transferrine soit impliqué dans le transport du fer du sang vers le parenchyme cérébral.

Le mécanisme par lequel la majorité des cellules de l'organisme s'approvisionnent en fer a été décrit par Dautry-Varsat *et al.* (1983, Figure 18).

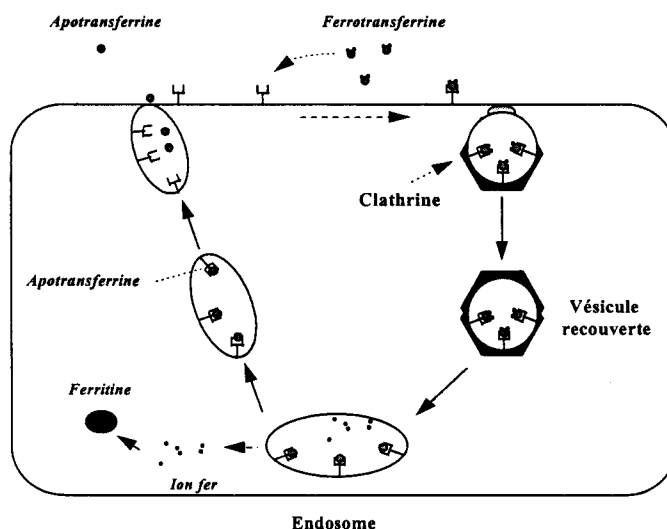


Figure 18 : Endocytose de la sérotransferrine et recyclage de son récepteur (d'après Dautry-Varsat *et al.*, 1983).

Dans un premier temps, la transferrine diférique se fixe à son récepteur. Ce dernier est localisé dans des vésicules recouvertes de clathrine ou "coated-pits". Le complexe transferrine-récepteur est ensuite endocyté et la vésicule d'endocytose fusionne avec un compartiment acide pour former un endosome. A pH acide, le fer possède une faible affinité pour la transferrine et est libéré dans la cellule. A ce niveau, celui-ci peut-être utilisé ou stocké sous forme de complexe avec la ferritine. L'apotransferrine (transferrine non saturée en fer) qui possède une très forte affinité pour son récepteur à pH acide reste fixée à celui-ci dans les vésicules acides et est recyclée vers la surface de la cellule. A pH neutre, l'affinité de l'apotransferrine pour son récepteur est faible, entraînant la dissociation du complexe apotransferrine-récepteur et la libération de la transferrine dans la circulation sanguine.

Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer la façon dont le fer passe du sang vers le SNC (Figure 19). En effet, la transferrine endocytée doit non seulement fournir le fer nécessaire au métabolisme de la cellule endothéliale mais surtout aux cellules du SNC.

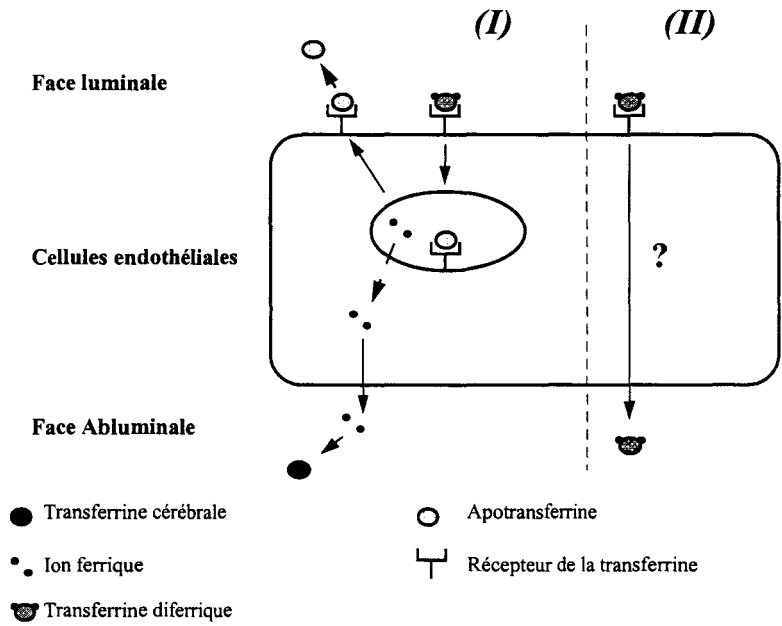


Figure 19: Hypothèses de transport du fer au niveau de la BHE.

Hypothèse (I) : De nombreuses études réalisées *in vivo* (Taylor et Morgan, 1990 ; Roberts *et al.*, 1993; Morris *et al.*, 1992; Ueda *et al.*, 1993) ont montré qu'après injection de la transferrine par voie intraveineuse, la majorité est soit recyclée vers la circulation sanguine, soit rapidement catabolisée. Seul le fer est retrouvé au niveau du parenchyme cérébral. A ce niveau, il serait pris en charge par la transferrine synthétisée au niveau du cerveau et plus particulièrement par les plexus choroïdes (Aldred *et al.*, 1987 ; Mollgard et Baslev, 1989), les oligodendrocytes (Bloch *et al.*, 1985 ; Espinosa *et al.*, 1990) ou les astrocytes et les neurones (Espinosa *et al.*, 1990). Ces résultats sont en accord avec ceux de Raub et Newton (1991) qui ont réalisé des études *in vitro* sur des cellules endothéliales de microvaisseaux cultivées sur filtre.

Hypothèse (II) : Au contraire, d'autres études réalisées *in vivo* ont montré que l'endocytose de la transferrine par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux est suivie d'une transcytose (Fishman *et al.*, 1987 ; Broadwell *et al.*, 1994). De la même façon, Pardridge *et al.* (1991) ont montré que l'anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de la transferrine : l'OX-26, est retrouvé au sein du parenchyme cérébral après injection par voie intraveineuse. Cet anticorps atteint le cerveau de façon sélective comparé à d'autres organes tels que les reins, le cœur ou les poumons. Des résultats similaires ont été obtenus par Friden *et al.* (1991, 1993), Yoshikawa et Pardridge (1992) qui ont utilisé l'OX-26 couplé à différentes molécules actives telles que le méthotrexate ou le facteur de croissance neuronal (NGF : "nerve-growth factor"). De récentes études réalisées *in vitro* montrent que l'endothélium des capillaires cérébraux permet le transport du fer et de la transferrine du sang vers le SNC par un mécanisme dépendant d'un récepteur (Descamps *et al.*, 1996). En effet, 75% de la transferrine endocytée par la cellule atteint le parenchyme cérébral. Ainsi, la majeure partie du fer endocyté par la cellule ne serait pas destinée à sa propre utilisation mais à celle des cellules du SNC.

III. 3. LE TRANSPORT DES LIPIDES

Le cerveau est l'organe le plus riche en lipides après le tissu adipeux (O'Brien et Sampson, 1965) ; cette richesse est accompagnée d'une diversité de composition lipidique rarement retrouvée dans les autres tissus. Ces lipides sont essentiellement structuraux et participent à l'architecture des membranes, donc à leur bon fonctionnement.

III. 3. 1 Le transport des acides gras polyinsaturés.

Le cerveau contient des proportions élevées d'acides gras polyinsaturés (AGPI) tels que l'acide arachidonique (20 :4n-6) et l'acide docohexaénoïque (22 :6n-3) mais seulement de faibles quantités de leurs précurseurs respectifs, l'acide linoléique (18 :2n-6) et l'acide linolénique (18 :3n-3) (Sinclair et Crawford, 1972 ; Salem *et al.*, 1986 ; Martinez et Ballabriga, 1987 ; Bourre *et al.*, 1993). Si la présence du 20 :4n-6 peut aisément s'expliquer par son rôle important en tant que précurseur des eicosanoïdes, celle du 22 :6n-3 est moins bien comprise. Cependant une déficience en AGPI de la famille (n-3) lors du développement cérébral a été associée à des perturbations du comportement et de l'apprentissage chez le jeune animal et le nouveau-né (Neuringer *et al.*, 1986 ; Yamamoto *et al.*, 1987 ; Wainwright *et al.*, 1991 ; Makrides *et al.*, 1996) donnant ainsi une signification biologique à l'abondance de ces acides gras, et en particulier au 22 :6n-3, dans le cerveau.

Bien que le caractère essentiel du 20 : 4n-6 et du 22 :6n-3 pour le système nerveux central soit admis, les mécanismes responsables de leur accumulation sélective dans le cerveau sont encore inconnus. Outre la capacité du cerveau en développement à synthétiser les AGPI à longue chaîne (Moore *et al.*, 1990 ; 1991 ; Innis, 1991 ; Green et Yavin, 1993 ; Pawlosky *et al.*, 1996), cet organe peut en capter à partir de la circulation, soit apportés directement par l'alimentation (Sinclair, 1975), soit synthétisés par le foie (Scott et Bazan, 1989). Différentes formes d'apport d'acides gras insaturés ont été rapportées : **sous forme libre liés à l'albumine** (Dhopeshwarkar et Mead, 1973) ou à l' α -fetoprotéine (Uriel *et al.*, 1987), **sous forme de triglycérides dans les chylomicrons** (Anderson *et al.*, 1994) ou bien encore **estérifiés dans les lysophosphatidylcholines (lysoPC)** (Thiès *et al.*, 1992 ; 1994). Même si l'importance relative de ces formes

d'apport dans les conditions physiologiques reste à déterminer, nous ne développerons ici que le transport des AGPI non estérifiés et estérifiés sous forme de lysoPC constituant les deux formes les plus étudiées au niveau de la BHE.

III.3.1.a. Le transport des acides gras polyinsaturés non estérifiés.

La majorité des AG non estérifiés circulant dans le plasma sanguin est complexée à l'albumine. Le mécanisme de translocation des AG à travers la membrane plasmique est controversé. Certains pensent qu'il s'agit d'un processus physico-chimique, purement passif; d'autres sont en faveur d'un mécanisme facilité dépendant de protéines de liaison et de transport spécialisées.

Premier concept : la diffusion simple.

La lipophilie des AG à longue chaîne est à l'origine du concept de leur diffusion passive à travers les membranes cellulaires (Kulh et Spector, 1970). A la différence de substances polaires telles que les ions ou les sucres, les AG sont apolaires. Ils sont peu solubles dans l'eau et donc faiblement hydratés. Ils se dissolvent rapidement dans la partie apolaire des membranes (Noy *et al.*, 1986 ; Spooner *et al.*, 1990) et se répartissent entre les formes micellaires et les membranes biologiques. L'idée d'une entrée spontanée des AG dans les membranes, indépendante de systèmes de transports biologiques, émane donc des propriétés physico-chimiques des AG, des régions lipidiques membranaires et de l'eau (pour revue Zakim, 1996).

Ce concept de diffusion simple des AG à travers les membranes cellulaires (très généralement admis) est actuellement contesté.

Deuxième concept : un processus facilité.

La controverse provient de la mise en évidence d'une captation des AG par les cellules. Celle-ci serait, dans divers types cellulaires, rapide et saturable (Turcotte *et al.*, 1991 ; Reuter *et al.*, 1993 ; Zhou *et al.*, 1994), compétitive (Abumrad *et al.*, 1984 ; Sorrentino *et al.*, 1996 ; Stremmel et Gunnawan, 1998), réduite par dénaturation préalable des cellules par la chaleur (Campbell *et al.*, 1994 ; Stremmel et Gunnawan, 1998) ou par traitement des membranes à la trypsine (Stremmel, 1988 ; Schoeller *et al.*, 1995). Elle est également le fait de l'identification de protéines présentant une forte

affinité pour les AG à longue chaîne. Parmi les cinq nouvelles protéines décrites, deux sont exprimées au niveau cérébral.

Dans le cerveau qui exprime plusieurs **FABP (Fatty Acid-Binding Protein)** », une nouvelle protéine de cette famille a été caractérisée et nommée : **brain lipid-binding protein (BLBP)** (Kurtz *et al.*, 1994). Cette protéine présente une affinité spécifique pour les AGPI, particulièrement pour le 22 :6n-3 dont l'affinité ($K_d = 10\text{nM}$) est la plus élevée jamais décrite pour une FABP (Xu *et al.*, 1996).

Schaffer et Lodish (1994) ont isolé un gène qui, lorsqu'il est exprimé dans les cellules, augmente le taux de captation des AG. Le produit du gène, « **Fatty Acid Transport Protein** » (**FATP**) est un polypeptide de 63kDa localisé dans la membrane plasmique. Cette protéine fortement exprimée dans les muscles squelettiques, le cœur et le tissu adipeux a été détectée dans le cerveau. Elle est exprimée dans diverses parties du cerveau au cours de l'embryogénèse cérébrale et durant la période postnatale (Utsunomiya *et al.*, 1997).

Ces différentes protéines de liaison aux AG, seraient impliquées dans la captation cellulaire des AG à longue chaîne à travers la BHE.

La BHE pourrait jouer un rôle majeur non seulement en contrôlant le passage des AGPI vers le cerveau mais aussi en convertissant le 18 :2n-6 et le 18 :3n-3 plasmatiques respectivement en 20 :4n-6 et 22 :6n-3 (Moore, 1993 ; 1994) En effet, les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux sont riches en 20 :4n-6 et 22 :6n-3 (Selivonchick et Roots, 1977 ; Tayarani *et al.*, 1987a ; Grandgirard *et al.*, 1994). De plus, le contenu en 20 :4n-6 et 22 :6n-3 des cellules endothéliales de capillaires cérébraux est augmenté si elles sont cultivées en présence d'astrocytes (Bénistant *et al.*, 1995). De ces observations émanent les interrogations sur la capacité des cellules endothéliales à convertir les deux acides gras essentiels précurseurs ainsi que sur le type de coopération entre les cellules endothéliales et les astrocytes. Delton-Vandenbroucke *et al.* (1997) démontrent que des cellules de microvaisseaux de cerveau de rat sont capables *in vitro* de synthétiser du 20 :4n-6 et du 22:6n-3 à partir de leurs précurseurs respectifs. Selon Moore *et al.* (1990), les cellules endothéliales de microvaisseaux cérébraux murins seraient capables de synthétiser du 22 :4n-6 et du 22 :5n-3 à partir de leurs précurseurs, mais ne produiraient pas 22 :6n-3. En effet, les astrocytes doivent préalablement convertir le 22 :5n-3 en 22 :6n-3. Bernoud *et al.* (1998) présentent des résultats intermédiaires démontrant que les cellules endothéliales de capillaires cérébraux de bœuf sont capables

de former du 22 :6n-3 et du 24 :6n-3 seulement en faibles proportions. Toutefois le contenu en 20 :4n-6 et 22 :6n-3 des cellules endothéliales dépend principalement de la synthèse et de la sécrétion par les astrocytes de ces acides gras polyinsaturés, soit sous forme non estérifiée, soit sous forme estérifiée dans les phospholipides.(essentiellement dans les phosphatidylcholines et les lysophosphatidylcholines). Ces résultats sont en accord avec les observations de Moore (1993 ; 1994) relatant l'existence d'une coopération cellulaire au niveau de la BHE.

III.3.2. Le transport des acides gras polyinsaturés estérifiés : les lysophosphatidylcholines.

Les **lysophosphatidylcholines (lysoPC)** sont formées, au niveau du foie, par hydrolyse des phosphatidylcholines. Dans les cellules animales, la quantité de lysoPC est très faible, représentant moins de 2% des phospholipides totaux des membranes du foie de rat et de la plupart des autres tissus. En effet, ce sont des détergents puissants pouvant être à l'origine d'effets néfastes sur un certain nombre de fonctions cellulaires (Sobel *et al.*, 1978 ; Ammon *et al.*, 1983 ; Neiderhiser *et al.*, 1983). Inversement, dans le plasma, les lysoPC sont liées principalement à l'albumine (Switzer et Eder, 1965) ou aux lipoprotéines (Portman et Illingworth, 1973) ; ainsi, elles ne causent pas de préjudice aux cellules et sont présentes en proportion relativement importante.

La captation et la métabolisation de lysoPC plasmatiques par le cerveau ont été décrites par Illingworth et Portman (1972) chez le singe écureuil. Approximativement 70% des lysoPC sécrétées par le foie sont captées et acylées directement en PC. Cette voie métabolique est donc prédominante dans le cerveau. Ces travaux sont confirmés par Brossard *et al.* (1996) et Croset *et al.* (1996) qui montrent que **les lysoPC constituent la forme d'apport lipidique à plus long terme pour le cerveau.**

Thiès *et al.* (1992 ; 1994) ont montré chez le rat âgé de 20 jours que, bien que la concentration plasmatique des lysoPC insaturées liées à l'albumine soit inférieure ou égale à celle des AG non estérifié, les pourcentages des 2-acyl-lysoPC retrouvés dans le cerveau sont plus élevés que ceux des AG non estérifiées correspondants. Comme pour les AG non estérifiés (Anderson et Connor, 1988), la captation des lysoPC par le cerveau augmente avec le degré d'insaturation de l'AG, les 22 :6 lysoPC étant les mieux

incorporés. Ces résultats ont pu être reproduits *in vitro* sur un modèle de coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux de bœuf et d'astrocytes de rat. En effet, en utilisant ce modèle, Bernoud *et al.* (1999) miment un passage préférentiel au cerveau des 22 :6-lysoPC par rapport au 22 :6n-3 non estérifié. De plus, ils affinent la perception des mécanismes qui pourraient être impliqués, montrant à la fois la préférence des astrocytes pour les lysoPC et la nécessité de la présence de molécules susceptibles d'accepter les lysoPC dans l'espace interstitiel situé entre les cellules endothéliales et les astrocytes.

La captation préférentielle des lysoPC insaturées n'est pas observée dans d'autres organes tels que le foie, le rein ou le cœur. Ces observations suggèrent donc que les lysoPC peuvent constituer une forme d'apport efficace d'AGPI au cerveau de rat en développement et qu'il pourrait exister un système de reconnaissance spécifique des lysoPC au niveau de cet organe.

Ainsi, les AGPI jouent un rôle essentiel dans le bon fonctionnement cérébral. D'autres lipides et notamment le **cholestérol** sont indispensables au maintien de l'homéostasie lipidique des cellules nerveuses. En effet, le cholestérol constitue 25% des lipides cérébraux. Comme les AGPI, il participe à l'élaboration des membranes cellulaires du système nerveux mais est l'un des principaux constituants des gaines de myéline. Bien qu'il possède les enzymes nécessaires à la synthèse du cholestérol, le cerveau a, tout comme nous l'avons vu pour les AGPI, besoin d'un apport plasmatique de ce composé. Dans le plasma, le cholestérol 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.

III.2. Le transport des lipoprotéines de basse densité (LDL)

Il existe peu d'informations concernant le transport des lipoprotéines à travers la BHE. Cependant quelques travaux démontrent une captation cérébrale de molécules associées aux LDL mais ces résultats sont contradictoires. En effet, Pardridge et Mietus (1980) remarquent que l'association de cholestérol marqué aux lipoprotéines 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).

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'à l'inverse 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 post-mortem de LDL marquées à l'iode ¹²⁵ dans la circulation cérébrale du bœuf, la radioactivité est associée aux capillaires. Elle décroît en présence d'excès 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 a permis de confirmer les résultats obtenus *in vivo* et de caractériser plus précisément ce récepteur. Le récepteur apo(B,E) des cellules endothéliales de capillaires cérébraux de bœuf présente les mêmes caractéristiques que le récepteur apo(B,E) des fibroblastes humains (Méresse *et al.*, 1989).

De plus, lorsque ces cellules endothéliales sont cocultivées avec des astrocytes, l'expression de ce récepteur est trois fois plus élevée. Cette augmentation est encore plus importante lorsque les astrocytes ont été préalablement carencés en cholestérol (Dehouck *et al.*, 1994). Cette induction est liée à l'action d'un ou plusieurs facteurs solubles sécrétés par les astrocytes. La phase de coculture est nécessaire à l'expression de ce(s) facteur(s), suggérant l'existence d'une intercommunication entre les cellules endothéliales et les astrocytes.

Après fixation par la cellule, les LDL sont internalisées mais ne sont pas dégradées (Méresse *et al.*, 1991). Ainsi, le rôle du récepteur exprimé au niveau de l'endothélium cérébral aurait un rôle différent de celui des autres tissus. En effet, dans les autres tissus, il dirige les LDL vers les lysosomes où elles seront dégradées pour apporter le cholestérol et les acides aminés nécessaires à la croissance cellulaire.

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

III.4. CONCLUSION

L'entrée des substrats et nutriments indispensables au bon fonctionnement cérébral nécessite donc la présence de **transporteurs et de récepteurs spécifiques** au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Les nutriments apportés au cerveau font l'objet d'une sélection et leur concentration intracérébrale est régulée en permanence afin d'assurer le maintien de l'homéostasie cérébrale.

L'environnement cellulaire, et plus particulièrement les astrocytes jouent un rôle important dans l'élaboration et le maintien de la polarité des échanges entre les compartiments sanguin et cérébral. Ainsi, à l'inverse de l'endothélium de capillaires périphériques, les cellules endothéliales des capillaires cérébraux expriment à leur surface des récepteurs spécifiques dont la seule fonction serait d'apporter les nutriments indispensables au bon fonctionnement des cellules nerveuses sous-jacentes. Les transports de la transferrine et des LDL en sont de parfaits exemples : **les récepteurs exprimés face luminale des cellules endothéliales permettent l'endocytose et le transport de ces molécules plasmatiques du sang vers le cerveau**. Celles-ci, pour atteindre le parenchyme cérébral doivent être transportées de la face luminale vers la face abluminale des cellules. **Les structures cellulaires impliquées dans ces phénomènes ne sont pas encore clairement définies.**

IV. STRUCTURES CELLULAIRES IMPLIQUEES DANS LES TRANSPORTS SPECIFIQUES.

L'ensemble des processus impliqués dans les transports de molécules à travers les capillaires continus peut être schématisé de la manière suivante :

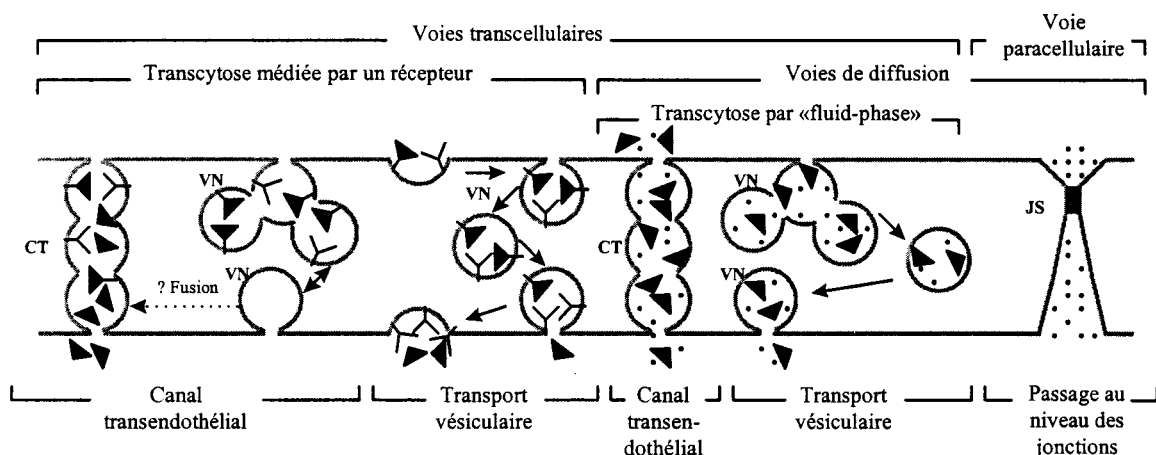


Figure 20 : Schéma représentant les différents processus de transports intervenant dans la perméabilité d'un capillaire continu. (D'après Schnitzer, 1993). (VN) vésicule non recouverte, (CT) canal transendothélial, (JS) jonction serrée.

Or, contrairement à ce qui est observé dans les organes périphériques, les échanges à travers les capillaires d'origine cérébrale sont plus restrictifs : les vésicules sont rares et les canaux transendothéliaux sont inexistants. Le transport par « fluid-phase » ainsi réduit, seuls les transports faisant intervenir des mécanismes spécifiques, tels que ceux dépendants de récepteurs auront lieu au niveau de la BHE (Figure 21).

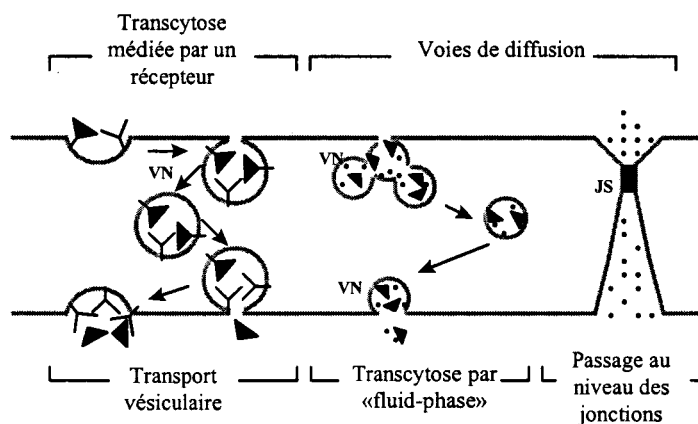


Figure 21 : Schéma représentant les différents processus intervenant dans la perméabilité d'un capillaire cérébral.

Ces transports spécifiques nécessitent la présence de récepteurs à la surface des cellules endothéliales. Ces récepteurs sont généralement regroupés dans des puits pour être endocytés dans des vésicules. Au moins deux types de vésicules possédant des morphologies différentes sont impliqués dans ces mécanismes d'endocytose. Parmi les plus étudiées sont décrites :

IV.1. LES VÉSICULES RECOUVERTES DE CLATHRINE.

Les **vésicules recouvertes de clathrine** sont de loin les plus connues et les mieux étudiées. Elles sont impliquées dans les transports de molécules dans la cellule par des mécanismes dépendants de récepteurs spécifiques (Figure 22).

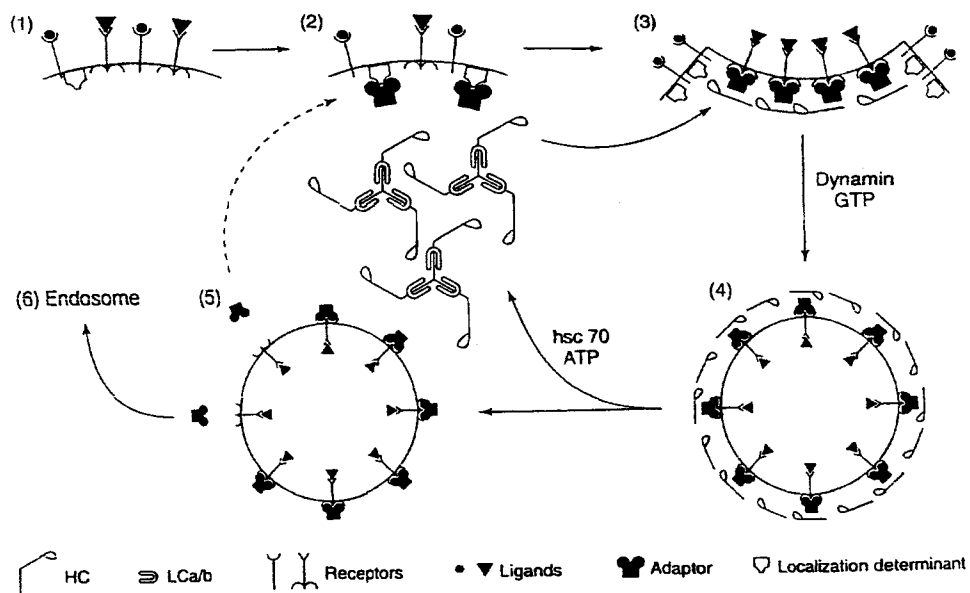


Figure 22: Assemblage et dissociation de vésicules recouvertes de clathrine au niveau de la membrane cellulaire lors d'une endocytose dépendante d'un récepteur. (D'après Brodsky, 1997)

La clathrine est un hémimère d'environ 650kDa constitué de trois chaînes lourdes et de trois chaînes légères qui s'assemblent spontanément en triskélions (Pauloin, 1991). Ceux-ci se disposent sur le versant cytoplasmique de la membrane plasmique (figure 22-2) et du réseau transgolgien. La clathrine est reliée au domaine cytoplasmique de nombreux récepteurs et de quelques autres protéines

transmembranaires par des complexes d'assemblage ou adaptines (figure 22-3)(AP2 sous la membrane plasmique et AP1 sur les bourgeons transgolgiens ; Sandoval et O'Bokke, 1994 ; Robinson, 1994). Après leur formation, les vésicules perdent rapidement leur clathrine sous l'effet d'une ATPase (figure 22-4) (Schlossman *et al.*, 1984). La clathrine et les adaptines sont alors recyclées vers la membrane plasmique et participent à la formation de nouvelles vésicules (figure 22-5). Cette vésicule dépourvue de manteau va alors fusionner avec un endosome (figure 22-6)

Les cellules de mammifères au repos possèdent environ 1000 à 3000 invaginations et vésicules endocytaires recouvertes de clathrine. Leur diamètre varie de 100 à 150 nm. Ainsi, le pourcentage de la membrane plasmique recouverte de clathrine a été estimé à 2% de sa surface totale. (Pauloin, 1991). Cependant, ce pourcentage varie selon le type cellulaire étudié.

En effet, contrairement à certains types cellulaires tels que les hépatocytes, **les endothélia de type continu** (Schnitzer *et al.*, 1994), mais aussi les fibroblastes (Bretscher et Whytock, 1977) et les cellules musculaires lisses (Forbes *et al.*, 1979) **renferment peu de vésicules recouvertes de clathrine**. A l'inverse, elles présentent un grand nombre de vésicules de diamètre 50-100nm, qui contrairement aux vésicules recouvertes de clathrine, ne présentent pas de manteau dense aux électrons mais sont caractérisées, en cryofracture, par la présence de filaments situés sur la face cytoplasmique des membranes qui forment des motifs d'apparence striée. Ces vésicules portent le nom de **cavéoles**.

IV.2. LES CAVEOLES.

Depuis quelques années une attention toute particulière s'est portée sur ces petites vésicules non recouvertes de clathrine appelées **cavéoles**. Bien que leur définition première ne soit que morphologique, les cavéoles sont aujourd'hui définies comme des invaginations de la membrane plasmique caractérisées par la présence d'un marqueur protéique spécifique : **la cavéoline (ou VIP21)** (Kurzchalia *et al.*, 1992 ; Glenney and Soppet, 1992).

IV.2.1. Structure des cavéoles

IV.2.1.a. Le rôle de la cavéoline-1

La cavéoline (ou VIP21), phosphoprotéine membranaire de 22kDa a été mise en évidence par Rothberg *et al.* en 1992. Puis, deux autres cavéolines ont été isolées : la caveoline-2 (Scherer *et al.*, 1996) et la caveoline-3 (Song *et al.*, 1996). La cavéoline a donc été renommée : **Cavéoline-1** (Scherer *et al.*, 1996 ; Tang *et al.*, 1996). Des travaux récents montrent que les 3 isoformes de la cavéoline sont exprimées au niveau cérébral. En effet, les cavéolines 1 et 2 seraient exprimées par les cellules endothéliales alors que la cavéoline-3 serait présente uniquement dans les cellules gliales (Ikezu *et al.*, 1998). Les cavéolines forment une famille de protéines intégrales présentant une structure inhabituelle en épingle à cheveu au sein de la membrane ; les extrémités N et C terminales étant toutes deux cytoplasmiques.

Bien que toutes impliquées dans la formation du manteau strié, la cavéoline-1 semble en être un composant essentiel. En effet, l'expression de la cavéoline 1 dans des adipocytes entraîne non seulement l'apparition de cavéoles invaginées mais aussi la présence du manteau strié (Fra *et al.*, 1995 ; Smart *et al.*, 1996). De plus, des travaux récents confirment ces résultats et montrent qu'exprimée dans les cellules épithéliales intestinales, la cavéoline-1 induit non seulement l'apparition de cavéoles invaginées mais que leur localisation est polarisée (Vogel *et al.*, 1998). Le rôle précis de la cavéoline-1 dans ce processus reste encore à définir.

Toutefois, certains auteurs montrent que la cavéoline-1 ne serait pas à elle seule responsable de la formation des cavéoles. En effet, la fixation du cholestérol membranaire grâce à des molécules comme la filipine (Rothberg *et al.*, 1992) ou la réduction du taux de cholestérol intracellulaire (Chang *et al.*, 1992) provoque à la fois, la dissociation du manteau et la disparition des cavéoles invaginées. Comme la cavéoline-1 apparaît être une protéine fixant le cholestérol (Murata *et al.*, 1995 ; Li *et al.*, 1996) et que le cholestérol stabilise les oligomères de cavéoline-1, **stérols et cavéoline-1 doivent agir ensemble pour former le manteau.**

Ainsi, la cavéoline-1 joue un rôle essentiel dans la formation des cavéoles et en est aujourd'hui le marqueur protéique de référence. A ce titre, elle a permis d'isoler les cavéoles par des techniques de fractionnement cellulaire et d'en définir ainsi la structure moléculaire.

IV.2.1.b Les Techniques de Purification des cavéoles

A ce jour, six méthodes ont été décrites pour purifier les cavéoles à partir de différents tissus (Jacobson *et al.*, 1992 ; Chang *et al.*, 1994 ; Lisanti *et al.*, 1994 ; Schnitzer *et al.*, 1995a ; Stan *et al.*, 1997 ; Wu *et al.*, 1997a) ou de cellules en culture (Sargiacomo *et al.*, 1993 ; Smart *et al.*, 1995 ; Song *et al.*, 1996). Ces méthodes peuvent se répartir en quatre catégories. La purification de fractions enrichies en cavéoles pouvant s'effectuer par :

- flottaison de membranes insolubles dans les détergents sur des gradients de saccharose (Sargiacomo *et al.*, 1993)
- flottaison de membranes rompues grâce à des ultrasons sur des gradients d'Optiprep. Cette méthode évite l'utilisation de détergents (Smart *et al.*, 1995).
- centrifugation différentielle d'homogénats de tissus (Chang *et al.*, 1994).
- récupération des cavéoles soit par centrifugation (Schnitzer *et al.*, 1995a) ou par immuno-adsorption (Stan *et al.*, 1997) à partir de membranes plasmiques de cellules endothéliales purifiées grâce à de la silice cationisée.

Les cavéoles obtenues par ces différentes techniques ne sont pas tout à fait identiques ; ceci parce qu'il n'existe aucune référence morphologique pour juger de leur

pureté. En effet, si le manteau strié est visible dans certaines préparations, il est souvent difficile à reconnaître. De plus, la cavéoline-1 ne semble pas être le témoin idéal de la pureté de la fraction car sa concentration au sein des cavéoles est variable. Enfin, l'utilisation de processus chimiques ou physiques lors de la purification (silice cationisée, Triton X-100, sonication, immunoabsorption) peut altérer la composition moléculaire des cavéoles, rendant difficile la comparaison des résultats entre les différents laboratoires. La localisation des protéines ancrées par GPI (glycosylphosphatidylinositol), toujours controversée, en est un parfait exemple.

En effet, alors que des études de microscopie électronique montrent clairement que **des protéines ancrées par GPI**, comme la phosphatase alcaline, sont groupées à la fois en surface et dans les cavéoles invaginées (Ide et Saito, 1980 ; Latker *et al.*, 1987 ; Kobayashi et Robinson, 1991), les résultats obtenus par des techniques d'immunocytochimie, divergent : ces protéines seraient groupées ou distribuées de manière diffuse selon, le premier anticorps utilisé (Jemmerson et Agre, 1987), l'utilisation ou non d'un second anticorps (Parton *et al.*, 1994), et les conditions de fixation utilisées (Cerneus *et al.*, 1993 ; Mayer *et al.*, 1994 ; Parton *et al.*, 1994).

D'autres protéines ancrées par GPI se trouvent réparties de manière diffuse à la surface membranaire après marquage direct avec un seul anticorps, alors qu'elles sont groupées lorsque des méthodes de marquage indirect sont utilisées (Fujimoto, 1996). Les regroupements observés après addition d'anticorps ne sont pas uniformément répartis mais on les trouve plutôt à proximité (Rothberg *et al.*, 1990) ou dans (Parton *et al.*, 1994 ; Ying *et al.*, 1992) des cavéoles invaginées ou colocalisés avec la cavéoline (Mayer *et al.*, 1994 ; Fujimoto, 1996).

A l'inverse, les résultats obtenus par les méthodes biochimiques de purification, utilisant (Sargiacomo *et al.*, 1993) ou non (Smart *et al.*, 1995 ; Chang *et al.*, 1994) des détergents, s'accordent pour localiser les protéines ancrées par GPI dans les fractions de cavéoles. Or, certains auteurs affirment que l'utilisation de détergents peut modifier la composition des cavéoles mais surtout ne permettrait pas d'isoler spécifiquement cette fraction. Les fractions étudiées seraient contaminées par les membranes de vésicules cytoplasmiques provenant des endosomes et de l'appareil de Golgi.

Seul le prétraitement des cellules avec des anticorps dirigés contre la protéine (Smart *et al.*, 1996) ou avec de la silice cationisée (Schnitzer *et al.*, 1995) ou encore l'utilisation de tampon Tris (pH = 9,5) (Song *et al.*, 1996) conduit à la détection des protéines ancrées par GPI dans d'autres fractions cellulaires.

Ces protéines ne pouvant être à la fois groupées et dispersées, une hypothèse a été émise suggérant que les protéines ancrées par GPI soient toujours mobiles au sein de la membrane même après leur fixation par des aldéhydes, leur distribution pourrait alors être modifiée après addition de divers agents.

Si la localisation des protéines ancrées par GPI n'est toujours pas définie, la majorité des études morphologiques et fonctionnelles sont en faveur de leur localisation dans les cavéoles.

L'absence de méthode de purification de référence, à laquelle s'ajoutent les risques de contamination et les artefacts d'extraction suppose qu'une vérification qualitative des fractions obtenues soit faite si possible en utilisant des méthodes indépendantes.

Bien qu'imparfaites, ces techniques ont toutefois permis d'établir la structure moléculaire des cavéoles (Tableau 4). Toutes ces molécules ont été décrites comme étant concentrées dans les cavéoles. Toutefois, seules 35% d'entre elles ont pu être localisées à la fois par des méthodes biochimiques et morphologiques.

CLASSE DE LA MOLECULE	NOM DE LA MOLECULE	LOCALISATION		REFERENCES
		Biochimique	Morphologique	
LIPIDES	Gangliosides	x	x	Smart <i>et al.</i> , 1995
	Sphingomyéline	x		Brown et Rose, 1992
	Céramide	x		Brown et Rose, 1992
	Diacylglycérol (DAG)	x		Liu et Anderson, 1995
	Cholestérol	x	x	Smart <i>et al.</i> , 1996
PROTEINES ACYLEES	Hétérotrimerique Gα et Gβ	x	x	Sargiacomo <i>et al.</i> , 1993
	Src, Fyn, Hck, Lck	x		Sargiacomo <i>et al.</i> , 1993
	E-NOS	x	x	Shaul <i>et al.</i> , 1996
	CD-36	x		Lisanti <i>et al.</i> , 1994
	Caveoline	x	x	Rothberg <i>et al.</i> , 1992
PROTEINES ANCREES PAR GPI	Récepteur aux folates	x	x	Rothberg <i>et al.</i> , 1990
	Thy 1	x	x	Lisanti <i>et al.</i> , 1994
	Phasphatase alcaline	x	x	Jemmerson <i>et al.</i> , 1985
	Prion	x	x	Ying <i>et al.</i> , 1992
	Urokinase Rec	x	x	Stahl <i>et al.</i> , 1995
	5'-Nucleotidase	x	x	Strohmeier <i>et al.</i> , 1997
	CD14	x	x	Wang <i>et al.</i> , 1996
	Rap1A	x	x	Chang <i>et al.</i> , 1994
	Ras	x		Song <i>et al.</i> , 1996
RECEPTEUR MEMBRANAIRE	PDGF	x	x	Liu <i>et al.</i> , 1996
	Insuline		x	Goldberg <i>et al.</i> , 1987
MOLECULES DE SIGNALISATION	EGF	x		Smart <i>et al.</i> , 1995
	RAGE	x		Lisanti <i>et al.</i> , 1994
	CCK	x	x	Roettger <i>et al.</i> , 1995
	M2 acetylcholine	x		Ferron <i>et al.</i> , 1997
	β adrénergique		x	Dupree <i>et al.</i> , 1993
	Bradykinine	x		De Weerd <i>et al.</i> , 1997
	Endothéline	x		Chun <i>et al.</i> , 1994
	SR-B1	x	x	Babitt <i>et al.</i> , 1997
	PKCα	x	x	Lisanti <i>et al.</i> , 1994
	SHC	x		Liu <i>et al.</i> , 1996
	SOS	x		Mineo <i>et al.</i> , 1996
	GRB2	x		Mineo <i>et al.</i> , 1996
	MAP Kinase	x	x	Lisanti <i>et al.</i> , 1994
	Adenylate cyclase	x	x	Huang <i>et al.</i> , 1997
	SYP	x		Liu <i>et al.</i> , 1996
TRANSPORTEURS	Pi3 Kinase	x		Liu <i>et al.</i> , 1996
	Raf1	x		Mineo <i>et al.</i> , 1996
	Calmoduline	x		Shaul <i>et al.</i> , 1996
	Phosphoinositides (PI)	x		Hope et Pike 1996
	PIPhosphate	x		Pike et Casey 1996
	Porine	x		Lisanti <i>et al.</i> , 1994
	Récepteur IP3	x	x	Schnitzer <i>et al.</i> , 1995
	Ca ²⁺ ATPase	x	x	Schnitzer <i>et al.</i> , 1995
	Aquaporine-1	x		Schnitzer et Oh, 1995
	H ⁺ ATPase	x		Mineo et Anderson, 1996
MOLECULES STRUCTURALES	Annexine II	x		Lisanti <i>et al.</i> , 1994
	Ezerin	x		Lisanti <i>et al.</i> , 1994
	Myosin	x		Lisanti <i>et al.</i> , 1994
	VAMP	x		Schnitzer <i>et al.</i> , 1995
	NSF	x		Schnitzer <i>et al.</i> , 1995
	Actine	x	x	Smart <i>et al.</i> , 1995

Tableau 4 : Liste non exhaustive des molécules enrichies dans les cavéoles. (D'après Anderson, 1998)

Cette liste ne prend pas en considération la technique de purification utilisée pour identifier la molécule. Pris dans son ensemble, la liste montre que les cavéoles présentent une **composition lipidique particulière (sphingomyéline (SPH), glycosphingolipides (GSL), cholestérol)** qui explique leur propriété de non-solubilisation par les détergents. Cette propriété a pu être reconstituée *in vitro* en utilisant des liposomes composés de cholestérol et de sphingomyéline (Schroeder *et al.*, 1994 ; Ahmed *et al.*, 1997).

Ainsi, **SPH/GSL/cholestérol forment le noyau lipidique des cavéoles**. Celui-ci joue un rôle important dans l'attraction, au sein des cavéoles, des protéines membranaires modifiées par des lipides. Ce noyau lipidique est à la base du processus d'assemblage des cavéoles

IV.2.1.c.Assemblage des cavéoles.

La formation des cavéoles est un processus à étapes multiples. De nombreux travaux ont permis d'en établir un mécanisme unique (Figure 23).

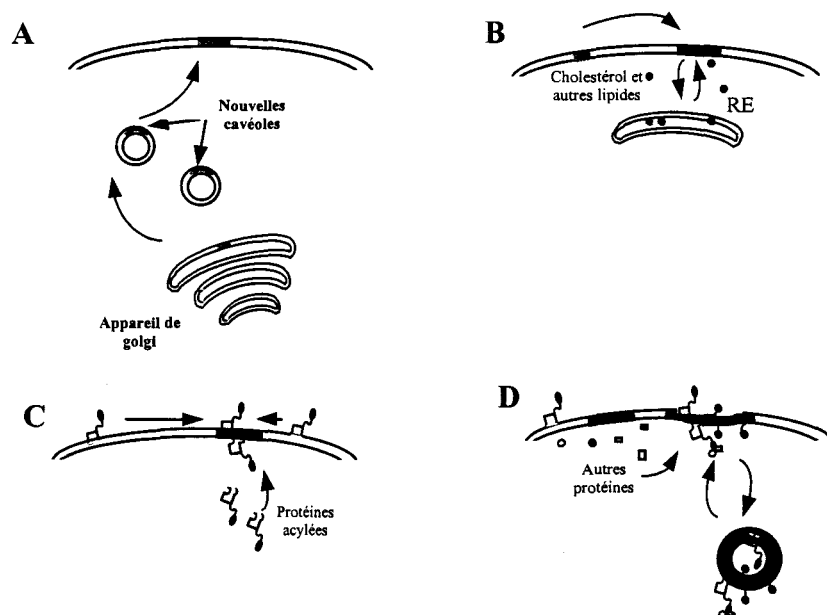


Figure 23 : Mécanisme d'assemblage des cavéoles (D'après Anderson, 1998)

Comme le montre la figure 23-A, la formation des cavéoles va commencer avec la formation de domaines riches en GSL/SPH/cholestérol au niveau de l'appareil de Golgi (Lisanti *et al.*, 1993 ; Brown et Rose, 1992). Des vésicules d'exocytose (Dupree *et al.*, 1993) vont amener ces domaines au contact de la membrane. Le mécanisme par lequel ces domaines vont apparaître au niveau de la membrane plasmique reste encore à définir. Cavéoline-1, protéines ancrées par GPI ainsi que d'autres protéines vont alors rejoindre ces domaines (Lisanti *et al.*, 1993). Ces nouvelles cavéoles vont se déplacer vers un site membranaire spécifique vers lequel migrent, à partir du réticulum endoplasmique, le cholestérol et les autres lipides (Figure 23-B). Cet apport constant de lipides est essentiel au maintien de la structure des cavéoles, et à la concentration des protéines ancrées par GPI et des protéines acylées qui vont sans cesse entrer et sortir de ce domaine (Figure 23-C). Ces résultats sont en parfaite corrélation avec les études précédemment décrites relatant l'importance du cholestérol dans la formation des cavéoles (Chang *et al.*, 1992 ; Rothberg *et al.*, 1992 ; Smart *et al.*, 1996).

Les interactions entre les protéines ancrées dans les lipides de ce domaine et d'autres protéines, transmembranaires ou libres, vont créer l'environnement particulier des cavéoles.

Ainsi, une meilleure connaissance de la structure moléculaire des cavéoles a permis d'émettre des hypothèses quant aux rôles que peuvent jouer ces vésicules au sein de la cellule.

IV.2.2. Les fonctions des cavéoles.

Bien que leur existence soit connue depuis plus de 40 ans (Palade, 1953 ; Yamada, 1955), définir la ou plutôt les fonctions précises des cavéoles reste à ce jour problématique. De nombreuses molécules impliquées dans les voies de signalisation sont concentrées au niveau des cavéoles, suggérant que ces vésicules sont impliquées dans les mécanismes de transduction des signaux.

IV.2.2.a. Cavéoles et signalisation

Parmi les molécules impliquées dans les voies de signalisation et associées aux cavéoles, on trouve :

Les Tyrosine Kinases

Les récepteur et non récepteur aux tyrosines kinases (PTK) sont des marqueurs fiables des cavéoles. A l'exception des résultats récents obtenus par Stan *et al.*(1997), toutes le méthodes de purification montrent que **ces PTK se trouvent concentrées dans les fractions de cavéoles de divers tissus ou cellules**. De plus, l'immunoprécipitation de multiples protéines ancrées par GPI coprécipite des PTK (Stefnová *et al.*, 1991). Quelles que soient les techniques de détection utilisées (immunoblot, activité enzymatique, et immunocyochimie), elles indiquent toutes que les PTK sont localisées dans les cavéoles. Liu *et al.* (1996) montrent en immunofluorescence que le récepteur au PDGF est colocalisé avec la cavéoline-1 et que la majorité des récepteurs se trouvent dans les fractions de cavéoles purifiées. Par immunocytochimie, Liu *et al.* (1997) montrent que les PTK sont localisées dans les cavéoles invaginées. L'un des substrats de ces PTK se trouve être la cavéoline-1 (Liu *et al.*, 1997 ; Glenney, 1986, 1989 ; Glenney et Zokas, 1989). La phosphorylation de la cavéoline-1 est stimulée notamment par l'insuline (Mastick *et al.*, 1995) et les agents oxydants (Vepa *et al.*, 1997).

Les protéines G

La localisation des protéines liant le GTP au niveau de la membrane a été le sujet de nombreuses études : sont-elles réparties sur toute la surface membranaire ou sont-elles organisées en des domaines précis ? (Neubig, 1994). Par des techniques de fractionnement cellulaire et d'immunocytochimie, **il est clair aujourd'hui qu'elles sont toutes localisées dans les cavéoles**. Les fractions purifiées de cavéoles contiennent une large proportion de l'activité adénylate cyclase de la cellule (Huang *et al.*, 1997). Plusieurs travaux montrent que la cavéoline-1 jouerait un rôle à la fois dans le recrutement des sous unités $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha i}$ dans les cavéoles et dans la régulation de leur activité (Scherer *et al.*, 1996 ; Song *et al.*, 1996 ; Li *et al.*, 1995 ; 1996).

Le Calcium

Un modèle de couplage excitation-contraction dépendant des cavéoles a été décrit en 1974 par Popescu. A ce jour, de nombreuses études ont confirmé ces travaux, faisant des cavéoles des sites de stockage et d'entrée du calcium dans la cellule. En effet, les cavéoles jouent un rôle majeur dans la formation des tubules transverses au niveau des muscle lisses (Parton *et al.*, 1997). La Ca^{2+} ATPase (Fujimoto, 1993 ; Schnitzer *et al.*, 1995), les récepteurs aux inositoltriphosphates (Fujimoto *et al.*, 1992 ; Schnitzer *et al.*, 1995) et la calmoduline (Shaul *et al.*, 1996), composants moléculaires majeurs du transport du calcium, ont été localisés dans les cavéoles de divers types cellulaires.

Les molécules issues des lipides

Certains des lipides et certaines des protéines ancrées par GPI incorporés dans les cavéoles au niveau de l'appareil de Golgi sont des sources importantes de molécules intervenant dans les voies de signalisation cellulaire. Sphingomyelines, phosphatidylinositol 4,5, biphosphate, et lipides des protéines ancrées par GPI sont les substrats d'enzymes qui libèrent respectivement des **céramides** (Liu et Anderson, 1995 ; Bilderback *et al.*, 1997), **des inositol triphosphates (IP3)** (Hope et Pike, 1996 ; Pike et Casey, 1996) et des **inositolphosphoglycans (IPG)** (Clemente *et al.*, 1995 ; Stralfors, 1997). Chaque substance est produite après une stimulation appropriée. Les céramides apparaissent après stimulation par l'IL-1 β (Liu et Anderson, 1995) ou par des neurotrophines (Bilderback *et al.*, 1997). L'IP3 est libéré après traitement à la bradykinin ou à l'EGF (Pike et Casey, 1996) et l'IPG en réponse à l'insuline (Parpal *et al.*, 1995). Ces réponses semblent être spécifique car céramides et IP3 ne sont jamais produits dans des fractions non enrichies en cavéoles. De plus, l'IPG libéré face extracellulaire de la membrane serait internalisé par les cavéoles.

Les cavéoles contiennent donc un grand nombre de molécules impliquées dans les voies de signalisation intracellulaire et sont donc le site privilégié de l'intégration du signal. En effet, concentrées dans un même domaine, les molécules de différentes voies vont interagir, modulant ainsi leurs effets afin d'obtenir la réponse cellulaire la plus appropriée.

Le rôle des cavéoles dans les voies de signalisation cellulaire n'est pas le seul qui leur est aujourd'hui attribué. La présence au sein des cavéoles de récepteurs spécifiques laisse supposer qu'elles interviennent dans **les processus d'internalisation** de molécules plasmiques.

IV.2.2.b. Cavéoles et internalisation.

La structure particulière des cavéoles associées en grappes largement invaginées dans la cellule a conduit à de mauvaises interprétations des coupes obtenues en microscopie électronique conventionnelle. Celles-ci montraient qu'environ 50% des vésicules non recouvertes de clathrine se trouvaient libres dans le cytoplasme alors que les résultats obtenus sur des coupes serriées ultrafines n'en comptaient qu'un très faible pourcentage (<1%) (Bundgaard *et al.*, 1979 ; Frokjaer-Jensen, 1991). Ainsi, les cavéoles ont été considérées comme des structures statiques, incapables de se détacher de la membrane. **La potocytose** fut alors proposée comme solution alternative permettant l'entrée de molécules dans la cellule sans que les cavéoles n'aient besoin de se détacher de la surface cellulaire (Anderson *et al.*, 1992).

La mise en évidence de récepteurs aux folates (protéine ancrée par GPI) fut le premier indice laissant supposer que les cavéoles pouvaient être le siège d'une entrée de molécules et d'ions dans diverses cellules. Les points essentiels de cette voie ont été décrits à partir de cellules MA104 exprimant un nombre limité de récepteurs qui apparaissent souvent associés dans des cavéoles invaginées et ne sont pas détectés dans la voie des puits recouverts de clathrine (Rothberg *et al.*, 1990). Les récepteurs aux folates vont fixer et internaliser le 5-méthyltetrahydrofolate (Figure 24).

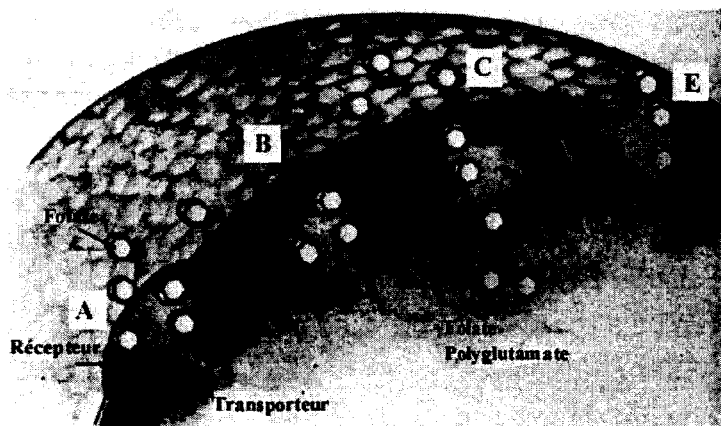


Figure 24 Modèle de potocytose dépendante du récepteur au folate. (D'après Anderson *et al.*, 1992)

Les cavéoles vont alors se fermer créant un micro-environnement dans lequel un gradient de protons sera créé. A pH acide, le ligand se dissocie de son récepteur (Kamen *et al.*, 1988 ; Kamen *et al.*, 1989) et diffuse vers le cytoplasme de la cellule (Kamen *et al.*, 1991). Ce processus, d'abord restreint au récepteur aux folates, s'est ensuite généralisé à la plupart des protéines ancrées par GPI qui, présentant des activités enzymatiques, vont générer des produits. Ces derniers, une fois les cavéoles fermées, vont se concentrer dans la vésicule, favorisant ainsi leur transport vers le cytoplasme de la cellule.

Le mécanisme de potocytose, ainsi défini, attribuait aux cavéoles un rôle dans l'internalisation de molécules, sans que ces vésicules n'aient besoin de se détacher de la membrane. Aujourd'hui, de nombreuses études établissent clairement leur rôle dans les phénomènes d'endocytose (pour revue voir Lamaze et Schmid, 1995).

En effet, les techniques récentes de purification ont permis de montrer que ces vésicules possédaient tout l'équipement protéique nécessaire au transport vésiculaire (NSF, VAMP, vSNARE, protéines liant le GTP, annexines II et VI...). De plus, les travaux de Schnitzer *et al.* (1996) montrent que le GTP présent dans le cytoplasme permet le détachement des cavéoles d'une membrane plasmique préalablement isolée avec de la silice cationisée. L'hydrolyse du GTP serait effectuée par la dynamine, protéine déjà mise en évidence au niveau des puits recouverts de clathrine où elle est indispensable à la formation de vésicules libres dans le cytoplasme.

Le terme de potocytose a donc été étendu suite à la découverte de transport de molécules des cavéoles vers le réticulum endoplasmique. La première molécule décrite à emprunter cette voie est la cavéoline-1 (Smart *et al.*, 1994 ; Conrad *et al.*, 1995). Certains pathogènes viraux et la toxine cholérique semblent également atteindre le réticulum endoplasmique par cette voie (Kartenbeck *et al.*, 1989 ; Anderson *et al.*, 1996 ; Stang *et al.*, 1997 ; Parton, 1994).

D'autres études montrent que les cavéoles seraient non seulement impliquées dans l'endocytose mais aussi dans la transcytose de macromolécules plasmatiques à travers les cellules endothéliales de divers endothélia. En effet, Schnitzer (1993) ont

montré que les cavéoles sont impliquées dans la transcytose de l'albumine native au niveau des cellules endothéliales. Ce transport serait dépendant de la présence d'un récepteur spécifique, l'albondine, localisée au niveau des cavéoles.

Des études complémentaires concernant l'internalisation de la phosphatase alcaline (Parton *et al.*, 1994), du récepteur aux folates (Smart *et al.*, 1994 ; Smart *et al.*, 1995) et de la toxine cholérique (Parton *et al.*, 1994) ont montré qu'il y avait un recyclage de membrane au cours de la potocytose. Les mécanismes de recyclage semblent être régulés par les activités de la protéine kinase C α et d'une sérine/thréonine phosphatase présentes dans des cavéoles purifiées (Smart *et al.*, 1995). En effet, dans des cellules déprimées en PKC α , l'internalisation des récepteurs aux folates est inexistante (Smart *et al.*, 1994). Ces deux enzymes contrôlent la voie de recyclage des cavéoles : l'inactivation de la PKC α conduit à l'inhibition de la séquestration des molécules dans les cavéoles qui retournent en surface, alors que l'inactivation de la phosphatase entraîne une accumulation des molécules dans les cavéoles.

Même si les cavéoles comme les puits recouverts de clathrine sont spécialisées dans l'internalisation de différentes molécules, **potocytose et endocytose dépendante d'un récepteur sont des voies d'endocytose parallèles mais non redondantes**. Les molécules internalisées par potocytose suivent une des quatre voies intracellulaires décrites (Figure 25)

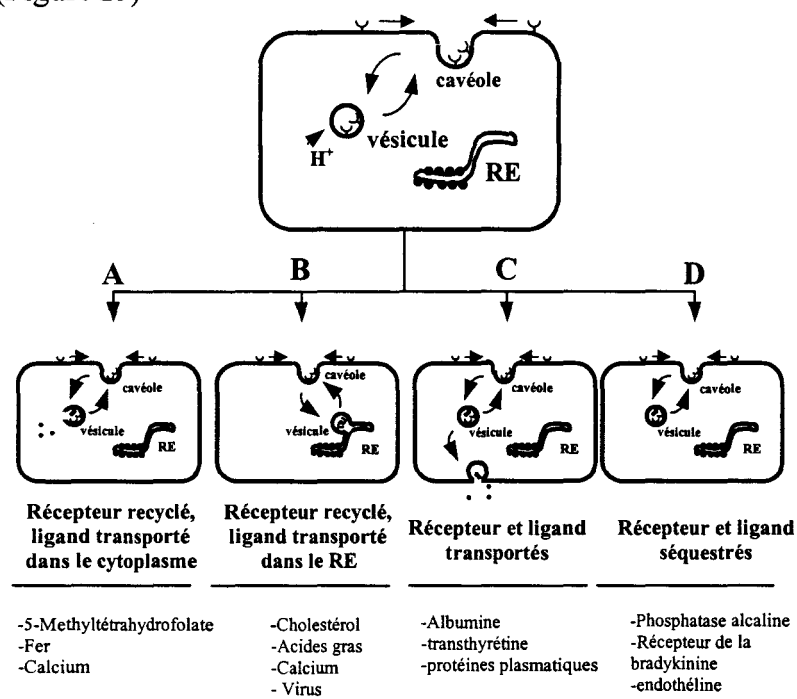


Figure 25 : Les voies de la potocytose. (d'après Anderson, 1998)

Provenant de la surface cellulaire :

- le ligand sera libéré dans le cytoplasme de la cellule et son récepteur sera recyclé (figure 25A).
- le ligand peut être transporté vers le réticulum endoplasmique et son récepteur recyclé (figure 25B).
- le ligand peut être transporté à travers la cellule (transcytose : figure 25C)
- le ligand et le récepteur peuvent être séquestrés dans une vésicule cytoplasmique qui sera entièrement recyclée (figure 25D).

De plus, Schnitzer *et al.* (1993) suggèrent également l'existence d'une nouvelle classe de cavéoles : des récepteurs localisés au niveau de cavéoles permettent le transfert de l'albumine modifiée vers les compartiments lysosomiaux. Le transport de molécules vers les lysosomes constituerait alors une nouvelle voie de la potocytose.

Impliquées dans de nombreux processus physiologiques, les cavéoles semblent aujourd'hui jouer un rôle dans diverses pathologies.

IV. 2.2.c. Cavéoles et pathologies

En effet, un bon nombre de pathologies semblent impliquer les cavéoles. Celles ci seraient la cible de divers pathogènes et sont altérées dans les cellules transformées.

Les prions sont des protéines qui causent des encéphalopathies mortelles chez l'homme et certains animaux. La conversion post-translationnelle de la protéine cellulaire prion (Pr^{C}) en sa forme infectieuse (Pr^{Sc}) est le mécanisme déclenchant la maladie. Pr^{C} est une protéine ancrée par GPI localisée dans les cavéoles invaginées des fibroblastes et des neurones (Ying *et al.*, 1992) et dans les fractions de cavéoles (Wu *et al.*, 1997, Harmey *et al.*, 1995 ; Vey *et al.* (1996), Naslavsky *et al.*, 1997). Cette localisation au niveau des cavéoles semblent être nécessaire à la conversion de Pr^{C} en Pr^{Sc} car le remplacement de l'ancrage GPI de Pr^{C} par une séquence spécifique de localisation dans les puits recouverts de clathrine empêche la conversion (Kaneko *et al.*, 1997). De faibles taux de cholestérol cellulaire, qui dispersent les protéines ancrées par GPI sur toute la surface cellulaire ont les mêmes conséquences (Taraboulos *et al.*, 1995).

Les cavéoles semblent être la **voie d'entrée de certains pathogènes ou de molécules qu'ils sécrètent**. C'est le cas du virus SV40, de *Campylobacter jejuni* (Wooldridge *et al.*, 1996), de la toxine cholérique (Parton *et al.*, 1994). Les cavéoles étant un site privilégié d'insertion et de concentration de protéines ancrées par GPI, elles peuvent être la cible de protéines ancrées par GPI libérées par des parasites comme *Plasmodium*, *Trypanosoma*, et *Leishmania* (Tachado *et al.*, 1996 ; 1997).

Le nombre de cavéoles est extrêmement réduit dans **les cellules transformées** (Koleske *et al.*, 1995). La perte des invaginations est corrélée avec la phosphorylation sur des résidus tyrosine de la cavéoline-1 (Glenney, 1989 ; Koleske *et al.*, 1995). La cavéoline-1 a été identifiée par Engelman *et al.* (1997) comme un gène suppresseur de tumeurs : hautement exprimé dans les cellules normales, son expression est fortement diminuée dans ces mêmes cellules transformées.

IV. 3. CONCLUSION

Le nombre croissant d'études réalisées sur les cavéoles prouvent qu'elles jouent un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire. Elles constituent un système membranaire complexe, jouant un rôle à la fois dans la genèse et l'intégration des signaux de transduction mais aussi dans les transports de molécules, par des systèmes dépendants de récepteurs, vers différents compartiments ou vers la face abluminale de la cellule (transcytose) (Figure 26).

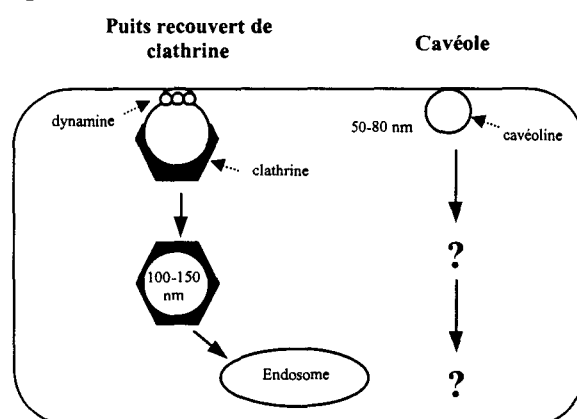


Figure 26: Voies d'endocytose rencontrées chez les cellules de mammifères. (d'après Lamaze et Schmid, 1995).

Même si ces dernières années les travaux concernant la structure et la fonction cellulaire des cavéoles ont été abondants, **la nature des différents compartiments intracellulaires impliqués dans le transport des molécules par ce type de vésicules reste à déterminer.**

V. CONCLUSION DE L'ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le support anatomique de la BHE est l'endothélium des capillaires cérébraux. Celui présente des caractéristiques physiques et métaboliques qui le différencient de l'endothélium des autres organes et sont indispensables au maintien de l'homéostasie du SNC.

Ainsi, la présence de jonctions serrées, la rareté des vésicules de pinocytose et l'absence de fenestrations restreignent considérablement les échanges non spécifiques entre le sang et le parenchyme cérébral. A ces caractéristiques structurales s'ajoutent des propriétés dites « métaboliques », telles que l'expression de la monoamine oxydase et de la P-glycoprotéine qui participent également à la restriction des échanges entre le sang et le cerveau.

Cependant, malgré ses importantes capacités de synthèse, le cerveau ne peut être autonome. L'apport constant de nutriments est indispensable au bon fonctionnement des cellules nerveuses. Cet apport sera sélectif, nécessitant l'intervention de transporteurs et de récepteurs spécifiques.

Ainsi, la BHE restreint les phénomènes de diffusion pour privilégier les transports spécifiques entre les compartiments plasmatiques et nerveux. Elle apparaît alors comme une structure biologiquement active.

L'environnement cérébral, et plus particulièrement les astrocytes, anatomiquement associés à l'endothélium capillaire, joue un rôle important dans l'élaboration et le maintien des propriétés de la BHE. En effet, les astrocytes sécrètent des facteurs diffusibles permettant non seulement la mise en place de caractéristiques physiques comme les jonctions serrées, mais aussi l'expression de protéines impliquées dans le métabolisme des cellules endothéliales ou le transport de molécules à travers la BHE. **Une intercommunication entre les cellules endothéliales de capillaires cérébraux et les astrocytes est indispensable à l'élaboration de ces propriétés.**

La mise au point au laboratoire d'un modèle *in vitro* de BHE qui consiste en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes a permis de recréer les interactions qui existent *in vivo*. Dans ces conditions de culture, les cellules endothéliales présentent de nombreuses caractéristiques de l'endothélium *in vivo*. Si bon nombre de propriétés physiques et métaboliques ont pu être mises en évidence dans les cellules endothéliales de ce modèle, **la présence de la P-glycoprotéine**, exprimée *in vivo*, n'avait jamais été testée. C'est pourquoi, le premier objectif de notre travail a été d'en vérifier l'expression et la fonctionnalité dans les cellules endothéliales de notre modèle *in vitro*. **Ces études ont contribué à une meilleure caractérisation du modèle.**

De plus, si la perméabilité paracellulaire des cellules endothéliales de ce modèle est bien caractérisée, les modalités de transports transendothéliaux dépendants de récepteurs ont été peu étudiées. La mise en évidence d'un récepteur apo (B,E) face luminale des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et la capacité des astrocytes à en réguler l'expression, ont permis d'envisager l'intervention de ce récepteur dans le transport des lipides incorporés dans des lipoprotéines vers le cerveau.

Le transport des lipoprotéines de basse densité (LDL) à travers la BHE a fait l'objet de la deuxième partie de nos travaux. Après avoir caractérisé les modalités de transport des LDL, nous avons déterminé quelles étaient les vésicules impliquées dans les premières étapes du trafic intracellulaire. Enfin, des études préliminaires ont été réalisées en vue d'utiliser cette voie endogène de transport pour vectoriser des médicaments vers le cerveau.

TRAVAUX PERSONNELS

I. CARACTERISATION DU MODELE *IN VITRO* DE BHE : mise en évidence de la P-glycoprotéine (P-gp)

Comme nous l'avons décrit dans les généralités, le support anatomique de la BHE est l'endothélium des capillaires cérébraux. Celui-ci présente des caractéristiques structurales différentes de l'endothélium des autres organes. Il se différencie par la présence de jonctions serrées, la rareté des vésicules de pinocytose et l'absence de fenestrations. A ses propriétés physiques s'ajoutent des caractéristiques métaboliques telles que l'expression de la monoamine oxydase et de la γ -glutamyl transpeptidase.

Ces caractéristiques vont restreindre considérablement les échanges non spécifiques entre le sang et le parenchyme cérébral. Bien que nécessaire, cette restriction est toujours aujourd'hui un obstacle au traitement des maladies du système nerveux central. En effet, de nombreux médicaments traversent difficilement la BHE et ne peuvent donc pas agir dans le parenchyme cérébral. C'est pourquoi, de nombreuses stratégies ont été développées dans le but d'améliorer leur passage à travers la BHE. Ces nouvelles stratégies nécessitent aujourd'hui **une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires du transport des molécules à travers la BHE**. L'étude de ces mécanismes a été facilitée depuis une quinzaine d'années par l'utilisation de cultures de cellules endothéliales de capillaires cérébraux.

La mise au point au laboratoire d'un **modèle *in vitro* de BHE** consistant en une coculture de cellules endothéliales de capillaires cérébraux et d'astrocytes, a permis de recréer les interactions cellulaires qui existent *in vivo* (Figure 27).

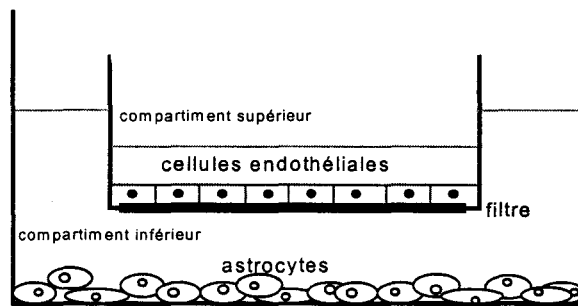


Figure 27: Schéma du modèle *in vitro* de BHE : coculture de cellules endothéliales et d'astrocytes.

Dans ces conditions de culture, les cellules endothéliales présentent de nombreuses caractéristiques de l'endothélium de la BHE *in vivo*.

Si bon nombre d'entre elles, tant physiques que métaboliques, ont déjà été décrites sur le modèle (Dehouck *et al.*, 1990 ; 1992), l'expression de la P-gp, mise en évidence *in vivo* (Cordon-Cardo *et al.*, 1989), n'avait pas été testée. **La mise en évidence de cette protéine au niveau des cellules endothéliales de capillaires cérébraux en culture et sa fonctionnalité ont fait l'objet de notre première étude.**

ARTICLE 1

Inhibition de la P-glycoprotéine : Evaluation rapide de son implication sur l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et sur le transport des médicaments vers le cerveau grâce à un modèle de barrière hémato-encéphalique *in vitro*

Des études de transport de nombreuses molécules, réalisées sur notre modèle *in vitro* ont permis d'établir une parfaite corrélation entre les perméabilités obtenues *in vitro* et *in vivo* par la méthode d'Oldendorf (Dehouck *et al.* 1992 ; 1995). Comme *in vivo*, les résultats obtenus *in vitro* ne permettaient **pas d'établir une corrélation entre les paramètres de lipophile des molécules et leur transport à travers la BHE**. En effet, malgré une lipophilie élevée, **la cyclosporine** ne traverse que très difficilement la BHE tant *in vitro* (Dehouck *et al.*, 1995) qu'*in vivo* (Cefalu et Pardridge, 1985). D'autres médicaments anticancéreux lipophiles tels que **la vincristine** et **la doxorubicine** n'atteignent pas le parenchyme cérébral (Levin, 1980)

La mise en évidence par Cordon-Cardo *et al.* (1989) de **la P-glycoprotéine (P-gp)** dans les membranes des cellules endothéliales de capillaires cérébraux *in vivo* était susceptible d'expliquer les faibles perméabilités de ces molécules lipophiles à travers la BHE. A l'appui de cette hypothèse, il a en effet été démontré que cette P-gp est responsable de l'expulsion de ces mêmes molécules hors du cytoplasme de cellules tumorales présentant le phénotype de résistance multiple aux anticancéreux (MDR). Des études pharmacocinétiques ont montré que les composés entraient normalement dans les cellules mais que leur accumulation intracytoplasmique était significativement diminuée, la P-gp agissant comme une **pompe d'efflux actif**, chassant hors du cytoplasme les composés auxquels les cellules sont exposées. En agissant de façon comparable au niveau des cellules endothéliales des capillaires cérébraux, la P-gp pourrait expliquer les faibles perméabilités observées pour ces molécules lipophiles à travers la BHE.

En utilisant notre modèle de BHE *in vitro*, nous avons montré que :

1 : Les cellules endothéliales en culture expriment la P-gp (Figure 1). Par Western-blot, en utilisant l'anticorps monoclonal C219 spécifique de la P-gp, une protéine de 175kDa a pu être mise en évidence sur les capillaires isolés de cerveaux de bœuf (Figure 1A) ainsi que sur les cellules endothéliales mises en culture à partir de ces capillaires (Figure 1C). Ces résultats montrent que la P-gp est exprimée par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux *in vitro* et *in vivo*. De plus, son expression est quantitativement plus importante lorsque les cellules endothéliales sont cultivées en présence d'astrocytes (Figure 1D).

2 : Comme *in vivo*, le transport de la cyclosporine, de la vincristine et de la doxorubicine à travers la monocouche de cellules endothéliales est faible. En effet, les coefficients de perméabilité endothéliale pour ces molécules sont faibles : $Pe_{\text{doxorubicine}} = 0.72 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$ (Figure 2), $Pe_{\text{vincristine}} = 2.41 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$, $Pe_{\text{cyclosporine}} = 3.70 \times 10^{-3} \text{ cm/min}$.

3 : L'inhibition de la P-gp par un agent modulateur spécifique, le S9788 (dérivé de la triazino-amino pipéridine) peut (Figures 3 et 4) :

- augmenter à la fois **l'accumulation de la vincristine** dans les cellules (x4) et **son transport (x3)** à travers la monocouche de cellules endothéliales.
- augmenter **l'accumulation intracellulaire de la cyclosporine (x4)** sans en modifier le transport à travers la BHE.
- augmenter le **transport de la doxorubicine (x2.5)** sans en modifier l'accumulation intracellulaire.

4 : Les résultats obtenus pour la doxorubicine suggèrent que l'incubation des cellules endothéliales en présence de doxorubicine et de S9788 est toxique pour l'intégrité de la BHE. L'étude de transport de l'inuline montre en effet que l'incubation des cellules en présence de doxorubicine et de S9788 provoque une ouverture de la BHE après 30 minutes d'expérience (Figure 5). A l'inverse, en présence uniquement de

doxorubicine, le passage de l'inuline est faible et linéaire pendant toute la durée de l'expérience.

5 : Le **vérapamil**, inhibiteur connu de la P-gp et largement utilisé *in vitro*, présente les mêmes effets que le **S9788** sur le transport et l'accumulation de la vincristine et de la cyclosporine (Figures 6 et 7).

Inhibition of P-Glycoprotein: Rapid Assessment of Its Implication in Blood-Brain Barrier Integrity and Drug Transport to the Brain by an *In Vitro* Model of the Blood-Brain Barrier

Laurence Fenart,¹ Valérie Buée-Scherrer,¹
Laurence Descamps,¹ Christian Duhem,¹
Marie-Gwenaëlle Poullain,² Roméo Cecchelli,^{1,3}
and Marie-Pierre Dehouck^{1,4}

Received December 2, 1997; accepted March 26, 1998

Purpose. The objective of this work was to assess, *in vitro*, the passage of P-glycoprotein dependent drugs across brain capillary endothelial cells, when these drugs are associated with a reversing agent.

Methods. An *in vitro* model of the blood-brain barrier consisting of a coculture of brain capillary endothelial cells and astrocytes was used.

Results. We demonstrate that P-glycoprotein expression is upregulated by the presence of astrocytes. Uptake in the cells and transport across endothelial cell monolayers of vincristine, cyclosporin A and doxorubicin were studied. Using S9788 or verapamil as reversing agents, we found an increase in vincristine transport across the endothelial cell monolayers. On the other hand, the association of S9788 or verapamil with cyclosporin A failed to increase the transport of this drug. An increase in the transport of doxorubicin from luminal to abluminal compartment was also observed, due to endothelial cell monolayer breakdown.

Conclusions. Using this model, it is possible to predict the passage of a P-glycoprotein dependent drug to the brain or its sequestration in brain capillary endothelial cells when this drug is associated with a reversing agent, or its toxicity on the blood-brain barrier integrity.

KEY WORDS: brain capillary; endothelial cells; coculture; P-glycoprotein reversing agents; anticancer drugs; cyclosporin A.

INTRODUCTION

The blood-brain barrier is one of the main factors of chemotherapy failure in central nervous system tumors (1). Indeed the movement of compounds from the circulating blood to the extracellular space of the brain is strictly regulated by the brain capillary endothelial cells which are connected to each other by

continuous tight junctions and constitute this blood-brain barrier (BBB). Nutrients needed for brain cells are selectively transported from the blood to the brain by means of specific receptors or transporters. Transcellular passage of drugs across the BBB is usually believed to be dependent on lipid solubility and molecular size. The immunomodulator cyclosporin A was expected to cross the BBB freely because of its cyclic structure with an internal hydrogen-bond that confers a highly lipid-soluble character, but cyclosporin A cannot enter the brain (2,3). In the same way, the passage across the BBB of anticancer drugs such as vincristine (Vinc alkaloid) and doxorubicin (Anthracyclin) which are highly lipophilic is unexpectedly low (4).

Cordon-Cardo *et al.* (5) showed that brain capillary endothelial cells (ECs) express P-glycoprotein (P-gp). These low permeabilities could then be explained by the occurrence of this specific transmembrane protein at the luminal face of the BBB. It has been verified that cyclosporin A (6), vincristine (7,8) and doxorubicin (9) are actively pumped out of brain capillary ECs by P-gp which is localized at the luminal side of the BBB. This results in a decreased accumulation within the ECs, explaining their low permeability through the BBB.

By searching for potential substrates and reversal agents of P-gp activity, we may be able to improve drug delivery to the brain, which could be important for the treatment of brain cancer. Indeed in the brain, contrary to the neovasculature of other primary tumors, P-gp is expressed in the ECs of the newly formed capillaries of low grade gliomas (10), impeding anticancer drug access to tumor cells that are located around the capillaries and do not express P-gp (11). *In vivo* studies have shown that when rats were pretreated with verapamil, colchicine and vinblastine uptake in the rat brain was substantially enhanced (12). In the same way, PSC 833, a P-gp inhibitor has been shown to increase cyclosporin A and vincristine penetration in rat brain (13). *In vitro*, verapamil is able to inhibit efflux of vincristine (7,8) and cyclosporin A (6) from brain capillary ECs. An uptake of the drugs by brain capillary ECs was demonstrated in these *in vitro* experiments, but no information about the potential transport of these drugs to the brain parenchyma was given.

To investigate various aspects of BBB functions, including transport of compounds, we have developed an *in vitro* BBB model consisting of a coculture of brain capillary ECs and astrocytes (14,15). As a strong correlation was demonstrated for a large number of molecules between the permeability coefficient of ECs obtained *in vitro* and the brain uptake index obtained *in vivo* (16,17), this model could be considered as an useful system to predict the transport of drugs to the brain.

In this study, we compare P-gp expression in brain capillary ECs in solo culture or in coculture with astrocytes. Vincristine, doxorubicin and cyclosporin A show, *in vitro* as *in vivo*, a very low BBB permeability. To investigate whether P-gp modulator agents may increase the transport of P-gp dependent drugs, a multidrug resistance reversal agent S9788, a triazino-amino piperidine derivative, was used in this study. The effects of this compound that has never been tested at the BBB level, were compared with those of verapamil a widely used inhibitor of vincristine and cyclosporin A efflux, *in vitro*.

Using these two P-gp reversing agents, we have shown that the *in vitro* model can be used to predict the passage of a

¹ INSERM U325, Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur, 59019 Lille, France.

² I. R. I. SERVIER, Division Thérapeutique Cancérologie, 92415 Courbevoie, France.

³ Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean Perrin, 62307 Lens, France.

⁴ To whom correspondence should be addressed. (e-mail: marie-pierre.dehouck@pasteur-lille.fr)

ABBREVIATIONS: BBB, blood-brain barrier; P-gp, P-glycoprotein; EC(s), endothelial cell(s); Pe, permeability coefficient of endothelial cells; PeS, endothelial cell permeability surface area product; PfS, filter permeability surface area product; PtS, total permeability (filter and endothelial cells) surface area product.

P-gp dependent drug to the brain, or its sequestration in brain capillary ECs.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Antibodies

[U-¹⁴C]-sucrose (677 mCi/mmol), [³H]-inulin (1,02 Ci/mmol), [G-³H]-vincristine (6 Ci/mmol), [¹⁴C]-doxorubicin hydrochloride (60 mCi/mmol) and enhanced chemiluminescence reagents were obtained from Amersham Laboratories (Les Ulis, France). [³H]-cyclosporin (15,5 mCi/mg) was a gift from Novartis (Basel, Switzerland). S9788 was synthesized at the Servier Research Institute (Courbevoie, France). Verapamil hydrochloride was obtained from Sigma (St. Quentin Fallavier, France). The C219 monoclonal antibody was purchased from Cis bio Industries (Gif/Yvette, France).

Cell Culture

Bovine Brain Capillary Endothelial Cells

Endothelial cells were isolated and characterized as described by Méresse *et al.* (18). The use of cloned ECs allowed us to obtain a pure EC population without contamination by pericytes. The cells were cultured in the presence of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated calf serum and 10% (v/v) horse serum (Hyclone Laboratories, Logan), 2 mM glutamine, 50 µg/ml gentamycin and basic fibroblast growth factor (bFGF, 1 ng/ml, added every other day).

Rat Astrocytes

Primary cultures of mixed astrocytes were prepared from newborn rat cerebral cortex. After removing the meninges, the brain tissue was forced gently through a nylon sieve. Astrocytes were plated on 6 multiwell dishes (Nunc) at a concentration of 1.2×10^5 cells/ml in 2 ml of DMEM supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Hyclone Laboratories, Logan) and the medium was changed twice a week. Three weeks after seeding, cultures of astrocytes were stabilized and used for coculture. Astrocytes were characterized with glial fibrillary acidic protein (GFAP), more than 95% of the astrocyte population was GFAP positive (14).

Preparation of Filters for Coculture

Culture plate inserts (Falcon, 3 µm, 30 mm diameter, from Falcon) were coated on the upper side with 150 µl of a 1.5 mg/ml rat tail collagen solution containing 10 fold concentrated DMEM plus NaOH 0.3 M. The coating dried for one hour at 37°C and is rinsed twice with water and once with PBS-CMF, before putting it in complete medium.

Experimental Method for Coculture

Cultures of astrocytes were prepared as described above. After three weeks, coated filters were set in 6 multiwell dishes containing astrocytes. Endothelial cells were plated on their upper side in 1.5 ml of medium at a concentration of 4×10^5 cells/ml. The coculture medium is the same as for the brain

capillary EC medium. Under these conditions, ECs formed a confluent monolayer after 7 days. Experiments were performed 5 days after confluence.

Detection of P-Glycoprotein by Western Blot Analysis

Brain capillaries were isolated as described by Méresse *et al.* (18). The freshly isolated capillaries suspended in phosphate buffered saline (PBS) were homogenized 1 min with a polytron and stored at -180°C. Brain capillary ECs on filters cultured with or without astrocytes for 12 days, were washed twice with PBS and recovered by gentle scraping and resuspended in PBS. They were then, homogenized 1 min with a polytron and stored at -80°C.

On the day of the experiment, brain capillaries and cells were suspended in Laemmli sample buffer containing 5% β-mercaptoethanol. The samples were agitated 30 min at 25°C. Proteins (25 µg in both cases) were then resolved on polyacrylamide gel electrophoresis (3–19% gradient), electrotransferred to nitrocellulose and incubated with anti P-gp (C219) at a concentration of 200 ng/ml. Immunoreactivity was detected by indirect immunoperoxidase method and enhanced chemiluminescence detection (Amersham Laboratories).

Transendothelial Transport Studies

On the day of the experiment, buffered Ringer solution was added to the lower compartments of a six well plate (2 ml per well). One insert containing a confluent monolayer of ECs was transferred to the first well of the six-well plate containing buffered Ringer solution. Indeed, the arrangement of the coculture readily permits the use of different cell types, which were separated easily after coculture by removing the insert. Then, 2 ml of buffered Ringer solution containing [¹⁴C]-labeled or [³H]-labeled test compound, were placed, at time zero, in the upper compartment. The incubations were performed at 37°C on a rocking platform. At time 10, 15, 20, 30, and 45 min after time 0, the insert was transferred to another well to minimize the possible passage from the lower to the upper compartment. Triplicate inserts coated with collagen, seeded or not with ECs, were incubated for 12 days with astrocytes and used for each drug. At the end of the experiments, the monolayers were washed twice with 2 ml ice-cold buffered Ringer solution and the radioactivity in the cells was counted, after scraping the cells. Then, amounts of the radiotracers in the lower compartment and in the cells were measured in a liquid scintillation counter (Wallac 14110, Pharmacia). The endothelial permeability coefficient (Pe in cm/min) was calculated as previously described (16). During all experiments, the integrity of the brain capillary EC monolayers was checked using [¹⁴C]-sucrose or [³H]-inulin as a tracer. In the case of coincubation experiments, the ratio of [¹⁴C]/[³H] was 1:10.

Effects of S9788 and Verapamil as Reversing Agents

Transendothelial transport studies were performed as previously described. First, the integrity of EC monolayers incubated with or without S9788 was checked using [¹⁴C]-sucrose as a tracer. Then, transendothelial transport of radiolabeled drug in the absence or presence of reversing agents was carried out. Cells were incubated with [³H]-cyclosporin A or [³H]-vincristine (50 nM) for 45 min at 37°C with or without

1 μ M S9788 or 25 μ M verapamil. [14 C]-doxorubicin (420 nM) was associated with or without 1 μ M S9788. Transendothelial transport was measured by counting the radioactivity in the lower compartments. Results were expressed as a percentage compared to the control (which was not incubated with the reversing agent). After 45 min transport experiment, cells were washed twice with ice-cold buffered Ringer solution and scraped gently to measure cell uptake. The radioactivity in the cells was determined as described above. These steps were performed quickly in order to prevent any drug efflux. The amount of intracellular drugs was expressed as a percentage compared to the control. Triplicate cocultures were assayed for each compound. During all experiments, the integrity of the EC monolayers was checked using [14 C]-sucrose or [3 H]-inulin as a tracer.

RESULTS

P-glycoprotein Detection in Cultured Brain Capillary ECs

The expression of P-gp in bovine brain capillary ECs cultured alone or cocultured with rat astrocytes was examined using Western blotting. Since C219 monoclonal antibody cross-reacts with human, rat and bovine isolated capillaries (19), an enriched preparation of capillaries isolated from bovine brain was used as a positive control. A protein with a molecular mass of 175 kDa was detected in isolated brain capillaries and in brain capillary ECs cultured alone or with astrocytes (Fig. 1). In each case (ECs alone or cultured with astrocytes), the amount of P-gp was maintained through several passages. No P-gp expression was detected in aortic ECs, which were used as a negative control (data not shown). As 25 μ g of proteins were loaded for both ECs cultured alone or in the presence of astrocytes, a large increase in P-gp expression was apparent in ECs cultured with astrocytes (Fig. 1B).

These results indicate that cultured brain capillary ECs express P-gp, as *in vivo*. Coculture with astrocytes increases the expression of P-gp in ECs.

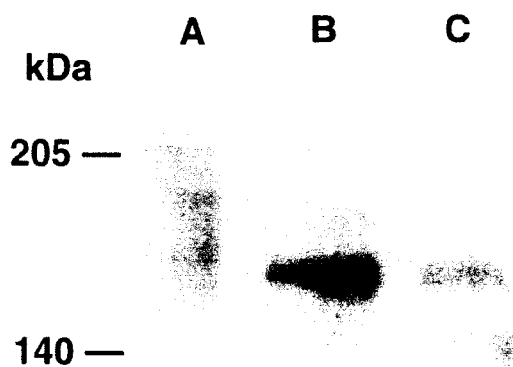


Fig. 1. Immunodetection of P-glycoprotein on Western blots. 25 μ g of solubilized proteins from isolated brain capillaries (A), brain capillary ECs cocultured with astrocytes (B), brain capillary ECs in solo culture onto filters coated with collagen (C), were loaded per well.

Transendothelial Transport of Vincristine, Cyclosporin A and Doxorubicin Across Brain Capillary EC Monolayers

Apical-to-basal transport of vincristine, cyclosporin A and doxorubicin was measured across EC monolayers. A typical transport assay using triplicate inserts with brain capillary ECs is shown for doxorubicin in Fig. 2. The permeability coefficients of ECs were for doxorubicin, $Pe_{\text{doxorubicin}} = 0.72 \times 10^{-3}$ cm/min; vincristine, $Pe_{\text{vincristine}} = 2.41 \times 10^{-3}$ cm/min; and cyclosporin A, $Pe_{\text{cyclosporin A}} = 3.70 \times 10^{-3}$ cm/min.

After each 45 min transport experiment, intracellular accumulations of drugs were measured and expressed as a percentage of the drug quantity placed at the luminal face: 0.15% of vincristine, 0.87% of doxorubicin, and 0.60% of cyclosporin A were found in the cells.

Since doxorubicin, vincristine and cyclosporin A are very lipophilic and use the transcellular pathway, their action on the paracellular pathway (possible opening of the tight junctions) was checked. Coincubation of these drugs with [14 C]-sucrose or with [3 H]-inulin were performed. Indeed, sucrose and inulin diffuse very slowly across the BBB in physiological conditions *in vitro* as well as *in vivo* (16,17), and are used as indicators of the functional integrity of tight junctions. The permeability coefficient of ECs for sucrose or inulin when associated with the different drugs was not significantly different from the one obtained for sucrose or inulin alone (Table I). These results show that the integrity of EC monolayers is maintained during the transport experiment and that drug concentrations used for these experiments are not toxic for the cells.

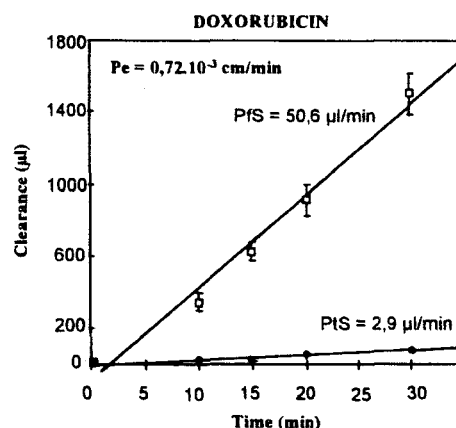


Fig. 2. Apical-to-basal transport of doxorubicin across brain capillary EC monolayers. Confluent monolayers of ECs and filters coated with collagen were incubated with 420 nM doxorubicin for 30 min at 37°C. Transports were measured by counting the amount of doxorubicin in the basal compartments. To obtain a concentration-independent transport parameter the clearance principle was used. Clearance for inserts covered with collagen and EC monolayers (●) and clearance for insert coated with collagen (□) were plotted versus time. The slopes of the clearance curves for the cultured inserts were PtS (where PS is permeability $\times$ surface area product), the slopes of the clearance curve for the control filter were PFS. Permeability of EC monolayers (Pe_S for each drug was calculated from: $1/Pe_S = 1/PtS - 1/PFS$). Pe_S value were divided by the surface area of the insert to generate the permeability coefficient of ECs (Pe). Each point is a mean of three different filters and the curves are representative of 4 series of independent experiments.

Table I. Integrity Assessment of Endothelial Cell Monolayers in Contact with Drugs

^a Pe for [¹⁴ C] sucrose ($\times 10^{-3}$ cm/min)	
Without drug	With [³ H]-vincristine
0.29 $\pm$ 0.03	0.31 $\pm$ 0.06
	With [³ H]-cyclosporin A
	0.30 $\pm$ 0.02
^a Pe for [³ H] inulin ($\times 10^{-3}$ cm/min)	
Without drug	With [¹⁴ C]-doxorubicin
0.11 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.02

^a Pe: Permeability coefficient of EC monolayers.

Effect of S9788 as a Reversing Agent of P-glycoprotein: Integrity of EC Monolayers Incubated with S9788

To measure the reversal activity of S9788, cells were incubated with vincristine or cyclosporin A or doxorubicin either alone or with 1 μ M S9788. The concentration of 1 μ M was chosen as experimental data showed that this concentration is achievable in clinical situations. This concentration has already been used for *in vitro* experiments (20).

1 μ M S9788 was not cytotoxic for cultured brain capillary ECs. Indeed, permeability coefficients for [¹⁴C]-sucrose measured on ECs incubated in HEPES-buffered Ringer solution containing or not 1 μ M S9788 were not significantly different ($Pe_{sucrose} = 0.51 \pm 0.09 \times 10^{-3}$ cm/min without S9788; $Pe_{sucrose} = 0.52 \pm 0.08 \times 10^{-3}$ cm/min with S9788), showing that the integrity of the monolayers was preserved when cells were in contact with 1 μ M S9788.

Cellular Accumulation of Vincristine, Cyclosporin A and Doxorubicin

Cellular accumulation of vincristine was carried out with ECs in HEPES-buffered Ringer solution containing vincristine alone or vincristine plus 1 μ M S9788. As shown in Fig. 3, a

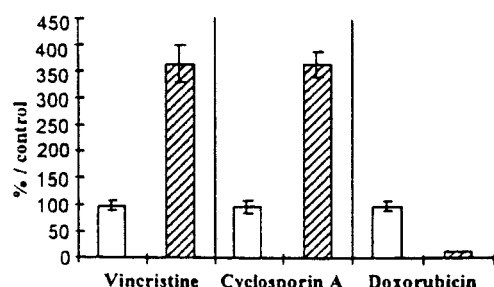


Fig. 3. Effect of S9788 on intracellular accumulation of vincristine, cyclosporin A and doxorubicin. EC monolayers were incubated with 50 nM vincristine or 50 nM cyclosporin A or 420 nM doxorubicin for 45 min at 37°C in absence (open column) or in presence (hatched column) of 1 μ M S9788. After washing with ice-cold HEPES-buffered Ringer solution, the amount of vincristine, cyclosporin A and doxorubicin incorporated into the cells was determined. Results were expressed as a percentage compared to the control (in absence of S9788). Each point is a mean of three different filters, and the histograms are representative of 4 series of independent experiments.

45 min incubation of ECs with vincristine in association with S9788, resulted in a four-fold increase in vincristine uptake by the cells compared to incubation with vincristine alone. The same four-fold increase was observed with cyclosporin A associated with S9788. However, when the same experiment was performed with doxorubicin, a decrease in the uptake of doxorubicin was observed when doxorubicin was associated with S9788.

Transendothelial Transport of Vincristine, Cyclosporin A and Doxorubicin Across Brain Capillary EC Monolayers

When 1 μ M S9788 was added to vincristine, transendothelial transport of vincristine increased 3-fold (Fig. 4), but there was no increase in the transport of cyclosporin A across the EC monolayers when cells were incubated with both cyclosporin A and 1 μ M S9788, compared to cyclosporin A alone. Transport of doxorubicin increased 2-fold in presence of S9788.

As S9788 failed to increase the cellular accumulation of doxorubicin after 45 min experiment, but allowed an increase in the transport of doxorubicin, a toxic effect was suspected. Since endothelial permeability coefficients for sucrose and inulin were not affected in the presence of doxorubicin alone or in the presence of S9788 alone, we wondered whether the association of these two drugs could disturb the monolayer integrity.

Transport assays using brain capillary EC monolayers were compared for [¹⁴C]-doxorubicin+[³H]-inulin and for [¹⁴C]-doxorubicin+unlabeled 1 μ M S9788 + [³H]-inulin. As shown in Fig. 5, when clearance was plotted versus time, the slope of the clearance curve was linear up to 45 min for doxorubicin and inulin in the absence of S9788. But, when S9788 was associated to doxorubicin and inulin, a dramatic increase in the permeability of the monolayers was observed after 30 min for both doxorubicin and inulin, corresponding to a 2-fold increase in doxorubicin transport (Fig. 5) This increase was similar to the one observed when doxorubicin and S9788 were associated for a 45 min experiment (Fig. 4). The increase for inulin showed that after a 30 min experiment, a disruption of the monolayer integrity occurred.

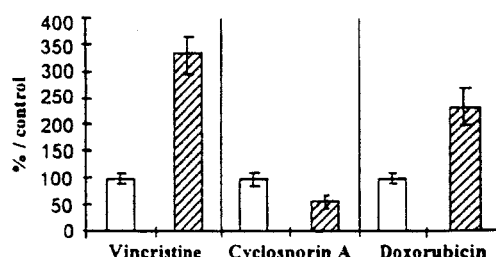


Fig. 4. Effect of S9788 on apical-to-basal transport of vincristine, cyclosporin A and doxorubicin. Confluent EC monolayers were incubated with 50 nM vincristine or 50 nM cyclosporin A or 420 nM doxorubicin for 45 min at 37°C in absence (open column) or in presence (hatched column) of 1 μ M S9788. Transendothelial transports were measured by counting the amount of vincristine, cyclosporin A and doxorubicin in the basal compartments. Results were expressed as a percentage compared to the control (in absence of S9788). Each point is a mean of three different filters, and the histograms are representative of 4 series of independent experiments.

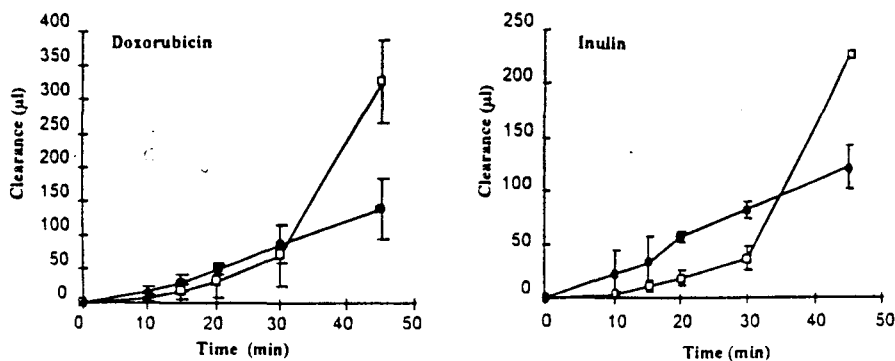


Fig. 5. Effect of association of doxorubicin + S9788 on the integrity of the EC monolayer. Transport assays using brain capillary EC monolayers were compared for doxorubicin + inulin (•) chosen as indicator of the functional integrity of tight junctions and for doxorubicin + S9788 + inulin (□). Clearances of doxorubicin and inulin were plotted versus time in the two conditions. Each point is a mean of three different filters, and the curves are representative of 4 series of independent experiments.

When clearance versus time was plotted for [^3H]-vincristine + unlabeled $1\text{ }\mu\text{M}$ S9788 + [^{14}C]-sucrose, the slope was linear up to 45 min, allowing the calculation of the permeability coefficient of ECs for sucrose in presence of vincristine and S9788. The values ($P_{\text{sucrose}} = 0.39 \pm 0.05 \times 10^{-3}\text{ cm/min}$ with vincristine + S9788) were in the same range as those obtained for sucrose associated with vincristine alone ($P_{\text{sucrose}} = 0.31 \pm 0.06 \times 10^{-3}\text{ cm/min}$). These results suggest that in this case, the 3-fold increase in vincristine transport in the presence of S9788 is not due to a breakdown of the EC monolayer.

Comparison with Verapamil

As verapamil is one of the most frequently used P-gp inhibitors, the effects of S9788 and verapamil on vincristine or cyclosporin A accumulation and transport were compared. As previously observed, a 4-fold increase in vincristine uptake and transport occurred when ECs were incubated with vincristine + S9788 (Fig. 6). The efficiency of $25\text{ }\mu\text{M}$ verapamil was not significantly different from the efficiency of $1\text{ }\mu\text{M}$ S9788

for vincristine accumulation and transport. Indeed a 3.5-fold increase in vincristine uptake and a 4.5-fold increase in vincristine transport were observed with verapamil instead of S9788. Lower concentrations than $25\text{ }\mu\text{M}$ verapamil were not as efficient as $1\text{ }\mu\text{M}$ S9788 (data not shown).

A 2.5-fold increase in cyclosporin A uptake was observed with $25\text{ }\mu\text{M}$ verapamil compared to a 3.5-fold increase with $1\text{ }\mu\text{M}$ S9788. However, a slight increase in the transport of cyclosporin A occurred with $25\text{ }\mu\text{M}$ verapamil (1.3-fold) whereas, as previously shown, S9788 did not improve the passage of cyclosporin A to the brain compartment (Fig. 7).

DISCUSSION

In previous investigations using the coculture system, it has been shown that, as *in vivo*, cyclosporin A cannot cross the *in vitro* BBB (17). It was suggested that this low permeability in the brain, despite its lipophilicity, was caused by the presence of P-gp that actively transports cyclosporin A to the outside of the ECs. It has already been shown that P-gp is expressed in

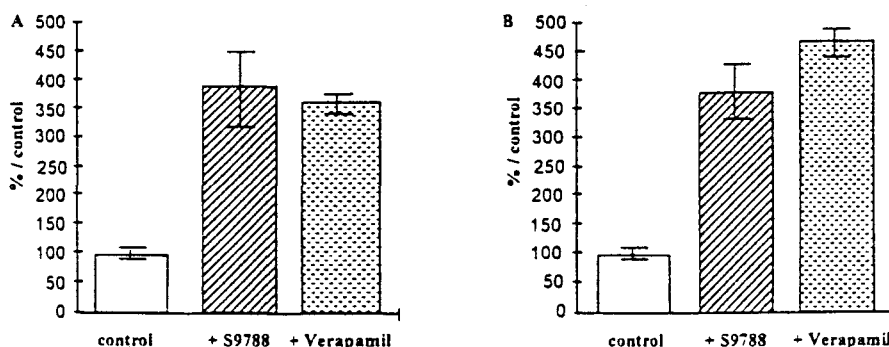


Fig. 6. Comparison of effects of verapamil and S9788 on intracellular accumulation (A) and transport (B) of vincristine. Confluent monolayers of ECs were incubated for 45 min at 37°C with 50 nM vincristine in absence (control) or in presence of $1\text{ }\mu\text{M}$ S9788 (+ S9788) or $25\text{ }\mu\text{M}$ verapamil (+ verapamil). Transendothelial transports were measured by counting the amount of vincristine in the basal compartment. After washing with ice-cold HEPES-buffered Ringer solution, the amount of vincristine incorporated into the cells was determined. Results were expressed as a percentage compared to the control. Each point is a mean of three different filters, and the histograms are representative of 3 series of independent experiments.

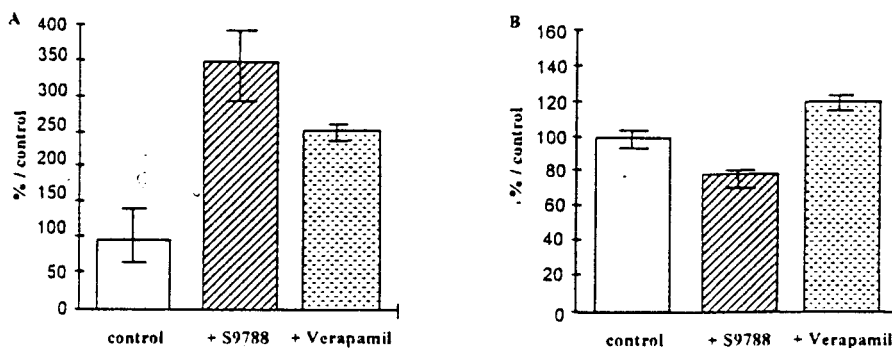


Fig. 7. Comparison of the effects of verapamil and S9788 on intracellular accumulation (A) and transport (B) of cyclosporin A. Confluent EC monolayers were incubated for 45 min at 37°C with 50 nM cyclosporin A in absence (control) or in presence of 1 μ M S9788 (+ S9788) or 25 μ M verapamil (+ verapamil). Transendothelial transports were measured by counting the amount of cyclosporin A in the basal compartment. After washing with ice-cold HEPES-buffered Ringer solution, the amount of cyclosporin A incorporation into the cells was determined. Results were expressed as a percentage compared to the control. Each point is a mean of three different filters, and the histograms are representative of 3 series of independent experiments.

solo culture of brain capillary ECs from bovine (7) and in the coculture system (21). In our experiments, low levels are present in ECs cultured in solo compared to the cocultured ECs. It is well known that BBB environment, such as the presence of glial cells, can modify BBB protein content in brain capillary ECs (14). The Western blotting experiment clearly shows that the coculture of brain capillary ECs with astrocytes upregulates EC P-gp expression. As Tatsuta *et al.* (22) have shown that P-gp expression level in brain capillary endothelium is regulated by a tissue specific factor in the brain matrix, we can suggest that this factor could be secreted by the astrocytes and trapped within the brain matrix, explaining why other tissue matrices did not have significant effects, and why this factor is specific to brain capillary ECs.

Apical-to-basal transport of vincristine, cyclosporin A and doxorubicin was measured across the EC monolayers. *In vitro* results are in agreement with *in vivo* data confirming the extremely low transport of cyclosporin A, vincristine and doxorubicin despite their high lipophilicity. These results confirm previous investigations showing a good correlation between *in vivo* brain uptake index and *in vitro* permeability coefficients (16,17).

In the brain, P-gp expressed on the luminal surface of capillary ECs, acts as an efflux pump from the endothelial cytoplasm to the blood resulting in a barrier against selected drugs. By administration of P-gp reversing agents, it could be possible to improve the P-gp mediated drug delivery to the brain. This study was designed to assess, *in vitro*, the effect of a potent P-gp inhibitor on transport across the brain capillary ECs of doxorubicin, vincristine and cyclosporin A. S9788 has previously been demonstrated to be a potent reversal of the multidrug resistance phenotype both *in vitro* and *in vivo* (20,23). In this study, the results show that S9788 is a potent inhibitor of P-gp at the BBB level by increasing the uptake of vincristine and cyclosporin A within the brain capillary ECs. Such an *in vitro* demonstration has already been made using verapamil, and has shown an increase in the uptake of cyclosporin A (6) or vincristine (7,8). In this study, 1 μ M S9788 was as efficient as 25 μ M verapamil in increasing cellular accumulation of vincristine and cyclosporin A within the cells. However, the

decrease in cellular accumulation of doxorubicin after 45 min in the presence of S9788 was surprising.

For the first time *in vitro*, it was possible to show an increase in the transport of vincristine from apical-to-basal side using 1 μ M S9788 or 25 μ M verapamil. Indeed, although it has already been shown that it is possible to increase, *in vitro*, the uptake of vincristine by brain capillary ECs, it has never been shown that vincristine is therefore able to cross the BBB. These results are in agreement with the *in vivo* results of Lemaire *et al.* (13) showing a significant increase in BBB transport of vincristine using PSC 833. In our experiment, the inhibition of P-gp efflux of vincristine by 1 μ M S9788 or 25 μ M verapamil allows a passive diffusion of vincristine across the EC monolayer without any disruption.

Although it was possible to increase the uptake of cyclosporin A within the cells using S9788, it was impossible to increase its apical-to-basal transport across brain capillary EC monolayers, cyclosporin A remaining blocked within the cells. Two reasons could explain the exceptionally low distribution of cyclosporin A into the brain and our failure to increase the transport of cyclosporin A across the brain capillary ECs *in vitro*. Even if P-gp mediated efflux from brain capillary ECs has been well documented for cyclosporin A (6), sequestration of cyclosporin A in brain capillary ECs has also been described (24). Indeed brain capillary ECs possess numerous mitochondria with intracellular binding sites for cyclosporin A such as calmodulin (25) and cyclophilin (26). These results disagree with those of Lemaire *et al.* (13). Coadministering PSC 833 as a reversing agent and cyclosporin A to rats, they showed a significant enhancement of cyclosporin A BBB transport.

In the same way, in this study, by using 25 μ M verapamil we were not able to increase significantly cyclosporin A transport across brain capillary ECs. These results are in agreement with those of Shirai *et al.* (6) who mentioned that distribution of cyclosporin A in mice brains did not increase significantly when inhibitors of P-gp were administered before cyclosporin A. *In vitro*, similar results were reported by Saeki *et al.* (27) using porcine kidney epithelial cells. As cyclosporin A has been described to be neurotoxic when it penetrates the brain parenchyma (28), the low penetration of cyclosporin A into the

brain, even in the presence of P-gp inhibitors, could be considered as an advantageous effect.

The rupture of the EC monolayers incubated in the presence of S9788 and doxorubicin was shown using inulin. This breakdown may explain the increase in doxorubicin transport to the abluminal side. These results give support to the observation that a patient who was undergoing chronic cyclosporin A therapy, presented with neurological symptoms and coma, after doxorubicin administration (29). Like S9788, cyclosporin A is known to be a potent inhibitor of P-gp (30). The authors concluded that extreme caution should be given when doxorubicin is administered to a patient presenting with a cancer and undergoing cyclosporin A therapy. Indeed doxorubicin concentration in brain tissue of 4-month cyclosporin A treated rats increased after a single injection of doxorubicin (29). Rats presented neurological disorders. Ohnishi *et al.* (9) increased the uptake of doxorubicin, by decreasing the ATP content of cultured ECs. In that case no cytotoxic effect was mentioned. Indeed by recovering intracellular ATP content, uptake was rapidly reversed. In our study, it is the association of the two components S9788 and doxorubicin, which causes a cytotoxic effect, and consequently a disruption of the *in vitro* BBB.

To summarize, we have shown that, P-gp is expressed in cultured ECs and moreover upregulated in presence of astrocytes. As *in vivo*, despite their high lipophilicity, vincristine, cyclosporin A and doxorubicin cannot cross brain capillary EC monolayers. The main subject of this study was to check whether, using reversing agents (S9788 and verapamil), we could study the transport of P-gp dependent drugs across the BBB and predict the possibility for these drugs to reach the brain parenchyma. We have shown that the incubation of ECs with vincristine in association with S9788 resulted in a four fold-increase in vincristine uptake by the cells. Moreover, an increase in the BBB permeability for vincristine was observed. The same results were obtained with 25 μ M verapamil. Such observations are of importance since it has been shown that in the brain, P-gp is expressed in the ECs of the tumor capillaries excluding chemotherapeutic agents from tumor cells that are located around the capillaries. On the other hand, the association of S9788 with cyclosporin A increased its uptake four-fold but failed to increase its BBB permeability.

The incubation of ECs with doxorubicin, in association with S9788, caused a disruption of EC monolayer that could trigger off neurological disorders if it occurred *in vivo*. Thus, the technique of opening the BBB using a reversing agent has been carefully studied with the *in vitro* BBB. Opening by inhibition of P-gp or the breakdown of the BBB were distinguished.

By administering a P-gp reversing agent, it may be possible to improve the P-gp mediated drug delivery to brain tumors. On the other hand, by attempting to restore the sensitivity of a resistant peripheral tumor by the administration of a P-gp reversing agent, an increase in the neurotoxicity of the chemotherapeutic agent could occur. As the modulating agent and the cytotoxic must be chosen carefully, the *in vitro* system of the BBB could be useful for easy and rapid test of newly developed reversing agents. Indeed the search for novel and more potent modulators of P-gp is of major importance, because most of the P-gp inhibitors currently known cause side effects *in vivo*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Philippe Poulain for his technical assistance.

REFERENCES

1. C. Boaziz, J. L. Breau, J. F. Morère and L. Israël. La barrière hémato-encéphalique: implications dans la chimiothérapie des tumeurs cérébrales. *Pathologie Biologie*. 39:789-795 (1991).
2. W. T. Cefalu and W. M. Pardridge. Restrictive transport of a lipid soluble peptide (cyclosporin) through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 44:1954-1956 (1985).
3. D. J. Begley, L. K. Squires, B. Zlokovic, D. M. Mitrovic, C. C. W. Hughes, P. A. Revest, and J. Greenwood. Permeability of the blood-brain barrier to the immunosuppressive cyclic peptide cyclosporin A. *J. Neurochem.* 55:1222-1230 (1990).
4. V. A. Levin. Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J. Med. Chem.* 23:682-684 (1980).
5. C. Cordon-Cardo, J. P. O'Brien, D. Casals, L. Rittman-Grauer, J. L. Biedler, M. R. Melamed, and J. R. Bertino. Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:695-698 (1989).
6. A. Shirai, M. Naito, T. Tatsuta, J. Dong, K. Hanaoka, K. Mikami, T. Oh-hara, and K. Tsuruo. Transport of cyclosporin A across the brain capillary endothelial cell monolayer by P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*. 1222:400-404 (1994).
7. A. Tsuji, T. Terasaki, Y. Takabatake, Y. Tenda, Y. Tamai, T. Yamashita, S. Moritani, T. Tsuruo, and J. Yamashita. P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Life Sci.* 151:1427-1437 (1992).
8. T. Tatsuta, M. Naito, T. Oh-hara, I. Sugawara, and T. Tsuruo. Functional involvement of P-glycoprotein in blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* 267:20383-20391 (1992).
9. T. Ohnishi, I. Tamai, K. Sakanaka, A. Sakata, T. Yamashita, J. Yamashita, and A. Tsuji. *In vivo* and *in vitro* evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier. *Biochemical Pharmacology* 49:1541-1544 (1995).
10. K. Toth, M. M. Vaughan, N. S. Peress, H. K. Slocum, and Y. M. Rustum. MDR1 P-glycoprotein is expressed by endothelial cells of newly formed capillaries in human gliomas but is not expressed in the neovasculature of other primary tumors. *Am. J. Pathol.* 149:853-858 (1996).
11. Y. Tanaka, Y. Abe, A. Tsugu, Y. Takamiya, A. Akatsuka, T. Tsuruo, H. Yamazaki, Y. Ueyama, O. Sato, N. Tamaoki, and M. Nakamura. Ultrastructural localization of P-glycoprotein on capillary endothelial cells in human gliomas. *Virchows Arch.* 425:133-138 (1994).
12. N. Drion, M. Lemaire, J. M. Lefauconnier, and J. M. Scherrmann. Role of P-glycoprotein in the blood-brain transport of colchicine and vinblastine. *J. Neurochem.* 67:1688-1693 (1996).
13. M. Lemaire, A. Bruehlisauer, P. Guntz, and H. Sato. Dose-dependent brain penetration of SDZ PSC 833, a novel multidrug resistance-reversing cyclosporin, in rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 38:481-486 (1996).
14. M. P. Dehouck, S. Méresse, P. Delorme, J. C. Fruchart, and R. Cecchelli. An Easier Reproducible, and Mass-Production Method to Study the Blood-Brain Barrier *In Vitro*. *J. Neurochem.* 54:1798-1801 (1990).
15. B. Dehouck, L. Fenart, M. P. Dehouck, A. Pierce, G. Torpier, and R. Cecchelli. A new function for the LDL receptor: transcytosis across the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 138:877-889 (1997).
16. M. P. Dehouck, P. Jolliet-Riant, F. Brée, J. C. Fruchart, R. Cecchelli, and J. P. Tillet. Drug Transfer Across the Blood-Brain Barrier: Correlation Between *In Vitro* and *In Vivo* Models. *J. Neurochem.* 58:1790-1797 (1992).
17. M. P. Dehouck, B. Dehouck, C. Schluep, J. C. Fruchart, M. Lemaire, and R. Cecchelli. Drug transport to the brain: comparison between *in vitro* and *in vivo* models of the blood-brain barrier. *Eur. J. Pharmaceutical Sciences*. 3:357-365 (1995).

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.* 53:1363–1371 (1989).
19. J. Jetté, B. Têtu, and R. Béliveau. High levels of P-glycoprotein detected in isolated brain capillaries. *Biochim. Biophys. Acta.* 1150:147–154 (1993).
20. A. M. Julia, H. Roché, M. Berlion, C. Lucas, G. Milano, J. Robert, J. P. Bizzari, and P. Canal. Multidrug resistance circumvention by a new triazinoaminopiperidine derivative S9788 *in vitro*: definition of the optimal schedule and comparison with verapamil. *Br. J. Cancer.* 69:868–874 (1994).
21. B. Joly, V. Lecureur, C. Puozzo, A. Guillouzo, and O. Fardel. Involvement of P-glycoprotein in an *in vitro* blood-brain barrier model. *Int. J. Oncol.* 9:1029–1033 (1996).
22. T. Tatsuta, M. Naito, K. Mikami, and T. Tsuruo. Enhanced expression by the brain matrix of P-glycoprotein in brain capillary endothelial cells. *Cell growth and differentiation.* 5:1145–1152 (1994).
23. S. Cros, N. Guilbaud, M. Berlion, T. Dunn, G. Regnier, A. Dhainaut, G. Atassi, and J. P. Bizzari. *In vivo* evidence of a complete circumvention of vincristine resistance by a new triazinoaminopiperidine derivative S9788 in P388/VCR leukemia model. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 30:491–494 (1992).
24. 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.* 253:884–889 (1990).
25. J. A. Tumlin. Expression and function of calcineurin in the mammalian nephron: physiological roles, receptor signaling, and ion transport. *Am. J. Kidney Dis.* 30:884–895 (1997).
26. H. Ke, D. Mayrose, P. J. Belshaw, D. G. Alberg, S. L. Schreiber, Z. Y. Chang, F. A. Etzkorn, S. Ho, and C. T. Walsh. Crystal structures of cyclophilin A complexed with cyclosporin A and N-methyl-4-[(E)-2-butenyl]-4,4-dimethylthreonine cyclosporin A. *Structure* 2:33–44 (1994).
27. T. Saeki, K. Ueda, Y. Tanigawarab, R. Hori, and T. Komano. Human P-glycoprotein transports cyclosporin and FK506. *J. Biol. Chem.* 268:6077–6080 (1993).
28. K. Atkinson, J. Biggs, P. Darveniza, J. Boland, A. Concannon, and A. Dodds. Cyclosporine-associated central nervous system toxicity after allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation* 38:34–37 (1984).
29. T. Barbui, A. Rambaldi, L. Parenzan, M. Zucchelli, N. Perico, and G. Remuzzi. Neurological symptoms and coma associated with doxorubicin administration during chronic cyclosporin therapy. *The Lancet* 339: 421 (1992).
30. I. Tamai and A. R. Safa. Competitive interactions of cyclosporins with the vinca alkaloid-binding site of the P-glycoprotein in multidrug-resistance cells. *J. Biol. Chem.* 265:16509–16513 (1990).

CONCLUSIONS DE L'ARTICLE 1

L'ensemble de ces résultats montre que comme *in vivo*, les **cellules endothéliales *in vitro* expriment la P-gp**. Son expression est augmentée en présence d'astrocytes ; le modèle de coculture se rapprochant encore ainsi des conditions *in vivo*.

De plus, **cette protéine est fonctionnelle**, empêchant l'entrée de xénobiotiques vers le parenchyme cérébral, elle participe à ce que Betz a appelé la barrière métabolique.

Enfin, il est possible grâce à des agents spécifiques d'inhiber l'activité de la P-gp et espérer ainsi améliorer le passage de médicaments comme les anticancéreux vers le cerveau. Toutefois, cette inhibition peut avoir, en fonction de l'anticancéreux et de l'agent inhibiteur étudié, des conséquences différentes sur l'entrée du médicament vers le cerveau, mais aussi sur la l'intégrité de la BHE. En résumé, les résultats obtenus pour la vincristine, la cyclosporine et la doxorubicine peuvent être schématisé de la manière suivante :

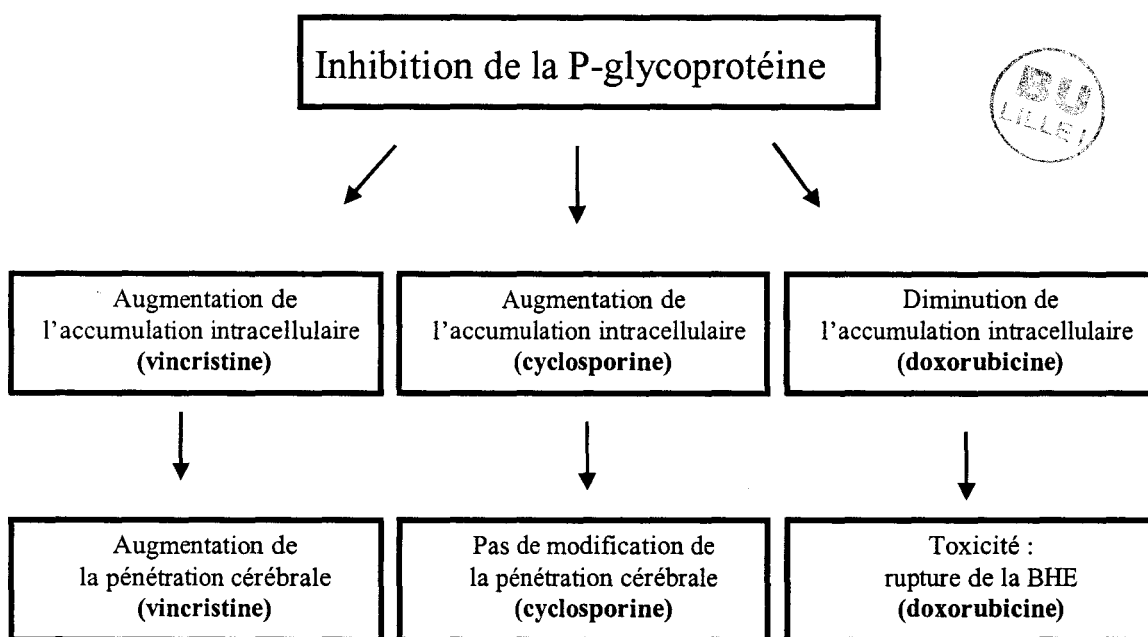


Figure 28 : Conséquences de l'inhibition de la P-glycoprotéine.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats aura permis de prouver **qu'il est indispensable de tester *in vitro* chaque combinaison de médicaments, anticancéreux et inhibiteur de la P-gp, avant toute utilisation clinique ; ceci fait de notre modèle, un modèle**

pertinent pour tester et comparer rapidement les effets de nouveaux inhibiteurs de la P-gp. Enfin, la mise en évidence de la P-gp dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux aura aussi permis de **contribuer à une meilleure caractérisation du modèle, faisant de celui-ci un modèle d'étude de la BHE aux caractéristiques proches de celles décrites *in vivo*.**

Si la perméabilité paracellulaire est bien caractérisée sur notre modèle de BHE *in vitro*, les modalités de transport transendothéliaux dépendants de récepteurs ont été peu étudiées. L'étude des différents **mécanismes impliqués dans le transport transendothélial** a fait l'objet de la deuxième partie de nos travaux.

II. ETUDE DES MECANISMES DE TRANSPORT TRANSCELLULAIRE AU NIVEAU DE LA BHE

Les mécanismes de transport au niveau de la BHE ont été principalement étudiés *in vivo* et *in vitro* sur capillaires isolés. Ces deux approches expérimentales ont permis de mettre en évidence le transport, du sang vers le cerveau, de molécules de petites tailles telles que le glucose et les acides aminés, mais aussi de macromolécules telles que l'insuline.

Cependant, ces études ne permettent pas d'aborder les mécanismes précis de ces transports. En effet, même si les capillaires isolés apportent des informations complémentaires à celles obtenues *in vivo*, ceux-ci présentent des capacités de synthèse d'ATP réduites, ce qui rend difficile les études de transport (Lasbennes et Gayet, 1984). De plus, cette approche permet uniquement l'étude des transporteurs situés sur la face abluminale des capillaires.

Présentant de nombreuses caractéristiques de l'endothélium *in vivo*, le modèle de BHE *in vitro* utilisé au laboratoire s'avère être intéressant pour étudier le passage de molécules vers le cerveau.

Afin de **caractériser les mécanismes de transport transcellulaire des cellules endothéliales du modèle, nous avons choisi d'étudier celui des LDL**. En effet, la mise en évidence d'un récepteur apo (B, E) face luminale des cellules endothéliales de capillaires cérébraux et la capacité des astrocytes à en réguler l'expression, ont permis d'envisager l'intervention de ce récepteur dans le transport vers le cerveau des lipides incorporés dans des lipoprotéines.

ARTICLE 2

Une nouvelle fonction du récepteur aux LDL : transcytose des LDL à travers la barrière hémato-encéphalique.

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 à la synthèse de leur membrane. L'expression du récepteur est régulée par la concentration en LDL dans le milieu de culture. Elle est élevée en milieu dépourvu de LDL et réduite en présence de fortes concentrations. La cellule, en contrôlant la synthèse de ce récepteur, s'adapte ainsi au milieu extracellulaire afin de subvenir à ses besoins.

Lorsque les cellules 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, s'accompagne d'une réduction du métabolisme des LDL par les cellules endothéliales (Kenagy *et al.*, 1984).

In vivo, lorsqu'un endothélium vasculaire est intact, l'expression du récepteur apo (B, E) est inhibée à la fois par la présence de LDL 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)** aux caractéristiques identiques à celles décrites pour le récepteur (apoB, E) des fibroblastes humains (Méresse *et al.*, 1989).

Des études réalisées sur le modèle de BHE *in vitro* montrent que les cellules endothéliales en culture expriment un récepteur apo (B, E) et que son expression est augmentée en présence d'astrocytes (Dehouck *et al.*, 1994). Cette augmentation est encore plus importante lorsque les astrocytes ont été préalablement carencés en cholestérol. L'ensemble de ces résultats laisse supposer que le cholestérol pourrait provenir, au moins en partie, d'un apport périphérique via un transport à travers la BHE.

L'étude du transport des LDL réalisée sur notre modèle de BHE *in vitro* nous a permis d'établir les résultats suivants :

1 : Les LDL fixées au récepteur apo(B,E) sont internalisées dans les cellules endothéliales (Figure 2).

2 : A l'inverse des LDL acétylées dirigées vers les lysosomes de la cellule pour y être dégradées, les LDL natives ne suivent pas cette voie de dégradation (Figure 3A). Les études d'inhibition compétitive montrent que les LDL natives et acétylées se fixent sur des récepteurs différents (Figure 3B).

3 : Les études de transport montrent qu'après internalisation, les LDL marquées à l'iode sont relarguées face abluminale des cellules endothéliales. Ce transport est inhibé par un excès de LDL non radioactives ; il est donc **spécifique** (Figure 4). Le transport des LDL s'effectue principalement de la face luminale vers la face abluminale des cellules puisque aucune fixation spécifique n'a pu être observée face abluminale des cellules.

4 : L'hypothèse d'une transcytose dépendante du récepteur apo(B,E) a pu être confirmée. Elle est étayée par les résultats suivants :

- l'inhibition du transport par incubation des cellules en présence à la fois de LDL et de l'anticorps monoclonal C7, qui bloque la fixation des LDL au **récepteur apo(B, E)** (Figure 5).

- contrairement au transport du saccharose, **le transport des LDL est totalement inhibé à 4°C**. Ceci démontre que le passage des LDL du compartiment luminal vers le compartiment abluminal ne résulte pas d'une simple diffusion paracellulaire mais **nécessite de l'énergie** (Figure 6).

5 : L'induction de l'expression du récepteur apo(B, E), en cultivant les cellules endothéliales en présence d'astrocytes carencés en cholestérol, est suivie d'une **augmentation du transport des LDL** à travers la monocouche de cellules endothéliales (Figure 7). Cette augmentation de transport est confirmée par nos observations de

microscopie à fluorescence puisque l'on note une augmentation de l'endocytose des LDL dans les cellules cultivées en présence d'astrocytes carencés en cholestérol (Figure 8).

6 : Les études du trafic intracellulaire en microscopie électronique montrent que les LDL sont internalisées dans des puits non recouverts de clathrine de type **cavéoles**. Ces observations ont été confirmées par nos études de microscopie à fluorescence qui montrent que **l'endocytose des LDL est inhibée par la filipine**, molécule connue pour déstructurer les cavéoles (Figure 9). Nous avons en outre vérifié que la filipine ne modifiait pas la fixation des LDL à leur récepteur. En effet, **La filipine n'a aucun effet sur l'endocytose des LDL de cellules en phase exponentielle de croissance** (Figure 9 C et D). En effet, dans les cellules en croissance les LDL suivent la voie classique de dégradation : puits recouverts de clathrine et lysosomes.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats laisse supposer que **les cavéoles interviennent dans le transport des LDL à travers la BHE**.

7 : **L'inhibition de l'endocytose par la filipine est réversible** ; ce qui démontre que dans les conditions expérimentales utilisées, la filipine n'altère pas les fonctions vitales des cellules (Figure 9A et B).

8 : le « switch » dans le rôle du récepteur apo(B, E) (dégradation dans les cellules en croissance et transcytose dans les cellules différenciées), n'est pas du à des modifications de la séquence cytoplasmique du récepteur contenant les signaux d'internalisation. **En effet, dans les cellules en croissance comme dans les cellules différenciées, les séquences des ARN messagers codant pour les signaux d'internalisation du récepteur aux LDL sont identiques.**

A New Function for the LDL Receptor: Transcytosis of LDL across the Blood-Brain Barrier

Bénédicte Dehouck,* Laurence Fenart,* Marie-Pierre Dehouck,* Annick Pierce,† Gérard Torpier,* and Roméo Cecchelli*

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U325, Department of Atherosclerosis Institut Pasteur, 59000 Lille, France; and †Laboratoire de Chimie biologique (UMR 111), Université des Sciences et Technologies de Lille I, 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex, France

Abstract. Lipoprotein transport across the blood-brain barrier (BBB) is of critical importance for the delivery of essential lipids to the brain cells. The occurrence of a low density lipoprotein (LDL) receptor on the BBB has recently been demonstrated. To examine further the function of this receptor, we have shown using an in vitro model of the BBB, that in contrast to acetylated LDL, which does not cross the BBB, LDL is specifically transcytosed across the monolayer. The C7 monoclonal antibody, known to interact with the LDL receptor-binding domain, totally blocked the transcytosis of LDL, suggesting that the transcytosis is mediated by the receptor. Furthermore, we have shown that cholesterol-depleted astrocytes upregulate the expression of the LDL receptor at the BBB. Under these conditions, we observed that the LDL transcytosis parallels the increase in the LDL receptor, indicating once more that

the LDL is transcytosed by a receptor-mediated mechanism. The nondegradation of the LDL during the transcytosis indicates that the transcytotic pathway in brain capillary endothelial cells is different from the LDL receptor classical pathway. The switch between a recycling receptor to a transcytotic receptor cannot be explained by a modification of the internalization signals of the cytoplasmic domain of the receptor, since we have shown that LDL receptor messengers in growing brain capillary ECs (recycling LDL receptor) or differentiated cells (transcytotic receptor) are 100% identical, but we cannot exclude posttranslational modifications of the cytoplasmic domain, as demonstrated for the polymeric immunoglobulin receptor. Preliminary studies suggest that caveolae are likely to be involved in the potential transport of LDL from the blood to the brain.

THE maintenance of the homeostasis of brain interstitial fluid, which constitutes the special microenvironment for neurons, is established by the presence of the blood-brain barrier (BBB)¹ at the transition area from endothelial cells (ECs) to brain tissue. Of primary importance in the formation of a permeability barrier by these cells is the presence of continuous tight junctions that seal together the margins of the ECs and restrict the passage of substances from the blood to the brain. Furthermore, in contrast to ECs in many other organs, the brain capillary ECs contain no direct transendothelial passageways such as fenestrations or channels. But obviously, the BBB cannot be absolute. The brain is dependent upon the blood to deliver metabolic substrates and remove met-

abolic waste, and the BBB therefore facilitates the exchange 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 (Betz and Goldstein, 1978), but until now little information has come to light regarding the cerebral uptake of lipids.

There is growing evidence that the brain is equipped with a relatively self-sufficient transport system for maintaining cholesterol and lipid homeostasis. The presence of a low density lipoprotein (LDL) receptor has been demonstrated by immunocytochemistry in rat and monkey brains; and apolipoprotein (apo) E and apo AI-containing particles have been detected in human cerebrospinal fluid (Pitas et al., 1987). Furthermore, enzymes involved in lipid metabolism have been located within the brain: LCAT mRNA has been shown to be expressed in rat brains and cholesteryl ester transfer protein, which plays a key role in cholesterol homeostasis, has been detected in human cerebrospinal fluid and seems to be synthesized in the brain (Albers et al., 1992). The distribution of the LDL recep-

Please address all correspondence to Dr. Roméo Cecchelli, INSERM U325, Institut Pasteur, 590019 Lille Cédex, France. Tel.: (33) 3-20-87-73-81; Fax: (33) 3-20-8773-60; E-mail: romeo.cecchelli@pasteur-lille.fr

1. *Abbreviations used in this paper:* acLDL, acetylated LDL; BBB, blood-brain barrier; EC, endothelial cell; LDL, low density lipoprotein.

tor-related protein, a multifunctional receptor that binds apoE, is highly restricted and limited to the gray matter, primarily associated with neuronal cell population (Wolf et al., 1992). The difference in cellular expression of ligand (apoE) and receptor (LDL receptor-related protein) may provide a pathway for intracellular transport of apoE-containing lipoproteins in the central nervous system. All these data leave little doubt that the brain is equipped with a relatively self-sufficient transport system for cholesterol.

Cholesterol could be derived from *de novo* synthesis within the brain and from plasma via the BBB. 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 provoke appropriate modifications in its activity. Méresse et al. (1989a) provided direct evidence for the occurrence *in vivo* of an LDL receptor on the endothelium of brain capillaries. Furthermore, the fact that enzymes involved in the lipoprotein metabolism are present in the brain microvasculature (Brecher 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. Owing to the fact that the neurological abnormalities that result from the inadequate absorption of dietary vitamin E can be improved by the oral administration of pharmacological doses of vitamin E, Traber and Kayden (1984) have suggested that LDL functions as a transport system for tocopherol to the brain. Furthermore, the trace amounts of apolipoprotein B that were detected by Salem et al. (1987) in cerebrospinal fluid from healthy patients using a very sensitive immunoblot technique confirm that, at most, small amounts of apolipoprotein B normally pass through the BBB. However, whether LDL is involved in the exchange is not known.

Using an *in vitro* model of the BBB that imitates an *in vivo* situation by culturing capillary ECs and astrocytes on opposite sides of a filter (Dehouck et al., 1990a, 1992), we have demonstrated that in culture, like *in vivo*, in contrast to peripheral endothelium and in spite of the tight apposition of ECs and their contact with physiological concentrations of lipoproteins, brain capillary ECs express an LDL receptor (Méresse et al., 1991; Dehouck et al., 1994). The capacity of ECs to bind LDLs is greater when cocultured with astrocytes than in their absence. Furthermore, we have shown 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 suggest that cholesterol used by cells in the central nervous system may be derived, at least in part, from the periphery via transport across the BBB.

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 recep-

tor-mediated transcytosis. Preliminary results pinpoint the role of caveolae in the transcellular transport of LDL across the brain endothelium.

Materials and Methods

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 the obtainment of 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 µg/ml gentamycin, and bFGF [basic fibroblast growth factor]; 1 ng/ml, added every other day).

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, Institut Pasteur, Lille, France) were cultured like the bovine brain capillary ECs.

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 Boehler and Sensenbrenner (1972). Astrocytes were plated on six multiwell dishes (Nunc; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) at a concentration of 1.2×10^5 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 were stabilized and 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. Preparation of filters for coculture: culture plate inserts (Millicell-CM 0.4 µm; 30-mm diam; Millipore Corp., Milford, MA) 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 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 4×10^5 cells/ml for bovine brain capillary ECs and adrenal cortex ECs. The medium used for the coculture was DME supplemented with 15% CS, 2 mM glutamine, 50 µg/ml gentamycin, and 1 ng/ml bFGF. 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.

Fluorescence Microscopy

Endothelial cells grown on porous filters were fixed at room temperature for 20 min with 4% paraformaldehyde in a fibrous component-stabilizing buffer (PHEMS; 60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, and 140 mM NaCl, pH 6.9). After being washed 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 filamentous actin probe, bodipy-phalloidin (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; 165 nM, 30 min, at room temperature). Mitotracker CMX Ros coloration was carried out as indicated by the manufacturer (Molecular Probes, Inc.). 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 Labs., S. San Francisco) diluted in Tris-HCl-buffered saline (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, pH 7) containing 5% (wt/vol) ovalbumin and 1% heat-inactivated normal goat serum. Subsequently, the cells were incubated for 1 h at room temperature with the appropriate combination of fluorescently labeled secondary antibodies and propidium iodide (2 µg/ml). For the luminal uptake of DiI (0.1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine percholate)-LDL, the ECs were incubated for 45 min at 37°C in prewarmed DME, 5% LPDS (lipoprotein deficient serum) with DiI-LDL (35 µg/ml). The inhibition of DiI-LDL uptake was performed in the presence of filipin. The cells were pretreated with 3 µg/ml filipin for 10 min at 37°C, washed, and incubated with DiI-LDL. In the case of the study of the reversibility of filipin treatment effect, ECs were incubated for 1 h at 37°C in serum-containing medium before the addition of DiI-LDL. All incubations were terminated by three washes in ice-cold Pipes-Hepes buffer and immediately fixed with 4% paraformaldehyde.

After the final washes, the filters and their attached monolayers were

mounted on glass microscope slides using Mowiol mountant (Hoechst, Frankfurt, Germany) containing *p*-phenylene diamine (0.1%, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) anti-quenching agent. All specimens were studied using a fluorescence microscope. (DMRB; Leica Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar, Germany), and pictures were taken on Kodak Tmax film.

Preparation of Low Density Lipoproteins, 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 ^{125}I -LDL, which was used within 10 d of preparation, ranged from 300 to 400 cpm/ng protein. LPDS was prepared from calf serum by ultracentrifugation at the density of 1.25 adjusted with solid KBr. LPDS was extensively dialyzed at 4°C against DME.

Preparation of Fluorescently Labeled Lipoprotein and Lipoprotein–Gold Complex

The fluorescent probe chosen is DiI (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine percholate). The lipoprotein concentration should be between 1 and 2 mg lipoprotein/ml in saline-EDTA. 2 ml of lipoprotein-deficient serum is added to each 1 mg of lipoprotein to be labeled with DiI. The solution is then filtered (0.45 μm for LDL) through Millex-PF filters. The solution is gently shaken, and 50 μl of DiI in DMSO (3 mg/ml) is added per mg of lipoprotein. The mixture is incubated for 15–20 h at 37°C. The LDLs are reisolated from the incubation mixture by ultracentrifugation at the density of 1.063. The density of 1.063 is obtained by adding 0.0834 g of KBr for each ml of incubation mixture. LDLs are reisolated using a four-rotor centrifuge (TL100; Beckman Instr., Fullerton, CA) at 100,000 rpm for 2 h at 10°C. After centrifugation, the LDLs are dialyzed against saline-EDTA.

Freshly isolated LDL with 16-nm colloidal gold was labeled according to the method of Handley et al. (1981).

^{125}I -LDL and ^{125}I -acLDL Binding

ECs were incubated for 2 h at 4°C with DME, 10 mM Hepes, 0.2% BSA, and 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of ^{125}I -LDL and ^{125}I -acLDL were added in the upper or lower compartment. At the end of the incubation, the cells were washed nine times at 4°C: three times with 4 ml of PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$); three times with 4 ml of PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) containing 0.2% BSA; three times with 4 ml of PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$). EC-associated radioactivity was then determined by removing the membrane of the culture insert and counting it in a γ counter. Nonspecific binding was determined by incubating the cells with ^{125}I -lipoproteins and a 20-fold excess of unlabeled related lipoproteins. Binding is expressed in ng/cm², since one filter of 4.2 cm² represents 90 μg of cellular protein.

Studies of Lipoprotein Transport Through Brain Capillary EC Monolayers

Passage of ^{125}I -LDL or Acetylated ^{125}I -LDL through Brain Capillary EC Monolayers. The passage of lipoproteins through brain capillary EC monolayers was studied using the coculture model, as described above. ECs seeded on collagen-coated filters were cultured with astrocytes for 12 d. Each filter was then transferred to a six multiwell dish containing 2 ml of DME with 15% LPDS (lower compartment). At time zero, a known amount of the iodinated lipoprotein (usually 35 μg protein/ml) in DME with 15% LPDS was added on the luminal face of an EC monolayer (upper compartment; 700 μl). During the experiments, the monolayers were kept at 37°C. At several time points, filters were transferred to the next well. At the end of the experiment, all lower and upper compartments were collected. Precipitation of samples by trichloroacetic acid was performed. The determination of the total ^{125}I -LDL passage was performed by counting, in a γ counter, the acid-precipitable fractions of the lower compartments. Nonspecific passage was determined by incubating the cells with ^{125}I -LDL and a 20-fold excess of unlabeled LDL. Specific transport was calculated by subtracting the nonspecific from the total transport.

Passage rates were expressed in ng LDL/cm². The filter permeability to LDL was carried out with collagen-coated filters.

Degradation of ^{125}I -LDL or Acetylated ^{125}I -LDL during the Transcytosis. For the determination of the degradation of LDLs during their passage (5 h) through EC monolayers, acid-soluble fractions from upper and lower compartment samples were separated by centrifugation from acid-precipitable fractions; AgNO₃ (5%) precipitation was then performed to correct for free ^{125}I . AgNO₃-soluble fractions were counted in a γ counter. Nonspecific degradation was determined by incubating the cells with ^{125}I -LDL and a 20-fold excess of unlabeled LDL. Total degradation was corrected for nonspecific flux giving the specific LDL degradation. Degradation rates are expressed in ng LDL/mg cell protein.

Degradation of Transcytosed ^{125}I -LDL by Astrocytes. The degradation of transcytosed ^{125}I -LDL by astrocytes was performed using the coculture situation. 1 ml of medium containing 35 μg of labeled LDL was added in the upper compartment and 2.5 ml of medium containing 10% LPDS in the lower one. The coculture (i.e., ECs and astrocytes) was kept at 37°C for 16 h. Degradation was carried out as described above. Nonspecific degradation was determined by adding 3 μg of unlabeled LDL in the lower compartment, which represents a 10-fold excess owing to the passage of ~ 100 ng for 5 h/cm². Control experiments were carried out with ECs separated from astrocytes.

Effect of Temperature on ^{125}I -LDL Transport. The ^{125}I -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 min with different concentrations (1 and 0.1 mg/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). ^{125}I -LDL was then added to this compartment, and the rate of LDL passage was determined as described above. Irrelevant IgGs directed against apolipoprotein AI (1 mg/ml) were used as a control.

Modulation of the Transcytosis by the Lipid Composition of Astrocytes. The induction of LDL receptor expression (Dehouck et al., 1994) can be described in four phases: (a) coculture phase; brain capillary ECs and astrocytes were cocultured for 12 d in DME supplemented with 15% CS as described above. (b) Astrocyte LPDS phase; ECs were transferred and cocultured with other astrocytes in fresh DME supplemented with 15% calf serum. Astrocytes of the original coculture were incubated for 36 h at 37°C with DME supplemented with 10% LPDS, 2 mM glutamine, and 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamycin. As a control, astrocytes were incubated with DME supplemented with 10% FCS. (c) Induction phase; on the day of the experiment, the filter inserts with ECs, in 1.5 ml of fresh DME supplemented with 15% calf serum, 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. (d) LDL binding phase after the "induction phase," ^{125}I -LDL bindings to ECs at 4°C, ^{125}I -LDL transport, and DiI-LDL uptake experiments at 37°C were performed as described above.

Electron Microscopy Studies. After incubation at different times with gold-LDL or horseradish peroxidase, the cells were fixed routinely with 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at 4°C and post-fixed in 1% OsO₄ for 60 min. After being dehydrated in ethanol and embedded in araldite, sections perpendicular to the monolayer-cultured cells, contrasted with lead hydroxide, were examined with an electron microscope (420; Philips, Eindhoven, The Netherlands).

Sequencing of the LDL Receptor Cytoplasmic Domain Involved in the Basolateral Targeting

RNA Extraction. Total cell RNA was obtained from growing brain capillary ECs, differentiated brain capillary ECs depleted or not in cholesterol, or aortic ECs, using the guanidium-thiocyanate chloride procedure according to Sambrook et al. (1989).

RT-PCR. 5 μg of total RNA was reverse transcribed by 50 U of MMLV-reverse transcriptase (Stratagene, La Jolla, CA) in a total volume of 50 μl containing 100 μM of each dNTP, 100 ng of oligod(T)12–18, 20 U Rnasin (Promega, Madison, WI), and 10 mM dithiothreitol for 1 h at 37°C. After reverse transcription, samples were heated at 95°C for 5 min to denature the MMLV-RT and then held at –20°C until PCR.

To perform PCR, specific internal primer pairs for the bovine LDL receptor were designed using the published sequence (Russel et al., 1984) and the Primer Premier version 3.1 software (Biosoft International, Palo Alto, CA). Primer sequences were as follows: BLDLR1: 5' GAGCGTGGGTGCCCTATACA 3' and BLDLR2: 5' GGACTCAAGGCAGCA-

GCTCA 3'. PCR amplification was carried out using a thermal cycler (Maxicycler PT-100TM; MJ Research, Watertown, MA). 50 μ l of reaction mixture contained 5 μ l of first strand DNA, buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8), MgCl₂ (1.5 mM), dNTPs (40 μ M), primers (0.4 μ M), and 1.5 U Taq polymerase (Eurogentec, Seraing, Belgium). The amplification profile was 94°C, 55°C, and 72°C each for 1 min times 30 cycles, preceded by 5 min at 94°C and followed by 7 min at 72°C to ensure completion of extension. To check for contamination, PCR in the absence of DNA was used as a negative control.

Sequencing. The PCR products were visualized on ethidium bromide-stained agarose gels after electrophoresis and sequenced on both strands by an ABy prism dye terminator cycle sequencing kit on an automatic sequencer (ABI-377; Applied Biosystems, Foster City, CA).

Results

The Blood–Brain Barrier Model

Fig. 1 *A* illustrates the typical phenotypes of confluent brain capillary ECs, cocultured for 12 d with astrocytes on an insert coated with rat-tail collagen. Mitotracker coloration shows an intense staining of the cell, indicating a large amount of mitochondriae (Fig. 1 *B*). However, bodipy-phalloidin staining reveals that a delicate fluorescent network of actin filaments throughout the cytoplasm formed prominent continuous bands at cell borders (Fig. 1 *C*).

Furthermore, ZO-1 is localized at sites of cell–cell contact between ECs along the junctional complex (Fig. 1 *D*). This continuous network of ZO-1 suggests that it is associated with the tight junction barrier. These data, added to previously published results concerning the high electrical resistance (500–800 $\Omega \times \text{cm}^2$) and the low permeability (Dehouck et al., 1990a), support the fact that the coculture is a legitimate model of the BBB.

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. DiI-LDL was added to the luminal compartment and remained in contact with the cells for 45 min at 37°C. Staining obtained with an immunofluorescent microscope is shown in Fig. 2 *B*. DiI-LDL was found as small, individual, discrete vesicles throughout the cells. These results indicate that endocytotic pathways are functional in these cells. The cellular accumulation of gold-LDL was also examined by standard electron microscopy. Fig. 2, *A* and *C*, shows typical results demonstrating the accumulation of gold-LDL in early endosomes and

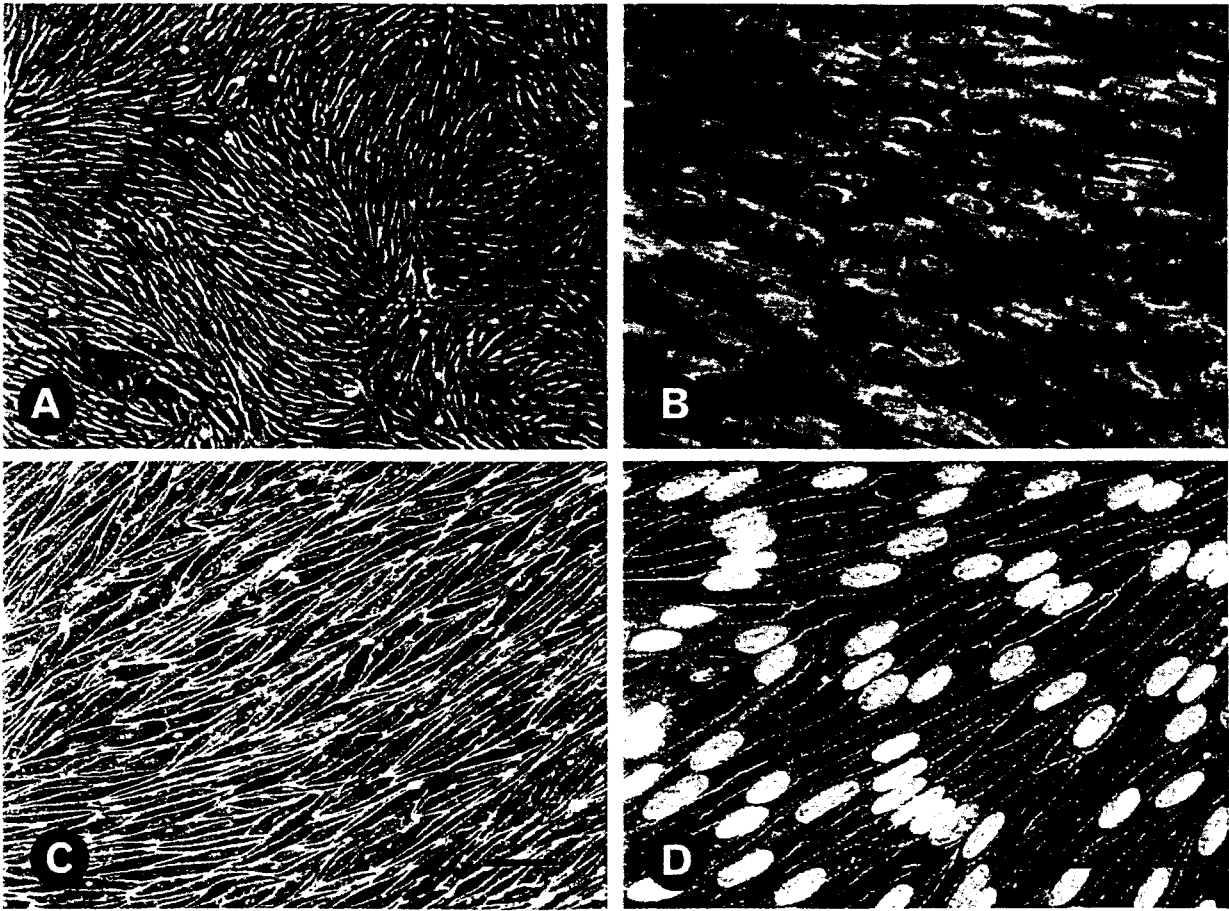


Figure 1. Characterization of brain capillary EC monolayer grown on the upper face of a collagen-coated filter. (*A*) Phase contrast micrograph of confluent brain capillary ECs. (*B*) Endothelial staining with mitochondrion-selective dye, Mitotracker CMX Ros. (*C*) Staining with F-actin probe, bodipy-phalloidin (Molecular Probes, Inc). (*D*) Localization of tight junction-associated protein ZO-1 to the plasma membrane and nuclear staining by propidium iodide. Bar, 50 μ m.

in a multivesicular body. Furthermore, a coated pit could be observed only rarely, and no accumulation of gold-LDL was observed in lysosomes.

To determine whether degradation of LDL occurs in the cells after internalization, degradation studies were carried out using LDL for a 5-h incubation at 37°C from the apical surface (Fig. 3). ^{125}I -LDL degradation by endothelial cell monolayers was measured by the appearance of the iodine-free, TCA-soluble product released during incubation. No degradation of LDL occurred during the incubation period (Fig. 3 A). The functionality of the degradative pathway was checked by carrying out the same experiment using acetylated LDL (acLDL) instead of native LDL. Acetylation of the lysine and arginine residues of the LDL results in a modified LDL particle (acLDL) that is more negative and has lost its ability to bind the (B.E) receptor and the so-called scavenger receptor. When bindings of LDL and acLDL were carried out at 4°C, no difference was observed between the binding of the two lipoproteins at the luminal surface of the monolayer (4.7 ng/cm² for LDL versus 4.2 ng/cm² for acLDL). As shown in Fig. 3 A, acLDL is actively degraded by the brain capillary ECs. This degradation is specific, since only unlabeled acLDL can compete with acLDL (Fig. 3 B), indicating a receptor-mediated degradation (scavenger receptor ligand). These results demonstrate that in brain capillary ECs, the classic degradation pathway (via lysosomes) is functional and therefore that LDL is not directed to the lysosomes after internalization.

Transport of LDL Across the Brain Capillary EC Monolayer

From the experiments described above, it appears that brain capillary ECs bind and internalize but do not degrade LDL. Transport experiments were performed to define the role of the LDL receptor. When ^{125}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 5-h incubation. The transport was examined both in the absence and in the presence of a 20-fold excess of unlabeled LDL. The toxicity of high concentrations of LDL on the integrity of the monolayer was assessed by calculating the permeability of sucrose and insulin (Dehouck et al., 1992). No effect of LDL concentrations up to 2 mg/ml was observed after an 8-h incubation ($P_e = [0.52 \pm 0.19] 10^{-3}$ cm/min for sucrose, $n = 9$). The amount of ^{125}I -LDL (trichloro-acetic precipitable) transported is expressed in terms of ng/cm², where the area refers to the surface area of the cells. Fig. 4 shows that the filter coated with rat-tail collagen and maintained for 12 d with rat astrocytes is not a barrier for the passage of LDL. An excess of unlabeled LDL competed with the transport of LDL from the apical to the basal membrane, although no evidence of saturation could be detected in concentrations of LDL ranging from 10 to 100 µg/ml. Limitations in specific activity and quantities of unlabeled LDL precluded examining concentrations of LDL > 100 µg/ml (^{125}I -LDL; result not shown). Since ECs

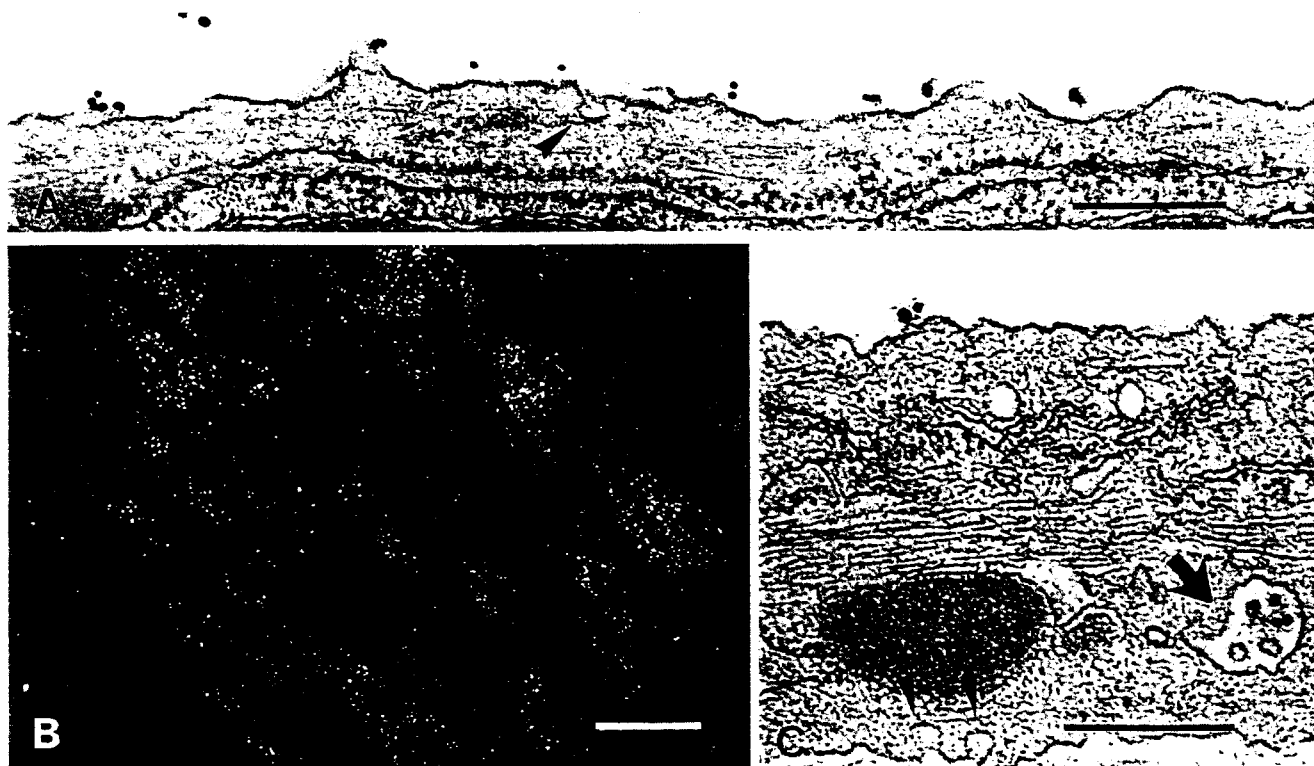


Figure 2. Electron and fluorescence microscopy of ECs incubated with $\text{Au}_{16\text{nm}}$ and DiI-labeled LDL. After a 5-min incubation with gold LDL at 37°C, the tracer marks the luminal plasma membrane (A). After a 45-min incubation, the gold-labeled probe is mainly detected in multivesicular bodies (C, arrow). Arrowheads indicate caveolar structure. (B) After 45 min of incubation, the fluorescent DiI-labeled LDL is endocytosed and found as small vesicles throughout the cells. Bars: (A and C) 0.3 µm; (B) 30 µm.

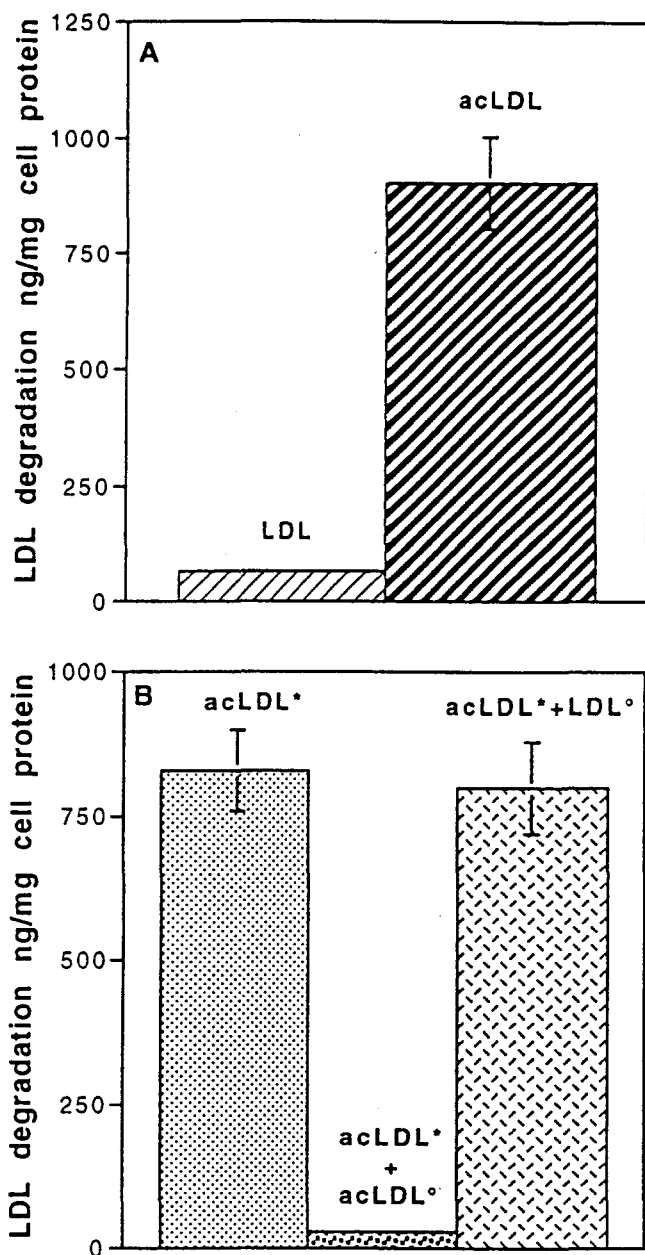


Figure 3. Degradation of LDL and acetylated LDL (acLDL) by brain capillary ECs. (A) Specific degradation of ^{125}I -LDL and ^{125}I -acLDL. Degradation was performed at the concentration of $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ for 5 h at 37°C in the absence or the presence of a 20-fold excess of related, unlabeled lipoproteins. (B) Competition studies between labeled acLDL (^{125}I -acLDL, $50\text{ }\mu\text{g/ml}$; $\square$) with unlabeled acLDL (acLDL°, 1 mg/ml ; $\boxtimes$) and unlabeled LDL (LDL°, 1 mg/ml ; $\square$). Determination of the degradation was carried out as described in Materials and Methods. Each point is a mean of three different filters, and the curves are representative of three series of experiments.

bind 4.7 ng of LDL/ cm^2 at 4°C at the luminal concentration of $35\text{ }\mu\text{g/ml}$ of LDL and after 5-h transcytosis $\sim 100\text{ ng/cm}^2$ cross the monolayer, during the 5-h experiment, ~ 20 surface binding equivalents of LDL are transcytosed, indicating that the transcytosis time is $\sim 15\text{ min}$. To determine if transcytosed LDL is competent for rebinding to the LDL receptor, degradation experiments of LDL by

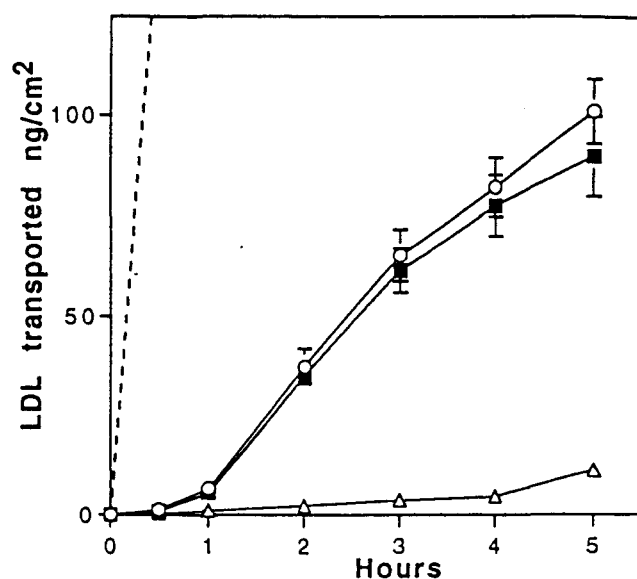


Figure 4. Transport of LDL across brain capillary EC monolayers. Passage of ^{125}I -LDL (ng/cm^2) through collagen-coated filters with (solid lines) or without (dashed line) brain capillary EC monolayer was carried out at 37°C . LDL was added to the upper side of the filter ($50\text{ }\mu\text{g/ml}$ ^{125}I -LDL, 1 mg/ml unlabeled LDL). Intact ^{125}I -LDL transport from upper to lower sides of the filter was assessed by counting in a γ counter the acid-precipitable fractions of the lower compartments. Specific transport ($\blacksquare$) was calculated by subtracting the radioactivity obtained in the presence of native LDL ($\triangle$) from that obtained in the absence of native LDL ($\circ$). The data are expressed as ng of ^{125}I -LDL transported per cm^2 , which refers to the surface area of the cells. Each point is a mean of three different filters, and the curves are representative of seven series of independent experiments.

the astrocytes of the coculture were performed for 16 h. Our results showed that 3.27% of the transcytosed LDL were degraded by the astrocytes. Only 0.8% of the LDL was degraded if the astrocytes were not present during the experiment. The specificity of the astrocyte degradation was demonstrated by the fact that a 10-fold excess of unlabeled LDL in the lower compartment reduced the degradation of transcytosed LDL to 0.89%. These results indicate that transcytosed LDL are competent for binding to the LDL receptor located on astrocytes.

No specific binding on the abluminal face was observed when labeled LDL was added in the lower chamber. But, owing to the high nonspecific binding of LDL to the filter, we cannot conclude whether the LDL receptor is specifically expressed or not at the abluminal face of brain capillary ECs. There was no observed component of specific LDL transport in the basal to apical direction. These results strongly indicate the existence of a specific pathway operating in the transport of LDL from the apical to the basal surfaces, but not in the reverse direction.

When the same transport experiments were performed using radiolabeled acLDL instead of LDL in the luminal compartment, no passage of acLDL was found over a 5-h incubation. These results corroborate our conclusions with regard to a specific transport of LDL across the monolayer. Furthermore, when the same experiments were carried out with adrenal cortex ECs, a concentration-depen-

dent, receptor-independent process was observed (results not shown). From the experiments described above, the specificity of the transport could be attributed to a receptor-mediated process in brain capillary ECs.

To confirm that the LDL receptor is involved in this receptor-mediated transcytosis, transport experiments in the presence of the C7-monoclonal antibody, known to interact with the LDL receptor-binding domain and totally block the binding of LDL to brain capillary ECs, were performed. Fig. 5 shows that incubations of LDL with increasing concentrations of the C7 antibody, decrease the rate of passage of the LDL through the monolayer. At the concentration of 1 mg/ml, LDL transcytosis is totally abolished. Control irrelevant IgG has no effect, suggesting once more the involvement of the LDL receptor in this intracellular traffic.

Fig. 6 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. 6 B), whereas a dramatic decrease in the LDL transport through the monolayer is observed (Fig. 6 A), indicating that LDL is directed to the abluminal compartment by a transcellular route and that this transport system requires active mechanisms such as receptor-mediated transcytosis.

We have already demonstrated that the lipid requirement of astrocytes increases the expression of endothelial cell LDL receptors (Dehouck et al., 1994). Is this upregulation of the LDL receptor at the luminal face of brain capillary ECs followed by an increase in LDL transcytosis? To answer this question the following experiments were carried out. Brain capillary ECs and astrocytes were cocultured for 12 d in a medium containing 15% CS. 36 h

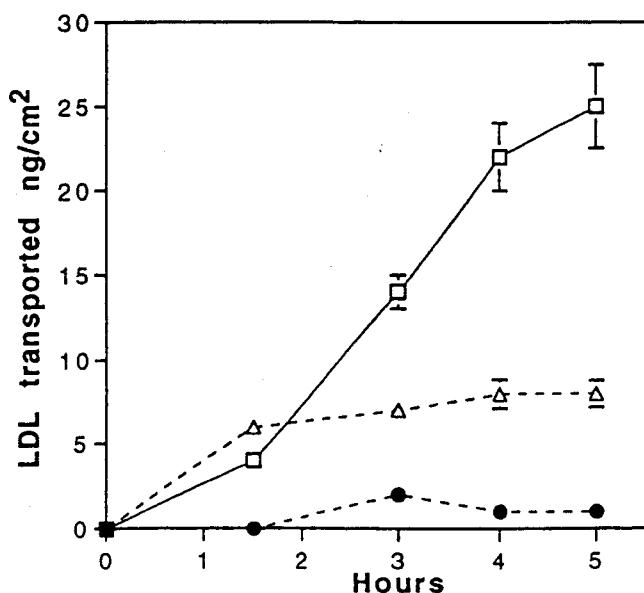


Figure 5. Inhibition of LDL transport through EC monolayers by the C7 monoclonal antibody. Specific ^{125}I -LDL transport experiment (35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^{125}I -LDL, 700 mg/ml unlabeled LDL) was performed as described in Fig. 4, legend, either in presence of C7-IgG, 1 mg/ml (●), 0.1 mg/ml (△), or AI-IgG, 1 mg/ml (□). Each point is a mean of three different filters, and the curves are representative of three series of independent experiments.

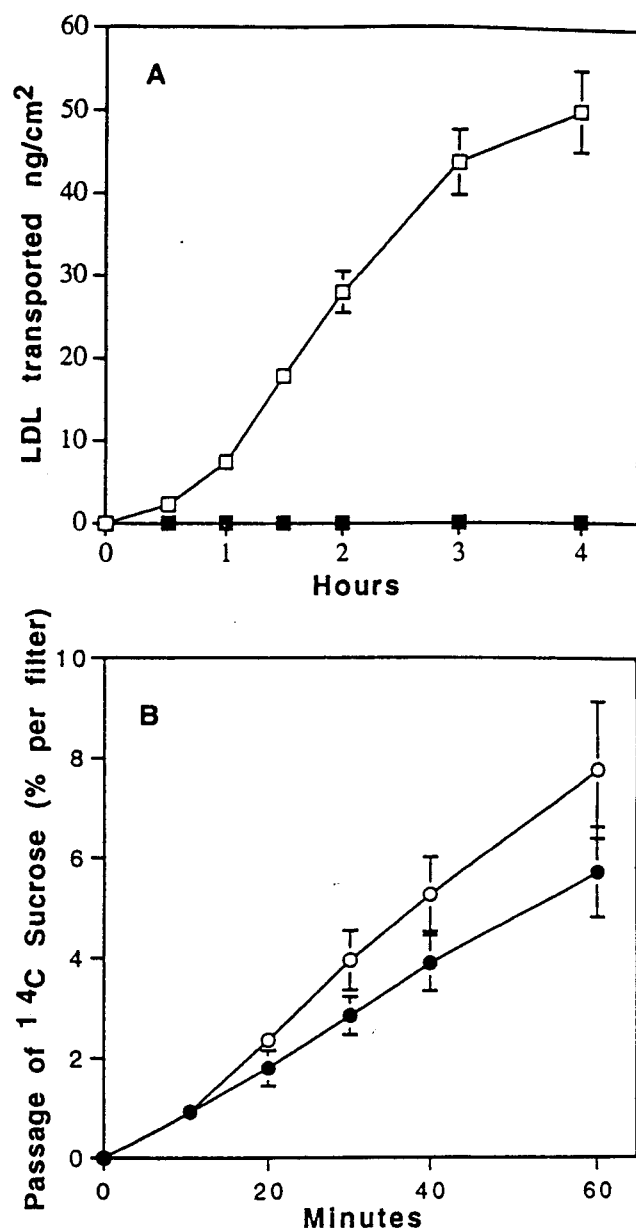


Figure 6. Effect of temperature on the transport of ^{125}I -LDL (A) and sucrose (B) from apical to basal surfaces. Specific transport of LDL was performed as described in Fig. 4, legend. Transport of [^{14}C]sucrose was expressed as the percentage of radioactivity crossing the brain capillary EC monolayer from the apical to the abluminal surfaces. ^{125}I -LDL and sucrose transport were performed both at 37° (□, ○) and 4°C (■, ●). The data represent the means of three filters, and the curves are representative of two series of independent experiments.

before the 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 for 2 or 4 h at 37°C (induction phase), and the binding at 4°C and transcytosis experiments at 37°C were performed. Fig. 7 draws, after a 4-h induction, a parallel between the

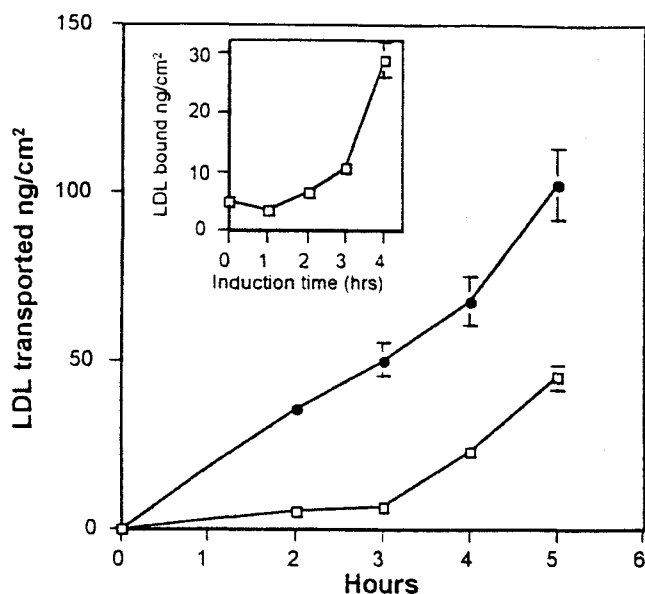


Figure 7. LDL transport after induction of LDL receptor expression on brain capillary ECs by cholesterol-depleted astrocytes. Upregulation of LDL receptor on brain capillary ECs was performed in four phases as described in Materials and Methods. On the day of the experiment, brain capillary ECs in DME supplemented with 15% CS were cocultured for different times (1–4 h) at 37°C with cholesterol-depleted astrocytes in their 36-h incubating medium (induction phase). The increase of LDL receptor expression on ECs was studied by 125 I-LDL binding at 4°C (inset). 125 I-LDL transport studies were performed at 37°C, after 4 h induction and >5 h, as described in Fig. 4, legend. The induction phase was performed in the presence of either cholesterol-depleted (●) or noncholesterol-depleted (□) astrocytes. The data represent the means of three filters, and the curves are representative of three series of independent experiments.

upregulation of the LDL receptor at the luminal surface of the brain capillary ECs and the increase in the LDL transcytosis across the monolayer, demonstrating once more the involvement of the LDL receptor in the transcytosis. These results were confirmed by the studies of the endocytosis of DiI-LDL. Fig. 8 B shows an increase in the fluorescent signal in ECs cocultured for 4 h with cholesterol-depleted astrocytes.

One of the characteristics of brain capillary ECs is the paucity of clathrin-coated pits, known in other cell types to mediate the endocytosis of LDL. Recently, Schnitzer et al. (1994) have shown that a peripheral, continuous endothelium possesses nonclathrin-coated vesicles (caveolae) that seem to be involved in transcytosis. To study the involvement of caveolae in LDL transcytosis at the brain level, the effect of filipin on the endocytosis of LDL was studied. Indeed it has been shown that cholesterol-binding agents such as filipin cause the disassembly of caveolae. First, we checked the toxicity of filipin on the integrity of the barrier functions. No increase in sucrose permeability was observed until 20 min of incubation of the EC monolayer in the presence of concentrations of filipin ranging from 100 ng/ml to 3 μ g/ml ($P_e = [0.63 \pm 0.24] 10^{-3}$ cm/min versus $[0.52 \pm 0.19] 10^{-3}$ cm/min for sucrose; $n = 3$). But, after 30 min incubation, a huge increase in the passage of sucrose

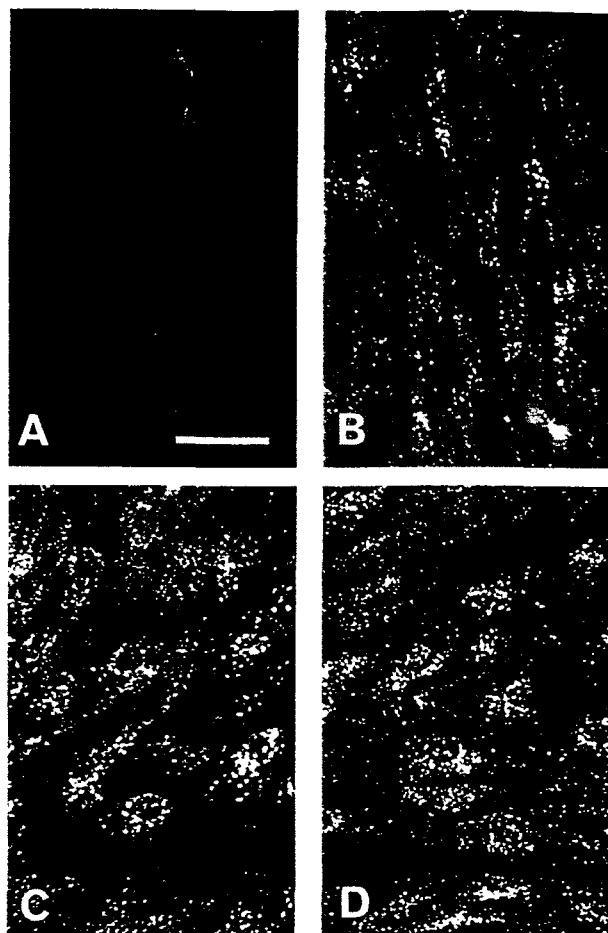


Figure 8. DiI-LDL endocytosis after induction of LDL receptor expression on brain capillary ECs by cholesterol-depleted astrocytes. (A) Brain capillary ECs were incubated at 37°C for 45 min with DiI-LDL. After washing, the cells were fixed and processed for fluorescent microscopy as described in Materials and Methods. (B) The same experiment was carried out with “upregulated LDL receptor” ECs as described in Fig. 7, legend. Bar, 50 μ m.

could be observed ($P_e = [2.38 \pm 0.24] 10^{-3}$ cm/min for sucrose; $n = 6$) reflecting an alteration of the barrier properties of the monolayer. For these reasons, preincubations with filipin were carried out for 10 min only. The preincubation of endothelium for 10 min with 3 μ g/ml of filipin before the addition of DiI-LDL resulted in a total inhibition of the fluorescent signal in the cells (Fig. 9 A). To rule out the possibility that filipin inhibits the binding of LDL to the cell surface, 125 I-LDL binding to the cell surface of the ECs was assessed for 1 h at 4°C using confluent monolayers that were either preincubated or not with 3 μ g/ml of filipin for 10 min at 37°C. We found no evidence for interference in the binding, indicating that filipin does not interact with the binding of LDL to its receptor. Since filipin is toxic for the integrity of the monolayer after 30 min and transcytosis experiments lasted at least 3 h, the quantification measurement of the effect of filipin was not possible.

The reversibility of the effect of filipin treatment on the ECs was carried out. After filipin treatment and washings, ECs were incubated for 1 h at 37°C in serum-containing medium and were then allowed to accumulate DiI-LDL

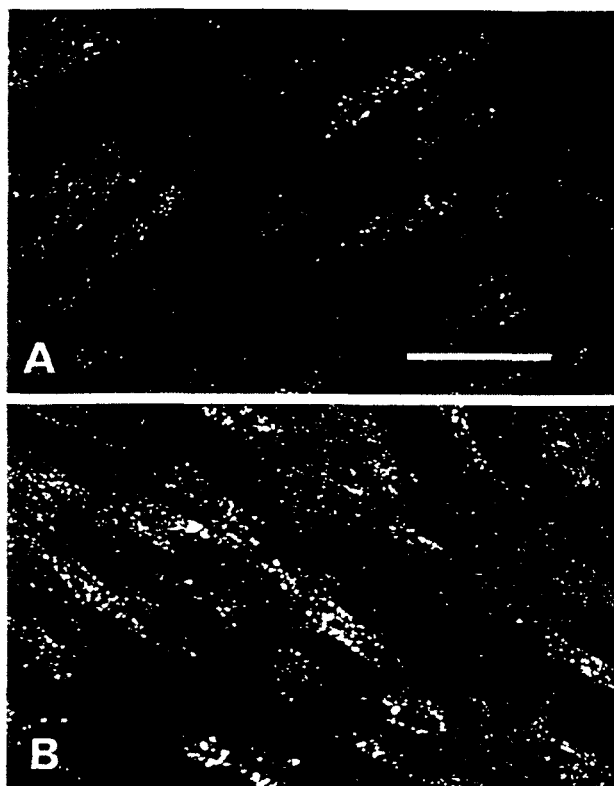


Figure 9. Effect of filipin on the endocytosis of LDL by brain capillary ECs. (A) The cells were pretreated with filipin (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) before the addition of DiI-LDL, and the endocytosis was performed as described in the Fig. 8, legend. (B) Immediately after filipin treatment, the cells were incubated in DME containing 20% CS for 30 min to reverse the effects of filipin before examining DiI-LDL endocytosis. (C and D) Endocytosis was carried out with brain capillary ECs in growing phase without (C) or with (D) pretreatment with filipin. Bar, 50 μm .

for 45 min at 37°C. As shown in Fig. 9 B, this short reversal treatment resulted in the restoration of normal endocytosis by the ECs, indicating that fundamental functions of ECs are not altered by filipin.

The effect of filipin on clathrin-coated pits was also checked using brain capillary ECs during the growing phase. Under these conditions, LDL is classically internalized by the clathrin pathway, where LDL is directed to lysosomes for degradation and the cholesterol is used by the cells. Fig. 9, C and D, demonstrates that in growing cells, LDL endocytosis is not inhibited by filipin treatment. The same results were obtained with differentiated ECs cocultured for 12 d and fed with LPDS for 36 h to decrease their cholesterol content. Furthermore, in these cases we can note that the accumulation of DiI-LDL creates a perinuclear punctate signal consistent with its localization in lysosomes. These results confirm that the coated vesicular degradative pathway with its associated coated pits, endosomes, and lysosomes is not altered by filipin. The compartments of this pathway are functionally intact, unlike the early stages of the noncoated vesicular pathway.

These results demonstrate that there is a shift from a recycling LDL receptor to a transcytotic LDL receptor when the cells are differentiated. Matter et al. (1993) reported

that ablating one of the LDL receptor internalization signals can transform the LDL receptor from a recycling to a transcytotic trafficking pattern. To check whether such a modification may occur in differentiated brain capillary ECs, the sequences of the cytoplasmic tail of the LDL receptor required for basolateral sorting were analyzed and compared to those of the recycling receptors for growing brain capillary ECs. mRNA was extracted from these different cell lines, and the RT-PCR results show that a 245-bp fragment is obtained with each culture condition studied. Their sequences match the bovine LDL receptor perfectly (100% identity), confirming that the consensus sequence for the internalization signals is not altered in the differentiated brain capillary ECs.

Discussion

In Vitro Blood-Brain Barrier

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 ECs displayed: (a) tight junctions as visualized by actin and ZO-1 repartition; (b) an electrical resistance of $>800 \Omega \times \text{cm}^2$; (c) a low permeability for sucrose and insulin; (d) the presence of specific transporters (amino acids, glucose, propranolol [Dehouck et al., 1995]); (e) specific enzymatic activities of the BBB (γ -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 ECs. Furthermore, we have recently shown (Dehouck et al., 1994) that brain capillary ECs in coculture express, in spite of the physiological concentrations of lipoproteins in the incubation medium and the tight apposition of ECs (Méresse et al., 1991), an LDL receptor as they do *in vivo*. Furthermore, we have found that the fatty acid composition of cocultured ECs with astrocytes was markedly different from that of noncocultured ECs and that these fatty acid changes might be biologically relevant, as they tended to make the fatty acid composition of brain capillary ECs more closely resemble that of freshly isolated capillaries (Bénistant et al., 1995). To summarize, our coculture enables us to apprehend, on an *in vitro* model that closely mimics the *in vivo* conditions, the cellular mechanism of LDL interaction with the BBB.

LDL Receptor Function at 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? Since 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 ECs. Furthermore, as demonstrated (Méresse et al., 1991; Dehouck et al., 1994), this luminal surface receptor is likely to be a bona fide LDL receptor, as indicated by its

saturability, its specificity, the ability of an anti-LDL receptor antibody to inhibit ^{125}I -LDL binding, and its molecular weight of 135.

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: (a) the transport is specific and unidirectional; (b) the transcytosis is inhibited by the C7 monoclonal antibody, which is known to interact with the receptor-binding domain (Beisiegel et al., 1981); (c) the transport shows a temperature dependence similar to the process involving receptor mediated internalization (Vasile et al., 1983). It is also interesting to note that the transcytosis of LDL from the luminal to the basal surface occurs in the absence of a significant route involving its degradation. The same results were obtained by Li et al. (1991) using epithelial cells. Owing to the fact that amounts of LDL and acLDL roughly bound to the luminal surface of the monolayer at 4°C, the nontranscytosis of acLDL after their internalization in the ECs and their subsequent degradation indicate that the lysosomal compartment is functional in these cells, and reinforce the hypothesis that the receptor mediated endocytotic pathway bypasses lysosomal processing.

Furthermore, 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). Indeed, the lipid requirement of astrocytes increases the number of LDL receptors at the luminal side of brain capillary ECs. That is why to investigate the capacity of astrocytes to modulate LDL transcytosis, the astrocytes of the coculture were preincubated in LPDS, to decrease their lipid content. Under these conditions, we observed that the LDL transcytosis parallels the increase in the LDL receptor at the luminal side. Taken together, these experiments indicate that LDL is transcytosed through the brain endothelium by a receptor-mediated mechanism and that the transcytosis could be regulated by the surrounding astrocytes.

Our in vitro results are in agreement with the in vivo clinical observations of patients with cerebrotendinous xanthomatosis (Salem et al., 1987). Indeed, excessive amounts of cholestanol, the 5 α -dihydro derivative of cholesterol, have been detected in the brain of patients with this rare, inherited lipid storage disease. Affected patients have progressive neurological dysfunctions (dementia, spinal cord paresis, cerebellar ataxia), tendon xanthomas, and premature atherosclerosis. Cholestanol accumulates in patients because of overproduction in the liver as a consequence of a genetic defect in bile acid synthesis (Salem and Grundy, 1973). Consequently, the abnormal sterol deposits in the brain of patients with cerebrotendinous xanthomatosis are believed to derive from plasma lipoproteins passing through the BBB. The fact that apolipoprotein B or an apolipoprotein B fragment, which increases out of proportion to the other apolipoproteins and to lecithin cholesterol acyl-transferase in the cerebrospinal fluid, strongly suggests that this apolipoprotein serves to transport sterols from the plasma to the brain in patients with

cerebrotendinous xanthomatosis. Treatment of patients with chenodeoxycholic acid not only reduced elevated sterol concentration in the cerebrospinal fluid but also decreased the abnormal levels of apolipoprotein B in the brain, suggesting that the function of the BBB returned to normal. Our results demonstrating a "basal" transport of LDL through brain capillary ECs and its upregulation by the lipid composition of glial cells are in agreement with the results observed in vivo in this disease.

In contrast, in peripheral vessels, 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 peripheral organ has been the subject of several in vitro studies (Navab et al., 1986; Langelier et al., 1989). Despite the absence of functionally active LDL receptors due to contact inhibitor and physiological concentrations of plasma LDL in peripheral capillaries, there is a significant transport of intact LDL across the endothelium. These in vitro results confirm the in vivo observation of Vasile et al. (1983) 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 unlabeled LDL. From our data, it is not possible to distinguish between a paracellular route for the movement of LDL or a transcellular route involving the formation of transient transendothelial channels. Thus, the normal peripheral confluent endothelium functions are not related to the direct metabolism 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 interstitium of the aorta (Hoff et al., 1978; Smith and Ashall, 1983), demonstrating the nonregulation of this transport and the possible appearance of sclerotic lesions.

Transcellular Mechanism of the Passage of LDL through the Brain Capillary EC Monolayer

The existence of receptor-mediated processes that bypass lysosomes seems to be a feature of ECs. Indeed, as in continuous endothelia, ECs are linked to each other by junctional complexes that constitute a major barrier to the bidirectional exchange of macromolecules and specific receptors play a significant role in the transendothelial transport of plasma molecules to tissues. Several different albumin-binding proteins have been identified on ECs; it appears that gp30 and gp18 mediate the binding, endocytosis, and degradation of modified albumin, whereas albondin (gp60) mediates native albumin binding and subsequent transcytosis (Schnitzer and Oh, 1994). Nevertheless, there is no evidence of receptor-mediated transport of native albumin in brain capillary endothelia (Pardridge et al., 1985). In the same way, specific receptors of insulin are expressed on a variety of ECs, and it has been shown that these receptors are involved in insulin transport across ECs (King and Johnson, 1985). Specific binding of insulin to brain mi-

crovessels in vivo (Van Houtten and Posner, 1979) or in vitro (Franck and Pardridge, 1981) first suggests that the pathway for insulin entry into the CNS involved transport across the BBB. Furthermore, Franck et al. (1985) clearly show in vivo that a saturable receptor was involved in the brain uptake process. A more precise demonstration of the transcytosis of blood-borne molecules was achieved with an antibody directed against the ferrotransferrin receptor (OX-26). They have demonstrated that OX-26 selectively targets the brain relative to organs such as the kidneys, heart, or lungs. This statement is supported by the capillary depletion technique experiments of Friden et al. (1991, 1993), who have demonstrated the blood to brain entry of OX-26 conjugated to methotrexate and nerve growth factor, and by Broadwell et al. (1994), who have performed cytochemical approaches using horseradish peroxidase-OX-26. Using our model, we have provided evidence for the transcytosis of iron-loaded transferrin across the cerebral endothelium by means of a specific transferrin receptor-mediated pathway (Descamps et al., 1996). Furthermore, no intracellular degradation of transferrin was observed, indicating the occurrence of a pathway through the cultured endothelium that bypasses the lysosomal compartment.

The precise transcellular pathway for the passage of blood-borne molecules across the BBB and into the CNS has only recently begun to be elucidated (Villegas and Broadwell, 1993; Broadwell et al., 1994). Owing to the fact that early studies suggested a role for caveolae in endothelial cell transport across the monolayer (Ghitescu et al., 1986; Milici et al., 1987), to better appreciate possible vesicular uptake and transport of LDL in brain capillary ECs, we carried out experiments using filipin, a drug that binds sterols, thereby disrupting caveolae (Severs and Simons, 1986). But, since coated endocytic vesicles become uncoated vesicles during the transport of ligands to the lysosome, McGookey et al. (1983) found that coordinated with the dissociation of the clathrin coat from endocytic vesicles, the membranes became sensitive to the formation of filipin-sterol complexes. To rule out the possibility that the transcytotic vesicles may be derived from coated pits and affected by filipin, whereas the coated vesicles on the surface are protected, experiments were also carried out using growing cells and differentiated cells depleted in cholesterol. Under these conditions, we have shown that filipin did not alter the classic degradation pathway of the LDL receptor. In contrast, in differentiated cells still in contact with lipoproteins, a complete inhibition of the endocytosis was achieved. The dramatic increase in the sucrose permeability, after a 20-min incubation in the presence of filipin ruled out the possibility of performing quantitative studies on the effect of filipin on LDL transcytosis, since these experiments last at least 5 h. In these conditions, the huge increase in the paracellular transport would hide the expected reduction in the transcellular transport of LDL. But, added to our results demonstrating the reversibility of a short treatment with filipin on endocytosis indicating that fundamental functions of ECs are not altered by this drug, these results therefore suggest that caveolae are likely to be involved in the potential transport of LDL from the blood to the brain.

Although the capacity of caveolae to detach themselves

from the cell surface has been questioned (Bundgaard, 1983; Anderson, 1993), recent results strongly support the involvement of caveolae in endocytosis (for review see Lamaze and Schmid, 1995). Since LDL receptor ligands rapidly dissociate at acid pH, tracking the pathway of the receptor using conventional antireceptor antibodies (C7 monoclonal antibody) was not possible. The use of a chimeric receptor, consisting of the extracellular and transmembrane domains of the mouse IgG Fc receptor fused to the LDL receptor cytoplasmic tail, is under investigation since this approach will permit the utilization of a high affinity Fab fragment of the mouse IgG antibody, 2.4 G2, a well characterized probe that does not dissociate from the receptor at pH values >4.0 (Mellman et al., 1984). Furthermore, the fact that filipin stopped the fusion and/or inside internalization of caveolae in multivesicular structures argues in favor of a function of caveolae in nonclathrin-dependent endocytosis and transcytosis, as already mentioned by Montesano et al. (1982), Milici et al. (1987), and Tran et al. (1987). The work of Parton et al. (1994), showing that caveolae are dynamic structures that can be internalized into the cells leaves little doubt about the function of caveolae in endocytosis.

In peripheral vessels, the characterization of caveolin-rich membrane domains reveals known receptors for modified LDL (scavenger receptor, CD 36, and RAGE) and multiple GPI-linked proteins, but the receptor for native LDL was not mentioned (Lisanti et al., 1994). This was not surprising, owing to the fact that the LDL receptor is down regulated in physiological conditions in peripheral vessels. In brain capillaries, in spite of the high concentration of lipoproteins, the LDL receptor is not down regulated. It is not localized as in growing cells or cholesterol-depleted differentiated cells in coated pits but in caveolae. The balance between distinct endocytic pathways can be shifted in response to cellular requirements (in this case the need of cholesterol for the ECs), suggesting that these pathways could be regulated differently. As shown by Matter et al. (1993), the change from a recycling to a transcytotic receptor could have been the consequence of the ablation of one of the internalization signals of the cytoplasmic domain of the receptor. Our results demonstrated that LDL receptor messengers in growing brain capillary ECs (recycling receptor), or differentiated cells (transcytotic receptor) that are 100% identical, ruled out this hypothesis. But, as demonstrated for the polymeric IgA receptor, the shift of an endocytotic receptor to a transcytotic receptor could also be due to posttranslational modifications of the cytoplasmic domain of the receptor. Indeed, Casanova et al. (1990) and Aroeti and Mostow (1994) demonstrated that phosphorylation of Ser664 inactivates the endocytotic signal and permits the polymeric immunoglobulin receptor to be transcytosed.

Recent results have provided new tools that allow detailed study of caveolar dynamics. Parton et al. (1994) show that internalization of caveolae may be a regulated process, since increased phosphorylation due to phosphatase inhibition induces the removal of caveolae from the cell surface, whereas decreased kinase activity inhibits the internalization process. Eker et al. (1994) pinpoint the involvement of cAMP since this second messenger appears to upregulate clathrin-independent endocytosis selectively

at the apical surface of polarized ECs. The hormonal regulation of caveolae internalization has been shown by Smart et al. (1995), suggesting that molecules added to the luminal surface of the endothelium could modulate the endocytosis via caveolae. Our results demonstrating an increase in transcytosis, when the astrocytes of the coculture were depleted in cholesterol, suggest that endocytosis via caveolae and transcytosis could, in part, be regulated by signal molecules secreted by astrocytes and then acting at the abluminal face of brain capillary ECs. These results provide evidence that the brain blood vessel endothelium may not be as inert a barrier as has been assumed. Appropriate stimulus can increase endocytotic activity in these cells.

In summary, taken together, these experiments indicate that LDL is transcytosed through the BBB via a receptor-mediated mechanism in specialized endocytic vesicles that avoid fusion with lysosomes. In contrast to other ECs in the body, these highly differentiated cells regulate the entry of lipoproteins into the brain. Furthermore, the influence of astrocytes on the expression of the LDL receptor and the rate of LDL transcytosis suggest the existence of focal differences in lipoprotein influx, which may depend on the lipid state of astrocytes. The BBB cannot 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.

This work was partly supported by a grant from the Association Recherche et Partage, by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U 325; Professor J.C. Fruchart), and by the Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 111; Professor A. Verbert).

Received for publication 10 July 1996 and in revised form 22 May 1997.

References

- Albers, J.J., J.H. Tollefson, G. Wolfbauer, and R.E. Albright. 1992. Cholesteryl ester transfer protein in human brain. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 21:264-266.
- Anderson, R.G.W. 1993. Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5:647-652.
- Aroeti, B., and K.E. Mostow. 1994. Polarized sorting of the polymeric immunoglobulin receptor in the exocytic and endocytic pathways is controlled by the same amino acids. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 13:2297-2304.
- Basu, S.K., J. M. Goldstein, 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. 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 a probe to study of receptor mediated endocytosis and the genetics of familial hypercholesterolemia. *J. Biol. Chem.* 256:11923-11931.
- Bénistant, C., M.P. Dehouck, J.C. Fruchart, R. Cecchelli, and M. Lagarde. 1995. Fatty acid composition of brain capillary endothelial cells: effect of the coculture with astrocytes. *J. Lipid Res.* 36:1-9.
- Betz, L., and G.W. Goldstein. 1978. Polarity of the blood-brain barrier: neutral amino-acid transport into isolated brain capillaries. *Science (Wash. DC)* 202:225-227.
- Bilheimer, D.M., S. Eisenberg, and R.I. Levy. 1972. The metabolism of very low density lipoproteins. *Biochem. 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. 1953. 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. Lipid Res.* 20:464-471.
- Broadwell, R.D., B.J. Baker, W.A. Banks, P. Friden, M. Moran, C. Olivier, and J.C. Villegas. 1994. Ferrottransferrin and antibody against the transferrin receptor as potential vehicles for drug delivery across the mammalian blood-brain barrier into the CNS. *Methods Neurosci.* 21:93-117.
- Bundgaard, M. 1983. Vesicular transport in capillary endothelium: does it occur? *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Proc. Meet. Fed. Proc.* 42:2425-2430.
- Casanova, J.E., P.P. Breitfeld, S.A. Ross, and K.E. Mostow. 1990. Phosphorylation of the polymeric immunoglobulin receptor required for its efficient transcytosis. *Science (Wash. DC)* 248:742-745.
- 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, 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., B. Dehouck, C. Schlupe, J.C. Fruchart, M. Lemaire, and R. Cecchelli. 1995. Drug transport to the brain: comparison between in vitro and in vivo models of the blood-brain barrier. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3:357-365.
- Descamps, L., M.P. Dehouck, G. Torpier, and R. Cecchelli. 1996. Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 270:H1149-H1158.
- Eker, P., P.K. Holm, B. Van Deurs, and K. Sandvig. 1994. Selective regulation of apical endocytosis in polarized Madin-Darby canine kidney cells by mastoparan and cAMP. *J. Biol. Chem.* 269:18607-18615.
- Frank, H.J.L., and W.M. Pardridge. 1981. A direct in vitro demonstration of insulin binding to isolated capillaries. *Diabetes* 30:757-761.
- Frank, H.J.L., T. Jankovic-Vokes, W.H. Pardridge, and W.L. Morris. 1985. Enhanced insulin binding to blood-brain barrier in vivo and to brain microvessels in vitro in newborn rabbits. *Diabetes* 34:728-733.
- Friden, P.M., L.R. Walus, G.F. Musso, M.A. Taylor, B. Malfroy, and R.M. Starzyk. 1991. Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775.
- Friden, P.M., L.R. Walus, P. Watson, S.R. Dectrow, J.W. Kozarich, C. Bäckman, H. Hoffer, F. Bloom, and A.C. Granholm. 1993. Blood-brain barrier penetration and in vivo activity of an NGF conjugate. *Science (Wash. DC)* 259:373-377.
- Ghitescu, L., A. Fixman, M. Simionescu, and N. Simionescu. 1986. Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor-mediated transcytosis. *J. Cell Biol.* 102:1304-1311.
- Gospodarowicz, D., S. Massaglia, 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.
- 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 α -ethinyl estradiol. *J. Cell Biol.* 90:778-785.
- Hoff, H.F., J.W. Gaubatz, and A.M. Gotto. 1978. ApoB concentration in the normal aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85:1424-1431.
- King, G.L., and S. Johnson. 1985. Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science (Wash. DC)* 227:1583-1586.
- Lamaze, C., and S.L. Schmid. 1995. The emergence of clathrin-independent pinocytotic pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:573-580.
- Langelier, E.G., I. Snelting-Havinga, and 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.
- Li, C., S. Stifanis, W.J. Schneider, and M.J. Poznansky. 1991. Low density lipoprotein receptors on epithelial cell (Madin-Darby Canine Kidney) monolayers. *J. Biol. Chem.* 266:9263-9270.
- Lisanti, M.P., P.E. Scherer, Z.L. Tang, A. Hermanowski-Vosatka, Ya-Huei Tu, R.F. Cook, and M. Sargiacomo. 1994. Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial rich source: implications for human disease. *J. Cell Biol.* 126:111-126.
- Malavolti, 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.
- Matter, K., A. Whitney, E.M. Yamamoto, and I. Mellman. 1993. Common signals control low density lipoprotein receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells. *Cell* 74:1053-1064.
- McGookey, D.J., K. Fagerberg, and G.W. Anderson. 1983. Filipin-cholesterol complexes form in uncoated vesicle membrane derived from coated vesicles during receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein. *J. Cell Biol.* 96:1273-1278.
- Mellman, I., H. Plutner, and P. Ukkonen. 1984. Internalization and rapid recycling of macrophage Fc receptors tagged with monoclonal antireceptor antibody: possible role of prelysosomal compartment. *J. Cell Biol.* 98:1163-1169.
- 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. Bensad, 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. Davies, and L. Illum, editors. Plenum Press, New York.
- Milici, A.J., N.E. Watrous, H. Stukenbrok, and G.E. Palade. 1987. Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J. Cell Biol.* 105:2603-2612.
- Montesano, R., J. Roth, A. Robert, and L. Orci. 1982. Non-coated membrane invaginations are involved in binding and internalization of cholera and tetanus toxins. *Nature (Lond.)* 296:651-653.
- Navab, M., G.P. Hough, and J.A. Berliner. 1986. Rabbit β -migrating very low density lipoprotein increases endothelial macromolecular transport without altering electrical resistance. *J. Clin. Invest.* 5:135-141.
- Pardridge, W.M., J.B. Eisenberg, and W.T. Cephalu. 1985. Absence of albumin receptor on brain capillaries in vivo and vitro. *Am. J. Physiol.* 249:E264-E267.
- Parton, R.G., B. Joggert, and K. Simons. 1994. Regulated internalization of caveolae. *J. Cell Biol.* 127:1199-1215.
- 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.
- Russell, D.W., W.J. Schneider, T. Yamamoto, K.L. Juskey, M.S. Brown, and J.L. Goldstein. 1984. Domain map of the LDL receptor: sequence homology with the epidermal growth factor precursor. *Cell* 37:577-585.
- Salen, G., and S.M. Grundy. 1973. Metabolism of cholestanol, cholesterol, and bile acid in cerebrotendinous xanthomatosis. *J. Clin. Invest.* 52:2822-28325.
- Salen, G., V. Berginer, V. Shore, I. Horak, E. Horak, G.S. Tint, and S. Shefer. 1987. Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *N. Engl. J. Med.* 316:1233-1238.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Severs, N.J., and H.L. Simons. 1986. Caveolar bands and the effects of sterol-binding agents in vascular smooth muscle plasma membranes. *Lab. Invest.* 55:295-307.
- Schnitzer, J.A., and P. Oh. 1994. Albondin-mediated capillary permeability to albumin. *J. Biol. Chem.* 269:6072-6082.
- Schnitzer, J.A., P. Oh, E. Pinney, and J. Allard. 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* 127:1217-1232.
- Smart, E.J., Y.S. Ying, and G.W. Anderson. 1995. Hormonal regulation of caveolae internalization. *J. Cell Biol.* 131:929-938.
- Smith, E.B., and C. Ashall. 1983. Low density lipoprotein concentration in interstitial fluid from human atherosclerotic lesions. *Biochem. Biophys. Acta.* 754:249-255.
- Traber, M.G., and H.J. Kayden. 1984. Vitamin E is delivered to cells via the high affinity receptor for low density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.* 40:747-751.
- Tran, D., J.L. Carpentier, F. Sawano, P. Gordon, and L. Orci. 1987. Ligands internalized through coated or non-coated invaginations follow a common intracellular pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84:7957-7961.
- 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.* 96:1677-1689.
- Van Houtten, M., and B.I. Posner. 1979. Insulin binds to brain blood vessels in vivo. *Nature (Lond.)* 282:623-628.
- Villegas, J.C., and R.D. Broadwell. 1993. Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium. II. Adsorptive transcytosis of WGA-HP and the blood-brain and brain-blood barriers. *J. Neurocytol.* 22:67-80.
- Wolf, B.B., M.B.S. Lopez, S.R. VandenBerg, and S.L. Gonias. 1992. Characterization and immunohistochemical localization of α 2-macroglobulin receptor (low-density lipoprotein receptor-related protein) in human brain. *Am. J. Pathol.* 141:37-42.

CONCLUSIONS DE L'ARTICLE 2

Ces résultats établissent un rôle nouveau du récepteur apo(B, E) : **le transport des LDL à travers la BHE**. Ce transport est régulé par le statut lipidique des astrocytes. La BHE semble ainsi être modulable. A la structure imperméable et 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.

Nos résultats démontrent en outre, l'existence d'un « switch » dans le rôle du récepteur : de la voie classique de dégradation (puits recouverts de clathrine, lysosomes), on passe, lors de l'établissement de la BHE à **une voie de transcytose** (cavéoles, endosomes) dans les cellules différenciées. Les résultats peuvent être schématisés de la manière suivante :

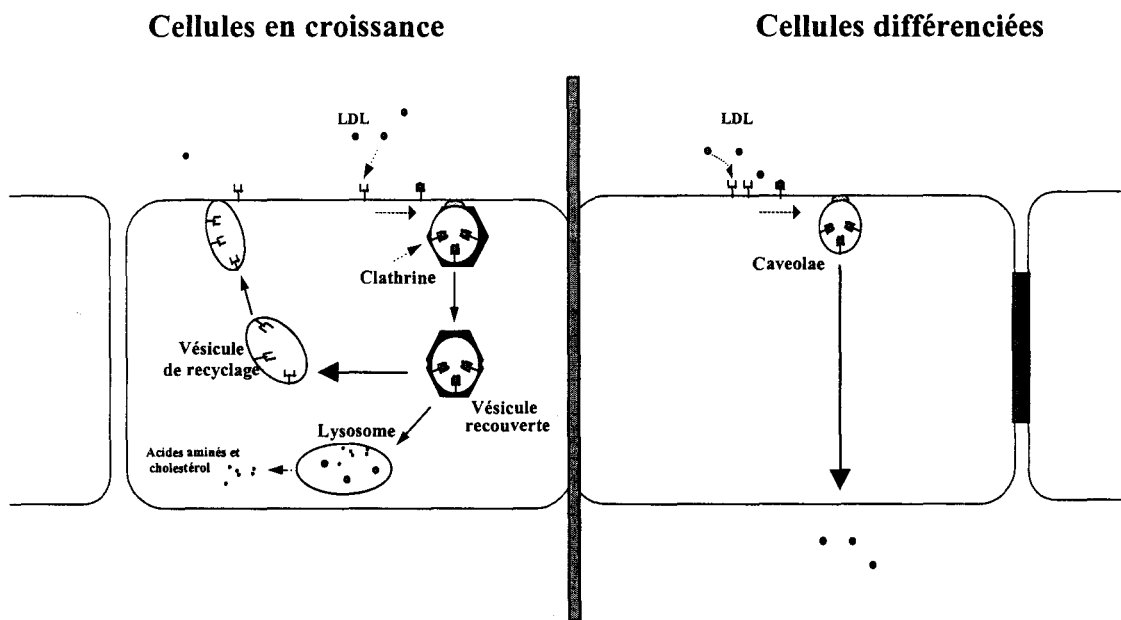


Figure 29 : Rôle du récepteur apo(B, E) dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux en croissance et différenciées.

Ainsi, au niveau des capillaires cérébraux, les LDL sont amenées face abluminale des cellules endothéliales sans être dégradées. **L'existence de transport récepteur-dépendants et n'impliquant pas le compartiment lysosomal** semble être une

caractéristique de l'endothélium cérébral. En effet, des résultats similaires ont été obtenus avec une autre macromolécule, la transferrine (Descamps *et al.*, 1996).

L'inhibition de l'internalisation des LDL mais aussi de la transferrine (Descamps *et al.*, 1996) par la filipine laisse supposer que **les cavéoles sont impliquées dans l'endocytose de ces macromolécules par les cellules endothéliales de la BHE.**

Afin d'étayer ces hypothèses et dans la continuité de ces travaux, des techniques de fractionnement cellulaire et de microscopie (photonique et électronique) nous ont permis d'étudier plus finement les divers compartiments intracytoplasmiques impliqués dans la transcytose des LDL et de la transferrine à travers la BHE.

ARTICLE 3

Transcytose dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux : Mise en évidence d'un compartiment Lamp1 positif, moyennement acide impliqué dans l'endocytose dépendante de récepteurs, via la voie des cavéoles.

Les cavéoles, mises en évidence il y a plus de quarante ans par Palade en 1953, sont des invaginations de la membrane plasmique dont le rôle précis reste encore à définir. Longtemps considérées comme des structures statiques incapables de se détacher de la membrane (Anderson *et al.*, 1992), elles semblent aujourd'hui impliquées dans l'endocytose mais aussi dans la transcytose de macromolécules plasmatiques à travers les cellules endothéliales de divers endothelia périphériques (Schnitzer *et al.*, 1993). Jusqu'à ce jour, aucune étude n'a été réalisée concernant le rôle des cavéoles au niveau de l'endothélium des capillaires cérébraux.

Utilisant notre modèle *in vitro* de BHE, nous avons pu montrer que :

1 : Comme *in vivo*, les cellules endothéliales de capillaires cérébraux présentent à leur surface de nombreuses cavéoles invaginées (Figure 2A).

2 : **Le récepteur aux LDL est localisé dans les cavéoles.** Après isolement des différentes fractions cellulaires, nous avons pu mettre en évidence, par Western blot, une protéine de 135kDa qui correspond au récepteur apo (B,E) dans la fraction enrichie en cavéoline (Figure 3). Toutefois, cette détection n'a été possible qu'après surexpression du récepteur aux LDL à la surface des cellules ; ceci en cultivant les cellules endothéliales en présence d'astrocytes préalablement carencés en cholestérol (Dehouck *et al.*, 1994).

3 : En microscopie électronique, **lorsque les cellules sont incubées en présence de LDL marquées à l'or colloïdal, les particules s'accumulent à proximité des cavéoles** (Figure 5A). Après internalisation, les LDL et la transferrine, sont localisées dans des structures de type « multivésiculaire » (Figure 5, B et C). Ces structures seraient formées par la fusion des membranes des cavéoles avec celle d'un compartiment,

préexistant ou induit. Les cavéoles libèrent alors leur contenu dans cette vésicule puis se retournent en « doigt de gant ». Ceci expliquerait pourquoi les LDL ou la transferrine se retrouvent en dehors des vésicules internalisées dans le compartiment. Ce mécanisme de formation des structures multivésiculaires est confirmé par **l'action de la filipine qui inhibe la fusion et/ou l'internalisation des cavéoles dans ces structures** (Figure 6). Nous nous proposons de nommer ces vésicules endosomales formées de l'accumulation de cavéoles, *cavéosomes*.

4 : Les cellules incubées en présence de LDL acétylées marquées au DiI présentent un marquage beaucoup plus intense que les cellules incubées en présence de DiI-LDL (Figure 7, A et B). Lorsque les LDL, natives et acétylées, sont détectées grâce à un anticorps dirigé contre l'apo B, le profil de fluorescence est différent (Figure 7, C et D). En effet, comme nous l'avons décrit dans l'article 2, les LDL acétylées sont dégradées par les cellules endothéliales ; ceci implique qu'en utilisant l'anticorps anti-apoB on ne détecte que les vésicules dans lesquelles l'épitope n'est pas dégradé et qui correspondent donc aux premières étapes de leur trafic intracellulaire. Que les cellules soient incubées en présence de LDL ou de LDL acétylées, les vésicules marquées présentent le même diamètre. Ainsi, en microscopie à fluorescence, il est impossible de distinguer ces vésicules.

5 : Une durée d'incubation de 45 minutes des cellules endothéliales en présence de LDL modifiées est suffisante pour qu'il y ait apparition de vésicules contenant les enzymes nécessaires à la dégradation des lipoprotéines. Ces enzymes sont séquestrées dans des compartiments lysosomaux dans lesquels un pH intraluminal très acide est nécessaire à leur activité. En effet, nos observations de microscopie électronique montrent que les vésicules lysosomales présentent une morphologie très différente de celle des *cavéosomes* (Figure 8).

Afin de mieux caractériser les *cavéosomes*, la chloroquine, molécule basique permettant d'apprécier le pH des compartiments intracellulaires, a été utilisée sur des cellules incubées en présence de LDL, natives ou acétylées. L'effet de la chloroquine a pu être suivi en marquant le ligand (anticorps anti-apoB) ou les vésicules (anticorps anti-lamp1).

6 : L'utilisation de l'anticorps anti-lamp1 montre que les cellules incubées en présence de LDL, natives ou acétylées, et non traitées à la chloroquine, présentent le même profil de marquage (Figure 9). De plus, les vésicules marquées sont de même taille (de 400 à 500 nm de diamètre).

7 : Lorsque les cellules sont traitées à la chloroquine, la taille des vésicules, positives pour le marqueur lamp1, augmente considérablement dans les cellules incubées en présence de LDL acétylées (apparition de nombreuses vésicules de 1500 à 2000 nm de diamètre) alors qu'elle varie plus modérément dans les cellules incubées en présence de LDL natives (majorité de vésicules de 800 à 1300 nm de diamètre) (Figure 11, A et B). **Ces résultats démontrent que, dans les cellules incubées en présence de LDL acétylées, il y a apparition de vésicules fortement acides, qui ne sont pas présentes dans les cellules incubées en présence de LDL natives.**

8 : Dans les cellules incubées en présence de LDL acétylées et traitées à la chloroquine, les vésicules lamp1 positives, fortement acides ne sont pas marquées par l'anticorps anti-apoB (Figure 11A). **Ces résultats s'expliquent par le fait que dans ces vésicules, les LDL acétylées sont dégradées. Par conséquent, l'anticorps anti-apoB ne peut plus reconnaître l'épitope contre lequel il est dirigé.**

A l'inverse, dans les cellules incubées en présence de LDL, les vésicules lamp1 positives sont également marquées par l'anticorps anti-apoB. Ce marquage concerne majoritairement des vésicules de 500 à 1300 nm de diamètre (Figure 11B). **Ainsi, ces résultats laissent supposer que les LDL internalisées dans les cellules endothéliales ne sont pas dégradées et sont détectées dans des vésicules lamp1 positives, de faible acidité : les cavéosomes.**

**Transcytosis in blood-brain capillary endothelial cells :
Occurrence of a lamp1 positive, mildly acidic
compartment involved in caveola receptor-mediated
endocytosis**

LAURENCE FENART*, ROMÉO CECHELLI⁺ and GÉRARD TORPIER*

* : U 325, SERLIA, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette, 59019 Lille, France.

+ : EA 2465, Université d'Artois, Faculté des sciences Jean Perrin, rue Jean Souvraz, 62
Lens, France.

Corresponding author : G. Torpier, Inserm U325, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr
calmette, 59019 Lille cedex, France. Tel : (33) 3.20.87.79.96. Fax : (33).3.20.87.73.60.
e-mail : gerard.torpier@pasteur-lille.fr

ABSTRACT

LDL and transferrin (Tf) transports across the blood-brain barrier (BBB) are essential for the delivery of lipids and iron to brain cells. Using an *in vitro* BBB model, we have already provided evidence for the specific receptor-mediated transcytosis of these blood-borne molecules through the brain capillary endothelial cells. Preliminary studies suggested that caveolae were likely to be involved in this transcellular transport. To further investigate such hypothesis, biochemical, photon and electron microscopy studies were performed. By cell fractionation experiment and Western blot, we demonstrated that the LDL receptor is located in the caveolin rich cellular fraction. Then, LDL and Tf, internalized in the cells, were detected by electron microscopy in multivesicular bodies. Filipin experiment showed that these endosomal structures seem to be formed by caveolae accumulation and were thus designated as *caveosomes*. While acetylated LDL were directed to a Lamp1 positive, very acidic compartment to be degraded, LDL accumulate in a *caveosome* Lamp1 positive, mildly acidic compartment devoided of any degradative capability.

INTRODUCTION

Unlike peripheral endothelium, brain microvessel endothelial cells are characterised by the presence of highly resistant, tight intercellular junctions, minimal pinocytic activity, and virtual absence of fenestration (Betz and Goldstein, 1978). These characteristics endow the endothelial cells with the ability to restrict the passage of most large and small polar blood-borne molecules from the cerebrovascular circulation to the brain. In addition, the cerebral endothelium possesses a high activity of metabolic enzymes (Pardridge 1983). Therefore, the blood-brain barrier is not only a physical barrier but also a significant metabolic barrier. However, because the brain requires, in a controlled manner, many blood-borne compounds such as glucose, amino-acids and hormones brain capillary endothelial cells possess an array of transport systems that allow selective passage across the blood-brain barrier (Pardridge 1991). Together, these features of brain capillary endothelial cells ensure that the homeostasis of the brain is maintained.

Iron, as well as cholesterol, are essential in the cellular metabolism of all mammalian tissues, including brain. In brain tissues cells, iron can be found in various enzymes involved in oxidative phosphorylation, neurotransmitter synthesis and degradation, and myelin formation (Morris *et al.*, 1992 ; Beard *et al.*, 1993 ; Roskams and Connor, 1994). Both in iron deficiency and in iron overload changes may result in neurological dysfunction and sometimes even in overt cellular damage, indicating the presence of unexpectedly close communications between extracerebral and brain iron (Youdim, 1988 ; Dexter *et al.*, 1992 ; Jellinger and Kienzl, 1993). Cholesterol play also an important role in all cells types by being essential for the synthesis of cell plasma membranes. Malavolti *et al.* (1991) indicate that changes in the extracerebral cholesterol

levels are readily sensed by the low-density lipoprotein (LDL) receptor in the brain and provoke appropriate modifications in its activity. Consequently, regulatory factors governing the uptake of iron and cholesterol to the brain seems to be essential for maintaining brain cell homeostasis.

Jefferies *et al.* (1984) reported that Tf receptors are expressed on brain microvascular endothelia in rat and human but not on capillary beds in peripheral tissues. Same observations were done by Méresse *et al.* (1989) concerning the LDL receptor. Indeed, in contrast to what was observed with large vessels *in vivo* (Vasile *et al.*, 1983) and in culture (Kenagy *et al.*, 1984), confluent brain capillary endothelial cells express an LDL receptor *in vivo* (Méresse *et al.*, 1991). With the discovery of these unexpectedly expressed receptors on the luminal side of the blood brain barrier endothelial cells, it became evident that iron and cholesterol might cross the blood-brain barrier, although most aspects of this pathway are still unclear.

Many studies of the blood-brain-barrier have been done using *in vivo* animal models (Oldendorf, 1971). However, there are limitations to the use of whole animal models for detailed investigations of the blood-brain barrier at the cellular level. *In vitro* model offer a promising alternative, which might enable us to define the characteristics of the brain capillary endothelium at the molecular and cellular level (Goldstein *et al.*, 1986 ; Joo, 1993 ; Audus *et al.*, 1990 ; Takakura *et al.*, 1991).

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 et Wolburg, 1990), we have developed an *in vitro* model consisting of a coculture of bovine brain capillary endothelial cells on one side of a porous filter and astrocytes plated on the plastic of a six well dish that mimics the properties of the blood-brain barrier (i.e. presence of tight junctions, high electrical resistance, low permeability of

sucrose and inulin) (Dehouck *et al.*, 1992). This model have provided an additional approach to study, at the cellular level, the selective transport pathways of blood-borne molecules across the blood-brain barrier.

With the use of this model, we provided evidence for the selective transport of LDL and iron-loaded transferrin, across the endothelial cell monolayers. The both transports were completely inhibited at low temperature indicating that these blood-borne molecules are directed to the abluminal compartment by a transcellular route. Moreover, using the conventional anti-receptor antibodies (OX 26 and C7), a complete inhibition of the Tf and LDL endothelial cell uptakes were observed (Descamps *et al.*, 1996 ; Dehouck *et al.*, 1997). Taken together, these results led us to conclude that Tf and LDL are transcytosed through the BBB by way of a specific receptor-mediated pathway.

Interestingly, no intraendothelial degradation of LDL or Tf was observed, indicating that the transcytotic pathway in brain capillary endothelial cells is different from these receptor classical pathways which involved clathrin coated pits, coated vesicles, endosomes and lysosomes. Although clathrin-coated vesicles have been the most extensively studied, there are various other clathrin-independent plasmalemmal vesicles that may also function in the trafficking of molecules at cell surfaces. Caveolae are one distinctive type of non clathrin-coated plasmalemmal vesicles. Upon the discovery of their abundance in endothelium by electron microscopy, a role for caveolae as fluid phase vesicular carriers in the transvascular transport of circulating blood molecules was postulated 40 years ago (Palade, 1953). More recent work suggests that caveolae mediate not only fluid phase but also receptor-mediated endocytosis or transcytosis of molecules (for review see Schnitzer, 1993). Currently even less is known about the caveolae pinching off. The works of Parton *et al.* (1994) showing that

caveolae are dynamic structures that can be internalized into the cells leaves little doubt about the function of caveolae in endocytosis.

Our previous studies pinpointed the role of these caveolae, in the transcellular transport of LDL and Tf across the brain endothelium (Descamps *et al.*, 1996 ; Dehouck *et al.*, 1997) as demonstrated by the pre-treatment of endothelial cells with filipin, a cholesterol sequester agent. These transcytotic LDL and Tf receptor-mediated events have been clearly described on our coculture BBB model in normal and upregulated endothelial cells (Dehouck *et al.*, 1994; 1997; Descamps *et al.*, 1996) as well as in endothelial cells submitted to physiopathological experimental inflammatory conditions (Descamps *et al.*, 1997). This universal caveolae-mediated pathway, non already described, required to further examine the different steps of the intracellular traffic.

In the present study, using cell fractionation experiments, we established LDL receptor direct association with the clathrin-independent plasmalemma vesicle, caveolae. Furthermore, using three complementary approaches, photonic or electron microscopy, we determined the first steps of the transcellular pathway of LDL and Tf across the blood-brain barrier.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies

Antibodies (sources in parentheses) were as follows : rabbit polyclonal antibody against occludin (Zymed laboratories, Inc., South San Francisco, CA) ; bodipy-conjugated goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR) ; rabbit polyclonal anti-caveolin 1 antibody (C13630, Transduction laboratories, Lexington, KY) ; chicken polyclonal antibody to human LDL-receptor (Progen, Heidelberg, The Netherlands) ; rabbit anti-lamp 1; goat polyclonal anti apo-B (developed in the laboratory) ; CY5 conjugated goat anti rabbit IgG (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR) Alexa 488 conjugated rabbit anti-fluorescein IgG, Alexa 488 conjugated goat anti rabbit IgG (Molecular Probes, Inc, Eugene, OR) ; peroxidase conjugated rabbit anti chicken IgY (Jackson ImmunoResearch laboratories, Inc., West Grove, PA) ; peroxidase conjugated goat anti rabbit IgG (Sanofi diagnostics Pasteur, Gif sur Yvette, France)

Cell culture

Bovine brain capillary endothelial cells

Endothelial cells were isolated and characterised as described by Méresse et al. (1989). The use of cloned ECs allowed us to obtain a pure EC population without contamination by pericytes. The cells were cultured in the presence of Dulbecco'Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated calf serum and 10% (v/v) horse serum (Gibco Life Technologies), 2 mM glutamine, 50 µg/ml gentamycin and basic fibroblast growth factor (bFGF, 1 ng/ml, added every other day).

Rat astrocytes

Primary cultures of mixed astrocytes were made from newborn rat cerebral cortex. After removing the meninges, the brain tissue was gently forced through a nylon sieve, as described by Booher and Sensenbrenner (1972). Astrocytes were plated on six well dishes (Nunc; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) at a concentration of 3×10^4 cells/ml in 2 ml of DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco Life technologies) and the medium was changed twice a week. Three weeks after seeding, cultures of astrocytes were stabilized and were deprived of any oligodendrocyte contamination.

Coculture of ECs and astrocytes

Filters for coculture were prepared as follows : culture plate inserts (Millicell PC $3 \mu\text{m}$, 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 method proceeded as follows : Cultures of astrocytes were prepared as described above. After three weeks, coated filters were set in six-well dishes containing astrocytes, and ECs were plated, with a concentration of 4×10^5 cells/ml, on the upper side of the filters in 1.5 ml of medium. The medium shared by both cell types was the used for ECs cultured alone. This medium is 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.

Preparation of Low Density Lipoprotein, acetylated LDL and FITC transferrin.

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 0.15M NaCl and against DMEM. Acetylated LDL was prepared by treating LDL with acetic anhydride (Basu et al., 1976) and extensively dialyzed at 4°C against DMEM. FITC (fluorescein 5-isothiocyanate, Isomer I, Sigma) labeling of holoTf was performed as described : Transferrin (25µM) was dissolved in a bicarbonate buffer 0.1M (pH 9.5) and a 5-fold excess of FITC (125µM) was added drop by drop while stirring gently. After 6h at room temperature, uncoupled FITC was removed using a Sephadex G25 (PD10, Pharmacia) column equilibrated with PBS and the labeled protein was dilazed against PBS at 4°C. For all experiments the FITC/Tf molar ratio was inferior to 2.8.

Purification of caveolae and immunoblots

A plasma membrane fraction from bovine brain capillary endothelial cells cocultivated with astrocytes during 12 days, upregulated (Dehouck et al., 1994) or not, isolated as described by Smart et al. (1995), served as the starting membrane. After sonication, caveolin-containing microdomains were separated from residual plasmalemmal domains using two successive Optiprep gradients (Smart et al., 1995). Plasma membrane fractions and caveolar membrane fraction was concentrated by trichloroacetic acid precipitation and washed in acetone. Pellets were suspended in Laemmli (Laemmli, 1970)sample buffer and heated at 95°C for 3 min before being loaded onto gels. Proteins were separated in a 4-12% gel (NuPage TM 4-12% Bis Tris

gel, Vasse). The separated proteins were then transferred to nitrocellulose membrane. The membrane was blocked in phosphate buffer saline (PBS) that contained 10% dry milk for 1h30 at room temperature. Primary antibodies (rabbit polyclonal anti caveolin or chicken polyclonal antibody to human LDL-receptor) were diluted in PBS that contained 3% dry milk for 2h at room temperature. The membrane was washed five times with PBS. The second antibodies (goat anti rabbit IgG or rabbit anti chicken IgY all conjugated to horse radish peroxidase) were diluted 1:1000 or 1:5000 respectively in PBS containing 3% dry milk and incubated overnight at 4°C. The membrane was then washed and the bands were visualized using enhanced chemiluminescence detection (Amersham Laboratories).

Fluorescence microscopy

Ecs grown on porous filters were fixed at room temperature for 20 min with 4% paraformaldehyde in a fibrous components-stabilizing buffer [60mM piperazine-N, N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES), 25mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 10mM EGTA, 2mMMgCl₂ and 140mM NaCl, pH 6.9; PHEMS]. The cells on filter fragments were washed with PHEMS and permeabilized with cold-acetone (-20°C) for 1min, followed by two washes with PHEMS. Cells were stained with F-actin probe BODIPY phalloïdin (Molecular Probes) for 30 min at room temperature. For the localization of tight junctions-associated protein, occludin, the endothelial cells grown on porous filters were fixed and permeabilized with cold ethanol (-20°C). The samples were washed three times with Tris-buffer saline (TBS : Tris-HCl 20mM, NaCl 0.5M, pH 7) and soaked in the blocking solution (TBS containing 5% ovalbumin (wt/vol)) for 10 min at room temperature. Then they were incubated for 1h30 in a moist chamber with the rabbit anti-occludin polyclonal antibody

in the blocking solution. After rinsing, the cells were incubated for 1h with the secondary antibody, Bodipy-conjugated goat anti-rabbit IgG in the blocking solution.

For luminal uptake of fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled holo-transferrin (Tf), low density lipoprotein (LDL) or acetylated LDL (acLDL) prepared as described previously : Dehouck et al., 1997), the endothelial cells were incubated for 45 min at 37°C in prewarmed Ringer HEPES with FITC-Tf (200µg/ml (2.5µM ; FITC/Tf molar ratio : 2.6)) or LDL and ac LDL (35 µg/ml). All incubations were terminated by three washes in Ringer HEPES + 0.2% bovine serum albumin (BSA, cultured tested; ICN) and three washes in Ringer HEPES.

For detection of FITC-Tf cells were immediately fixed in ice cold ethanol (-20°C). As second antibodies, Alexa 488 conjugated rabbit anti-fluorescein IgG (to amplify the FITC-Tf signal) was used at a dilution 1/50 in blocking solution for 1 h at room temperature.

For LDL detection, cells previously incubated with LDL were fixed in ice-cold ethanol (-20°C). Both were detected using indirect immunofluorescence analysis. Cells were incubated overnight at 4°C with polyclonal goat anti-apoB antibodies. They were washed three times with the blocking solution and incubated 1 h at room temperature with second antibodies. As second antibodies, Alexa 568 donkey anti goat IgG (dilution 1/100 in blocking solution) was used.

Cells incubated with LDL or acLDL were washed twice with DMEM at 37°C. Some of them were incubated with chloroquine (100µM) for 30 and 60 minutes. Then, all were fixed in paraformaldehyde 4% and incubated overnight at 4°C either with anti-lamp 1 or anti-apoB antibodies. Alexa 488 goat anti-rabbit or rabbit anti-goat was used at the same dilution 1/100 in the blocking solution, to reveal lamp1 or apoB respectively.

Following a final rinse, the filters and their attached monolayers were mounted on glass microscopic slides using Mowiol mountant (Hoechst, Frankfurt). The specimens were visualised and photographed with a Leica fluorescence microscope.

Electron microscopy

Ultrathin section

The cells were fixed routinely with 2.5% glutaraldehyde in sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at 4°C and post-fixed in 1% OsO₄ for 60 min. After being dehydrated in ethanol and embedded in araldite, sections perpendicular to the monolayer-cultured cells, contrasted with lead hydroxide, were examined with an electron microscope (420 ; Philips, Eindhoven, The Netherlands). Same protocol was followed after cell incubation with Horse radish peroxidase (HRP) or gold-LDL labeled from freshly isolated LDL with 16nm colloidal gold according to the method of Handley et al. (1981). Same experiment was also performed after incubation of cells with gold-LDL following by filipin treatment (3µg/ml) for 20min at 37°C. Then cells were following the procedure described above.

Ultrathin Cryosection

Endothelial cells were incubated with FITC-Tf (200µg/ml) for 45 min at 37°C in prewarmed Ringer HEPES. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in PBS 1h at 4°C. Cells were washed with PBS and were incubated 1h30 in L-Lysine (0.1M in water) at 4°C. After washes, the cells were collected by scraping in PBS, embedding in 7.5% gelatin. The gelatin/cell suspension was solidified on ice. The pellet was removed gently from the tube and cut in appropriated blocks. Then, gelatin embedded specimen are infused in 2.3M sucrose at least 2 hours at 4°C. The

blocks mounted on the holders are immediately frozen in liquid nitrogen. Ultrathin sections were cut at -110°C and were placed on Formvar carbon coated grids. Double labeling of frozen sections was carried out. The immunolabeling procedure is performed by floating the grids on successive drops of washing, blocking and labeling solution disposed on parafilm sheet. FITC-Tf was detected using a polyclonal rabbit anti-FITC IgG antibody (1/50 in the blocking solution) 1h at room temperature following by a gold labeled (10nm) goat anti rabbit antibody (same conditions). Finally, the immunolabeled cryosections were contrasted and embedded before electron microscope observations.

RESULTS

Endothelial cell criteria

Fig 1 A illustrates the typical phenotypes of confluent brain capillary endothelial cells, on an insert coated with rat tail collagen, cocultured 12 days with astrocytes. Endothelial cells form a monolayer of non-overlapping and sprindle-shaped cells.

Endothelial cells in brain microvessels possess tight junctions of remarkably low permeability, which are to a large extent responsible for forming and maintaining the BBB in vivo (Risau and Wolburg, 1990 ; Rubin, 1991). F actin cytoskeleton plays a central role in the endothelial tight junction barrier regulation (Blum et al., 1997). Our immunofluorescent staining with bodipy-phalloïdin, a highly poisonous alkaloïd which specifically binds F-actin microfilaments, reveals a perijunctional actin organisation and fine actine fibers running linearly across the cell (Fig 1B). Occludin, an integral membrane protein also associated with tight junctions, was found to be expressed in various epithelial and endothelial tissues. Immunofluorescence microscopy (Fig 1C) demonstrated that brain capillary endothelial cells in culture clearly expressed occludin in a continuous fashion at cell-cell contacts, indicating that these cells are circumscribed by continuous junctional structures, as would be expected for a tight paracellular barrier. These data are in agreement with our previously published results concerning the high electrical resistance (500-800 $\Omega\cdot\text{cm}^2$) and the low permeability of our bovine brain capillary endothelial cell monolayer (Dehouck et al., 1990).

At the first means to determine whether caveolae could be present in these endothelial cells, we performed indirect immunofluorescent analyses on ethanol fixed endothelial cells cocultured with astrocytes during 12 days using a commercially available affinity-purified polyclonal antibodies against caveolin. Indeed, caveolin, a

21-24 Kda integral membrane protein, is a principal structural component of caveolae membranes in vivo (Rothberg et al., 1992 ; Kurzchalia et al., 1992). In brain capillary ECs exhibited intense staining, there was an heterogeneous punctuate staining over the body of the cells (Fig 2B) as well as a distinct bright linear staining along portions of the cells' borders (Fig 2C).

To determine whether the structures identified by indirect immunofluorescence correspond to cell surface invaginations and/or populations of subplasmalemma vesicles with the morphological features characteristic of caveolae, endothelial cell monolayers were processed for examination by thin-section electron microscopy. Flask-shaped invaginations of the plasma membrane, ~ 60nm in diameter were detected in all cells examined. Typically, 10 or more caveolae were collected into clusters, which were observed along both plasmalemma surfaces. Individual caveolae appeared to be in continuity with the plasmalemma surface, and thus open to the extracellular space (Fig 2A). Caveolae dispersed as singular entities were detected, but much less frequently. It should be mentioned that during the electron microscopy described above, we detected few, if any, clathrin-coated invaginations on the endothelial cell surfaces.

Taken together, these data support the fact that endothelial cells cocultured with astrocytes develop a morphology that closely resembles the endothelium in situ. These highly differentiated endothelial cells, mimicking the in vivo situation, allow us to examine the mechanism of transcellular transport that exists at the BBB level.

Co-localisation of the LDL-receptor and caveolin by cell fractionation experiments.

Preliminary studies suggested that caveolae are likely to be involved in the potential transport of LDL from the blood to the brain. To determine whether the LDL

receptor is really located in caveolar membranes, we first performed subcellular fractionation experiments.

Using the approach described by Smart et al. (1995), we isolated several distinct membrane compartments and used immunoblotting to determine whether endothelial cell caveolin-containing fractions isolated in the absence of nonionic detergent, contain the LDL receptor (Figure 3). The distribution of caveolin was determined with the polyclonal rabbit anti-caveolin 1 antibodies and the presence of the LDL receptor was checked using anti LDL receptor chicken antibodies. The different compartments include total plasma membrane (lane 1, 3) and low density, caveolin-rich plasma membranes (lane 2, 4). Although the LDL-receptor is present in the total plasma membranes (lane 1), its relative abundance in the caveolin-rich fraction (lane2) was not detectable under the loading and detection conditions used here.

We have already demonstrated that the lipid requirement of astrocytes increases the expression of endothelial cell LDL receptors (Dehouck et al., 1994). Indeed, the binding of LDL to endothelial cells cultured with cholesterol-depleted astrocytes, was increased a further sixfold. The fractionation experiment described above was performed using these “upregulated” cells. As shown in fig 3 lane 4, using the same protocol, a 135kDa protein corresponding to the LDL-receptor was detectable in the caveolin-rich fraction. Clathrin heavy chain has never been detected in the caveolin-rich fraction, although it was amply present in the starting homogenate, indicating that our fraction did not contain any coated-pit derived membrane fractions (not shown).

As caveolae have already been described as the clustering site of many different receptors capable of being internalized in the cell (ref), it was now of interest to determine whether these LDL-receptor rich caveola structures are involved in the LDL endocytosis within brain capillary ECs.

Caveola mediated-endocytosis

The caveolae mediated endocytosis in ECs was explored by electron microscopy. Horseradish peroxidase (HRP) is used as a marker of organelles involved in fluid-phase endocytosis. Luminally incubated HRP resulted in the labeling of numerous small non-coated vesicles still attached to the luminal surface or joined together to form the characteristic “bunch of grapes” morphology of the caveolae cluster. HRP was also observed close to the luminal surface of the cell in early tubulovesicular endosomes (not shown). After continuous internalization of the marker for 45 min at 37°C, the reaction product was still observed in small plasmalemmal non-coated vesicles but also in typical spherical structures containing numerous empty vesicular inclusions (Fig 4). The fact that if caveolae were fused with pre-existing or induced-endosomal compartment and thus moved inside out with a release of the caveolar content, these new multivesicular structures should be labeled with HRP.

Then, we next explored the ultrastructural localization of LDL. We have already demonstrated that during transcytosis, LDL reach the abluminal face of the endothelial cells without any degradation. To track the pathway of the conventional LDL-receptor ligand, colloidal gold conjugated LDL (LDL-Au) uptake was investigated to well defined the primary compartments involved in receptor-mediated endocytosis. After a 45min cell incubation with LDL-Au complexes, gold particles were observed near caveola structures (Fig. 5A) and detected in typical spherical structures containing numerous empty vesicular inclusions (Fig. 5B). In these vesicles, LDL-Au segregated outside internal profiles.

As described for the LDL, we also provided evidence for the transcytosis of iron-loaded Tf across the cerebral endothelium by way of a specific Tf receptor-

mediated pathway (Descamps et al., 1996). The ultrastructural Tf localization was performed by immunogold electron microscopy ultra-thin cryosections. After a 45 min incubation time, FITC labelled Tf was amplified using anti-FITC antibodies and detected with an anti-rabbit antibodies tagged with 10nm gold particles. As shown in Fig 5C, the immunogold labelling is specially associated within the same multivesicular body structures involved in the LDL-Au caveola-mediated endocytosis. This process seems to be a universal pathway of transport for macromolecules through the BBB.

In all sections studied, few clathrin-coated vesicles were observed and they never contained LDL-Au complexes or FITC-Tf.

Consistent with the expected role of cholesterol in the caveolae dynamics and our previously published fluorescent results concerning LDL or Tf endocytosis inhibition by filipin (Descamps et al., 1996 ; Dehouck et al., 1997), any spherical multivesicular structure was observed after this polyene antibiotic treatment. Interestingly, electron microscopy examination of pretreated cells show that filipin stopped the fusion or/and inside out internalization of caveolae in multivesicular structures (Fig 6), without clearly affecting the caveolae morphology.

All these observations demonstrated that these multivesicular bodies of endosomal structure result from a caveolae accumulation. Consequently, we propose the term of “caveosome” to refer to this type of late endosomes in brain capillary ECs.

Characterisation of the caveosomes involved in LDL or Tf transcytosis.

As we have previously demonstrated that LDL and Tf were not degraded in brain capillary ECs (Dehouck et al., 1997 ; Descamps et al., 1996), these caveosomes involved in LDL and Tf transcytosis seem not to be assimilated to lysosomal

compartments. To characterize this compartment, we compared the endocytosis of lipoproteins in LDL and acLDL-incubated cells. As shown in fig 7, cell incubation with DiI-acLDL or with DiI-LDL for 45min at 37°C, shows a more intense staining in acLDL (Fig 7B) compared to LDL (Fig 7A) incubated cells. When acLDL and LDL were both followed by polyclonal anti-apoB antibodies, the staining present a different pattern (Fig 7, C and D). This observation could be explain by the fact that acLDL are degraded in the brain capillary EC lysosomes as already described by Dehouck et al. (1997). Consequently, using anti-apoB antibodies, we detect only the vesicles in which apoB epitope is not degraded and thus correspond to the first steps of acLDL intracellular traffic pathways. Furthermore, fluorescent microscopy does not have sufficient resolution to identify morphologically, in LDL and acLDL-incubated cells, the vesicle compartments which individual sizes were in the same range from 500nm to 800nm. Nevertheless, morphological differences can be observed by electron microscopy (Fig 8). Thus, caveosomes containing LDL or acLDL are only morphologically distinguishable by electron microscopy. These limitations have prompted the development of new investigation using an acidotropic amine reagent such as chloroquine to characterize the late endosome containing native LDL.

Indeed, in our experimental protocol, a 45 min incubation of ECs with LDL or acLDL was sufficient to deliver our tracers to endosome that presumably which can acquire lysosomal enzyme. Among significant and complex effects of endosome function, we therefore investigated the effect of chloroquine treatment on the process of the osmotic shock investigated on monolayer cultures loaded with LDL or acLDL.

Figure 8 shows that, after exposure to anti-Lamp1 antibodies, cells incubated with LDL (Fig 9A) or with acLDL (Fig 9B) reveal the same pattern, exhibiting a punctuate plasmalemma-associated immunofluorescence over their entire extent.

According to the gradient distribution of chloroquine in the acidic compartments, in acLDL incubated cells, the osmotic shock induced by a chloroquine treatment provoke a huge increase in the vesicle sizes (Figure 10, A and C) compared to untreated cells (Fig 10B).

To objectivize these observations, the vesicle diameter measurements were then determined. As observed in the fluorescence microscopy studies (Fig 9), in acLDL and in LDL incubated cells, all lamp1 positive vesicles present the same mean diameter from 400 to 500 nm before chloroquine treatment. In acLDL chloroquine treated cells, the distribution of vesicle sizes shifted drastically, from 500 to 1500-2000 nm, (Fig 11A). Apparition of these large vesicles demonstrate that we are dealing with an acidic lamp1 positive compartment consistent with a lysosomal compartment formation in these cells. Interestingly, we have to note that such acidic vesicles were not revealed by anti-apoB antibodies (Fig 11A)

In contrast, in LDL chloroquine treated cells, the size shift was less pronounced and apoB and lamp1 stainings follow the same pattern (Fig 11B). The labeling concern, in majority, vesicles with a mean diameter from 500 to 1500nm which can be considered as mildly acidic vesicles devoided thus of lipoprotein degradation activity.

DISCUSSION

In vitro blood-brain barrier

The structural basis of the blood-brain barrier is dependent upon the properties of specialized brain capillary endothelial cells. Largely on the basis of the close approximation of vascular brain endothelial cells to astrocytes, it was proposed that the neural environment might be responsible for the development of the blood-brain barrier properties. By growing primary endothelial cells on one side of a porous filter and astrocytes on the other, we are able to reconstruct the unique environment that exists *in vivo* and induce *in vitro* most of the blood-brain barrier characteristics (Dehouck *et al.*, 1992; 1995). Among these characteristics, one structural element is of major importance for ensuring and maintaining brain homeostasis. Indeed, brain capillary endothelial cells form a continuous, tight junctions connected lining of the capillary wall that prevents paracellular flux of solutes. From the perspective of the tightness of the barrier, endothelial cells differ considerably in phenotype. Brain endothelial cells are coupled by tight junctions of extremely low permeability. In contrast, endothelial cells in non-neural tissues are coupled by much leakier tight junctions (Rubin, 1991). Recently Balda *et al.* (1996) and Mc Carthy *et al.* (1996) have demonstrated that overexpression of chicken occludin, an integral protein localized at tight junctions, in MDCK cells increased transepithelial electrical resistance. Their data are consistent with the idea that occludin expression can be a determinant of tight junction permeability. Even if occludin is now not the only integral membrane protein involved in tight junction functions (Saitou *et al.*, 1998), it stays one of their structural specific markers (Furuse *et al.*, 1998). Our immunofluorescence microscopy study clearly demonstrated that our endothelial cells in culture expressed occludin in a continuous fashion at cell to cell

contacts. The continuous staining of occludin at the cell border indicates not only that these cells are circumscribed by continuous junctional structures but also that these cells are highly differentiated endothelial cells from cerebral origin. Indeed, Hirase *et al.* (1997) have recently demonstrated that the expression level of occludin differs considerably depending on the source of the endothelial cells, being greater from brain than in those from non neural tissue in which occludin was hardly detectable. Brain capillary endothelial cells express high level of occludin and this may be essential for the formation of a continuous tight junction structure. Furthermore, following their data, occludin expression changes during development of the blood-brain barrier, being low in rat brain endothelial cells at post natal day 8 but clearly detectable at post natal 70 when the blood-brain barrier is well established. High level of occludin expression in our endothelial cells clearly demonstrated that we are dealing with highly differentiated brain capillary endothelial cells.

Another structural endothelium feature is its richness in plasmalemmal vesicles called caveolae. Our immunofluorescent results depict a wide staining of caveolin in brain capillary endothelial cells. A similar pattern has previously been described for anti-caveolin-1 staining of fibroblasts (Garcia-Cardena *et al.*, 1996 ; Smart *et al.*, 1994; Scherer *et al.* 1995). As caveolin is the principal component of the filaments that comprise the striated coat of caveolae (Rothberg *et al.*, 1992), the cellular distribution of caveolin should thus reflect the relative abundance of this organelle in the cells. Observations of thin sections of endothelial cells are in agreement with our fluorescent microscopic analysis showing numerous small non-coated vesicles still attached to the luminal surface, or joined together to form the characteristic “bunch of grapes” morphology of the caveolae cluster, or dispersed as singular entities in the cytoplasm.

These data, added to our previous results (Dehouck *et al.*, 1992; 1995) demonstrated that this model closely mimic the *in vivo* situation but permitting, at one and the same time, studies at the cellular level selectively on one of the cellular partner of the coculture device. Here, we have used this model to determine the intracellular compartments involved in blood-borne macromolecule transcytosis across the blood-brain barrier.

Caveolae as the first step of LDL and Tf transcytotic pathway through the brain capillary endothelial cells.

In contrast to peripheral vessel in which the LDL receptor is down regulated, confluent brain capillary endothelial cells express an LDL receptor in spite of their contact with physiological concentration of lipoprotein (Méresse *et al.*, 1989). As demonstrated using our *in vitro* model (Méresse *et al.*, 1989 ; Dehouck *et al.*, 1994), this receptor, luminally expressed, is likely to be a bona fide LDL receptor, as indicated by its saturability, its specificity and its molecular weight of 135. With the discovery of this LDL-receptor on the luminal side of the blood-brain barrier endothelial cells added to the observations demonstrating that enzymes involved in the lipoprotein metabolism are present in the brain microvasculature (Brecher and Kuan, 1979) and that entire fraction of the drug bound to lipoproteins is available for entry into the brain, it occurred that LDL might cross the blood-brain barrier. Although most aspects of this pathway were still unclear.

Using our *in vitro* blood-brain barrier model, we have demonstrated that in brain capillary endothelial cells, LDL did not follow the classical degradation pathway but undergo transcytosis through the endothelial cells by a receptor-mediated process

bypassing the lysosomal compartment (Dehouck *et al.*, 1997). Moreover, preliminary studies have shown that filipin treatment, a sterol binding agent causing the disassembly of caveolae (Rothberg *et al.*, 1990 ; 1992) completely abolished LDL endocytosis, suggesting that caveolae are likely to be involved in the potential LDL transport from the blood to the brain. Taken together, these results have allowed us to think that the LDL receptor expressed at the brain capillary endothelial cell luminal face is, in contrast to all other cell types, located in caveolae instead of in clathrin-coated pits.

In order to attain such critical molecular information, subfractionation experiments were performed to isolate endothelial cell plasma membranes from which caveolae were purified from other microdomains. As it has been demonstrated that the advantages of the insolubility of caveolae microdomains in non ionic detergents such as Triton X100 resulted in the loss or the redistribution of some caveolae-associated protein, the detergent free method described by Smart *et al.* (1995) was used to purify caveolae membranes. Moreover, using this method, caveolae are described to be purer than those obtained with the other methods (Sargiacoma *et al.*, 1993 ; Chang *et al.*, 1994).

Accordingly, in contrast to previous studies of detergent insoluble microdomains isolated from neurons, neuroblastoma cells, and multiple brain regions in which caveolin protein or message have not been detected (Lisanti *et al.*, 1994 ; Shyng *et al.*, 1994 ; Gorodinsky and Harris, 1995 ; Olive *et al.*, 1995 ; Bouillot *et al.*, 1996 ; Scherer *et al.*, 1996 ; Song *et al.*, 1996 ; Wu *et al.*, 1997), in brain capillary ECs, caveolin was detected in all fractions loaded. But, in these studies, insoluble complexes isolated from brain regions did not represent only and specifically caveolae fractions. This idea was supported by the work of Cameron *et al.* (1997) who detect caveolin in astrocytes. As it was not possible to detect caveolin in these brain fractions probably rich in astrocytes

(astrocytes are the most numerous cellular element of brain), these results allowed us to conclude that this method was not sensitive enough to detect caveolin from any other brain cells. So, detection of caveolae and caveolin in brain capillary endothelial cells was not really unlikely. But, in basal conditions, we never succeeded in detecting the LDL receptor in the caveola rich fraction purified isolated following the method described by Smart *et al.* (1995).

The vascular system is lined with a very attenuated monolayer of highly differentiated endothelial cells that are strategically located to form the critical barrier regulating the exchange from the circulating blood to the underlying tissue cells. Endothelial cells are quite responsive to the local tissue environment and may modulate their phenotype and barrier function in accordance with the need of the underlying tissue cells. Using our model, we demonstrated that the brain capillary endothelium did not do exception to this rule. Indeed, the lipid requirement of astrocytes increases the number of LDL receptor at the luminal side of brain capillary endothelial cells, increasing in the same time the LDL transcytosis across the endothelial cell monolayer. Our biochemical assays are in total agreement with these previous results, showing that for equal amount of caveola protein fractions loaded on the gel, we detected the LDL receptor only in caveolin-rich fraction from upregulated cells. It is interesting to note that the caveolin signal intensity did not change demonstrating that, in upregulated cells, there is an increase in the number of LDL receptor at the cell surface (Dehouck *et al.*, 1994) which is concentrated in caveolae. As this increase in the LDL receptor number was followed by an increase in the LDL endocytosis and transcytosis (Dehouck *et al.*, 1997), these results strongly suggest that the endothelial cell caveolae of the blood-brain barrier are the major putative way of entry for LDL to the central nervous system.

Different results were obtained by Lisanti *et al.* (1994) who demonstrated that, in peripheral vessels, the characterization of caveolin-rich membrane domains reveals known receptors for modified LDL (Scavenger, CD36 and RAGE) and multiple GPI-linked protein, but not the receptor for native LDL. This is not surprising owing to the fact that in peripheral vessels, in physiologic conditions, in contrast to brain capillary endothelial cells, the LDL receptor is down regulated. Moreover, in brain capillary endothelial cells which express the LDL receptor in spite of the tight apposition of endothelial cells and their contact with high concentrations of lipoproteins (Méresse *et al.*, 1989; Dehouck *et al.*, 1994), upregulation experiments were necessary to detect the LDL receptor in the caveolae fraction.

LDL and Tf are both delivered to the same intracellular multivesicular compartment, the caveosome.

Until recently, it was presumed that caveolae were permanent features of plasma membranes (Bundgaard *et al.*, 1979 ; Frøkjaer-Jensen *et al.*, 1988 ; Reviewed in Severs 1988) but increasing evident studies of endothelial cells (Schnitzer *et al.*, 1994) and fibroblasts (Parton *et al.*, 1994) suggest that caveolae can bud from the plasma membrane and are not purely static features on the cell surface (Lamaze and Schmid, 1995).

A purification of endothelial cell caveolae provided evidence that the molecular machinery required for fusion and docking of budded caveolae may be associated with the caveolar membrane (Schnitzer *et al.*, 1995). GTP hydrolysis is necessary for the severing of caveolar invaginations to produce discrete endocytic vesicles that are detached from the plasma membrane (Schnitzer *et al.*, 1996). Recently, Henley *et al.*

(1998) provided insight into the molecular mechanisms governing the GTP mediated internalization of caveolae by demonstrating that dynamin 2, which belongs to an expanding family of ubiquitously expressed GTPases that have been implicated in severing clathrin-coated pits during receptor-mediated endocytosis, colocalises with caveolin and mediates the internalization of caveolae in mammalian cells. All these results demonstrated that caveolae and their bound ligand can be internalized in endothelial cells.

By using labelling markers compatible with the particle size, we followed through the ECs, LDL using colloidal gold conjugated-LDL particles and Tf by an indirect immunodetection method. Whatever the protocol used, LDL and Tf are, in contrast to that was described in all other cell types, not directed to the lysosomal compartment but are detected in the same multivesicular structures. Same observations were done by using a fluid phase marker, HRP. Furthermore, the fact that filipin stopped the fusion and/or inside internalization of caveolae in multivesicular structures argues in favor of a function of caveolae in non-clathrin-dependent endocytosis and transcytosis as already mentioned by Montesano *et al.*, (1982), Milici *et al.* (1987) and Tran *et al.* (1987). This filipin experiment also demonstrated that these multivesicular bodies were formed by a caveolae accumulation. Consequently, we suggest to designate these endosomal structures as *caveosomes*. Taken together these observations show that caveolae are dynamic structures which can be internalized into the cells, leaving little doubt about the function of caveolae in fluid-phase and receptor-mediated endocytosis as previously demonstrated by Ghitescu *et al* (1986) and Villashi *et al.* (1986) using albumin-gold complexes on peripheral capillary endothelia.

All these results indicate that the transcytotic receptor-mediated process involving caveolae and *caveosome* seem to be a feature of brain capillary ECs for the transport of blood-borne molecules to the brain.

Caveosome characterization

We have previously demonstrated that ECs express all the enzymes required for lipoprotein degradation, ac LDL being degraded by these cells (Dehouck *et al.*, 1997). AcLDL incubated cells were thus used as the control of the lysosomal compartment formation in brain capillary ECs. When cells were loaded with LDL or acLDL, apoB immunolabelling experiments reveals that both intracellular compartments present the same sizes. These stained compartments in which apoB epitope was still detectable, can be considered as the first steps of acLDL intracellular traffic. Nevertheless, the duration of 45 min of incubation is sufficient to deliver our tracers to endosome that presumably had time to acidify and acquire lysosomal enzymes. Using chloroquine, a weak base which accumulate in acidic compartments, we detected such very acidic vesicles but only in acLDL-incubated cells. In these lamp1 vesicles, it was impossible, using anti apo-B antibodies, to detect apoB epitope. These results are in agreement with the degradative capability of brain capillary ECs.

Nevertheless, in LDL incubated cells, only mildly acidic apoB positive caveosomes were detected after chloroquine treatment, confirming that in these cells, LDL were not degraded. Interestingly, all compartments, caveosomes as well as very acidic vesicles, were lamp1 positives. This result is in agreement with those of Williams and Fukuda (1990) demonstrating that even if Lamp1 resides primarily in lysosomes, it has been also proposed to be expressed by other endosomal structures.

In brain capillary ECs, like in lung endothelium, plasmalemmal vesicles can thus be divided in subpopulation depending on their intracellular destination (Schnitzer *et al.*, 1993). In lung ECs, modified albumins may bind via their receptors to a select subpopulation of caveolae that are involved in receptor-mediated endocytosis and degradation whereas native albumin may bind another set of vesicles mediating transcytosis. Alternatively, selective binding to each set of receptor may result in the clustering of ligand-receptor complexes and the formation of distinct vesicles destined for different sites in the cell. These results pinpoint the fact that different signaling molecules have to be activated to induce each of these pathways. Even if kinase and phosphatase have been described to regulate caveolae internalization (Smart *et al.*, 1995), nothing is known about the different intracellular traffic pathway regulation. As similar results were obtained here with LDL and acLDL in brain capillary ECs, further studies might be done to get insight at the molecular level of the different signaling molecules involved in their cellular pathway activations.

In summary, in differentiated brain capillary ECs, LDL and Tf do not follow the classical degradative pathway (coated pits, endosomes and lysosomes) but are transcytosed through the cells by a caveolae dependent process. Both blood-borne molecules are delivered to the same mildly acidic and lamp1 positive intracellular multivesicular compartment, the caveosome. Further studies are now necessary to better characterize this compartment using different known endosomal markers (Exemples *et al.* ref) in order to determine if we are dealing with a totally unknown compartment or if it can be related to one that still exists in other cell types. The existence, in different cells, such as lymphocytes or macrophages, of the MHC class II compartment, mildly acidic and containing the typical lysosome associated membrane protein, lamp1 (Ojcius *et al.*,

1997), which are composed of 50-60nm vesicles surrounded by a limiting membrane (Riberdy *et al.*, 1994) suggest that the multivesicular compartments described here should be related to this already described in a variety of antigen-presenting cells. The function and the becoming of such intracellular compartments in ECs have to be investigated.

References

- Audus, K.L., R.L. Bartel, I.J. Hidalgo, and R.T. Borchardt. 1990. The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies. *Pharm. Res.* 7 : 435-451.
- Balda, M.S., J.A. Whitney, C. Flores, S. Gonzalez, M. Cereijido, and K. Matter. 1996. Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell. Biol.* 134 (4) : 1031-1049.
- Basu, S.K., J.M. Goldstein, 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. USA.* 73 : 493-502.
- Beard, J.L., J.R. Connor, and B.C. Jones. 1993. Iron in the brain. *Nutr. Rev.* 51: 157-170.
- Betz, A.L., and G.W. Goldstein. 1978. Polarity of the blood-brain barrier : neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science.* 202: 225-227.
- Blum, M.S., E. Toninelli, J.M. Anderson, M.S. Balda, J. Zhou, L. O'Donnell, R. Pardi, and J.R. Bender. Cytoskeletal rearrangement mediates human microvascular endothelial tight junction modulation by cytokines. 1997. *Am. J. Physiol.* 273 : H286-H294.
- 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.

- Brecher, P., and H.T. Kuan. 1979. Lipoprotein lipase and acid lipase activity in rabbit brain microvessels. *J. Lipid Res.* 20 : 464-471.
- Chang, W.J., Y.S. Ying, K.G. Rothberg, N.M. Hooper, A.J. Turner, H.A. Gambliel, J. De Gunzburg, S.M. Mumby, A.G. Gilmanand, and R.G. Anderson. 1994. Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell. Biol.* 126 : 127-138.
- Dehouck, B., M.P. Dehouck, J.C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1994. Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier : intercommunication between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J. Cell Biol.* 126(2) : 465-473.
- Dehouck, B., L. Fenart, M.P. Dehouck, A. Pierce, G. Torpier, and R. Cecchelli. 1997. A new function of the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J. Cell. Biol.* 138: 877-889.
- Dehouck, M.P., B. Dehouck , C. Schluep , M. Lemaire, and R. Cecchelli. 1995. Drug transport to the brain : comparison between in vitro and in vivo models of the blood-brain barrier. *Eur. J. Pharm. Sc.* 3: 357-365.
- Dehouck, M.P., P. Jolliet-Riant, F. Brée, J.C. Fruchart, R. Cecchelli, and J.P. Tillement. 1992. Drug transfert across the blood-brain barrier in vitro and in vivo models. *J. Neurochem.* 58 (5) : 1790-1797.
- Dehouck, M.P., S. Méresse, P. Delorme, J. C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1990. An easier, reproducible and mass-production method to study the blood-brain barrier "in vitro". *J. Neurochem.* 54 : 1798-1801.
- Descamps, L., R. Cecchelli, and G. Torpier. 1997. Effects of tumor necrosis factor on receptor-mediated endocytosis and barrier functions of bovine brain capillary endothelial cell monolayers. *J. Neuroimmunol.* 74 : 173-184
- Descamps, L., M.P. Dehouck, G. Torpier, and R. Cecchelli. Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells.1996. *Am. J. Physiol.* 270 : H1149-H1158.

- Dexter, D.T., P. Jenner, A.H.V. Schapira, and C.D. Marsden. 1992. Alterations in levels of iron, ferritin, and other trace metals in neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Ann. Neurol.* 32 (suppl), S94-S100.
- Dupree, P., R.G. Parton, G. Raposo, T.V. Kurzchalia, and K. Simons. 1993. Caveolae and sorting in the trans-golgi network of epithelial cells. *EMBO* 12 : 1597-1605.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto, and S. Tsukita. 1998. Claudin-1 and -2 : Novel membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell. Biol.* 141 : 1539-1550.
- Goldstein, G.W., A.L. Betz, P.D. Bowman, and K. Dorovini-Zis. 1986. In vitro studies of the blood-brain barrier using isolated brain capillaries and cultured endothelial cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 481 : 202-213.
- 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 α -ethinyl estradiol. *J. Cell. Biol.* 90 : 778-785.
- Jefferies, W.A., M.R. Brandon, S.V. Hunt, A.F. Williams, K.C. Gatter, and D.Y. Mason. 1984. Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature.* 312 : 162-163.
- Jellinger, K. and E. Kienzl. 1993. Iron deposits in brain disorders. In *Iron in Central nervous System Disorders* (Riederer P. and Youdim M.D.H., eds) Springer-Verlag, New York, 19-36.
- Joo F. 1993. The blood-brain barrier in vitro: the second decade. *Neurochem. Int.* 23 : 499-521.
- Kenagy, R., E.L. Bierman, S. Schwartz, and J.J. Albers. 1984. Metabolism of low density lipoprotein by bovine endothelial cells as a function of cell density. *Arteriosclerosis.* 4 : 365-371.

- Kurzchalia, T.V., P. Dupree, R.G. Parton, R. Kellner, H. Virat, M. Lehnert, and K. Simons. 1992. VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J. Cell. Biol.* 118 : 1003-1014.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)*. 227 : 680-685.
- Malavolti, M., H. Fromm, S. Ceryak, and K.L. Shenan. 1991. Cerebral low-density lipoprotein (LDL) uptake is stimulated by acute bile drainage. *Biochem. Biophys. Acta*. 1081: 106-108.
- Méresse, S., M.P. Dehouck, P. Delorme, J.C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1991. Lipoproteins and reconstituted blood-brain barrier. *Pharmaceutical Applications of Cell and Tissue Culture to Drug Transport* 217-229.
- Méresse, S., C. Delbart, J. C. Fruchart, and R. Cecchelli. 1989. Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J. Neurochem.* 53 : 340-345.
- Morris, C.M., A.B. Keith, J.A. Edwardson, and R.G.L. Pullen. 1992. Uptake and distribution of iron and transferrin in the adult rat brain. *J. Neurochem.* 59: 300-306.
- Ojcius, D.M., R. Hellio, and A. Dautry-Varsat. 1997. Distribution of endosomal, lysosomal, and major histocompatibility complex markers in a monocytic cell line infected with chlamydia psittaci. *Infect. Immun.* 65 : 2437-2442.
- Oldendorf, W. H. 1971. Brain uptake of radiolabeled aminoacids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am. J. Physiol.* 221 : 1629-1639.
- Palade, G.E. Fine structure of blood-capillaries. 1953. *J. Appl. Physics.* 24 : 1424.
- Pardridge, W.M. 1983. Brain metabolism : a perspective from the BBB. *Physiol. Rev.* 63 : 1481-1535.
- Pardridge, W.M. 1991. Overview of blood-brain barrier transport biology and experimental methodologies. In Pardridge W.M. (eds). *Peptide drug delivery to the brain*. Raven Press, New York, 99-122.

- Parton, R.G. Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. 1994. *J. Histochem. Cytochem.* 42 : 155-166.
- Riberdy, J.M., R.R. Avva, H.J. Geuze, and P. Cresswell. 1994. Transport and intracellular distribution of MHC class II molecules and associated invariant chain in normal and antigen-processing mutant cell lines. *J. Cell. Biol.* 125 : 1225-1237.
- Risau, W. and H. Wolburg. 1990. Development of the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 13: 174-178.
- Roskam, A.J.I. and J.R. Connor. 1994. Iron, transferrin, and ferritin in the rat brain during developemnt and aging. *J. Neurochem.* 63 : 709-716.
- Rothberg, K.G., J.E. Henser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney, and R.G.W. Anderson. 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68 : 673-682.
- Rothberg, K.G., Y.S. Ying, B.A. Kamen, and R.G. Anderson. 1990. Cholesterol controls the clustering of the glycopospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell. Biol.* 111 : 2931-2938.
- Saitou, M., K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto., M. Furuse, H. Takano, T. Noda, and Sh Tsukita. 1998. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell. Biol.* 137 : 1393-1401.
- Sargiacomo, M., M. Sudol, Z. Tang, and M.P. Lisanti. 1993. Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 122 : 789-807.
- Schnitzer, J.E. Update on the cellular and molecular basis of capillary permeability.1993. *TCM.* 3(4) : 124-130.
- Smart, E.J., Y.S. Ying, P.A. Conrad, and R.G. Anderson. 1994. Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell. Biol.* 127 : 1185-1197.

- Smart, E.J., Y.S. Ying, C. Mineo, and R.G. Anderson. 1995. A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 10104-10108.
- Song, K.S., P.E. Scherer, Z. Tang, T. Okamoto, S. Li, M. Chafel, C. Chu, D.S. Kohtz, and M.P. Lisanti. 1996. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dzstrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 271 : 15160-15165.
- Takakura, Y., K.L. Audus, and R.T. Borchardt. Blood-brain barrier : transport studies in isolated brain capillaries and in cultured brain endothelial cells. *Adv. Pharmacol.* 22 : 137-165.
- 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.
- Youdim, M.B.H. 1988. Iron in the brain : implications for Parkinson's and Alzheimer's diseases. *Mt. Sinai. J. Med.* 55: 97-101.

LEGENDS

Figure 1 : Phase contrast micrograph of confluent brain capillary endothelial cells grown on the upper face of a collagen coated-filter (A). F-actin (B) and Occludin (C) immunolabellings. Bars represent 50 μm .

Figure 2 : Electron micrograph shows typical membrane invaginations found at the brain capillary endothelial cell surface (A). Numerous budding profiles lacking clathrin coats and resembling caveolae were found at the plasma membrane. Indirect immunofluorescent staining on ethanol fixed ECs cocultured with astrocytes during 12 days using a commercially available affinity-purified polyclonal antibodies against caveolin (B). In those cells that exhibited an intense staining, there was a distinct bright linear staining along portions of the cell borders (C, curved arrows). In A, bar = 1 μm . In B and C, bars = 25 μm .

Figure 3 : Immunoblot detection of proteins that were enriched in caveolae. Two fractions from ECs in coculture (1, 2) or from upregulated cells (3, 4) were used in the standard immunoblot assay; 10 μg of whole cell lysate (1, 3), 5 μg of caveolae (2, 4). Each of these samples was separated on 4-15% SDS / polyacrylamide gel and immunoblotted with anti-LDL receptor antibodies (top) or with anti-caveolin antibodies (bottom) as described in materials and methods.

Figure 4 : Characterization of the endosomal “clathrin-independent” pinocytic pathways in differentiated ECs. ECs were incubated with HRP luminally for 45 min at

37°C. HRP is present in caveolae and in larger structure deeper in the cell. The multivesicular nature of the structures is apparent. Bar = 0,5 µm.

Figure 5 : Description of the endosomal “clathrin independent” LDL and Tf pinocytic pathways in ECs. At early time of incubation LDL-Au are observed near plasmalemmal vesicles, caveolae (A, arrow). Internalized luminally administered gold-labeled LDL were detected, after 45min incubation, in multivesicular structure (B) and appear to be segregated outside internal profiles (open arrow). Immunogold detection of FITC-Tf on EC ultrathin cryosections (C). After 45 min incubation with FITC-Tf, small clusters of immunogold particles are localized in the same multivesicular compartment (open arrow). Occasionally, single gold-particles are detected in isolated endocytosed vesicles (arrow). N = Nucleus, Bar = 0.25 µm.

Figure 6 : Electron microscopy micrograph of EC multivesicular structure after filipin treatment. 20 min incubated ECs with filipin (3µg/ml) at 37°C stopped the fusion or/and inside out internalization of caveolae in multivesicular structure. We propose to designate this multivesicular structure *cavéosome*. Bar = 0.25µm.

Figure 7 : Immunofluorescent labeling of LDL or acLDL internalized in brain capillary ECs. When DiI-LDL and DiI-acLDL were incubated for 45 min at 37°C on brain capillary ECs, acLDL-incubated cells (B) present a more intense staining compared to LDL incubated cells (A). When internalized lipoproteins were detected with anti-apoB polyclonal antibodies, the staining pattern is different (C and D). The location of the primary antibodies was visualized with Alexa 568-labeled secondary antibodies. In A and B, bars = 50µm. In C and D, bars = 30µm.

Figure 8 : Electron microscopy micrograph of brain capillary ECs depicts a different morphology between a caveosome and a lysosomal vesicle. Bar = 0.25 μ m.

Figure 9 : Indirect immunofluorescent localization of Lamp1 on paraformaldehyde-fixed cells previously incubated with LDL (A) or ac LDL (B). The staining pattern is identical in the two incubation-conditions and is characterized by intensively fluorescent puncta that are scattered throughout the cytoplasm, particularly in the perinuclear region. Bars = 25 μ m.

Figure 10 : Immunofluorescent labeling of Lamp1 on acLDL incubated cells treated with chloroquine during 60min. After chloroquine treatment, vesicles observed are larger (A and C) compared to treated cells (B). According to the chloroquine activity, apparition of large vesicles demonstrate that we are dealing with an acidic compartment. In A, bar = 20 μ m; In B and C, bars = 10 μ m.

Figure 11 : Vesicle diameter measurements in acLDL (A) or LDL (B) incubated cells. Measurements were done on lipoprotein loaded ECs treated (black lines) or not (dashed lines) with chloroquine (100 μ M) for 60 min at 37°C.

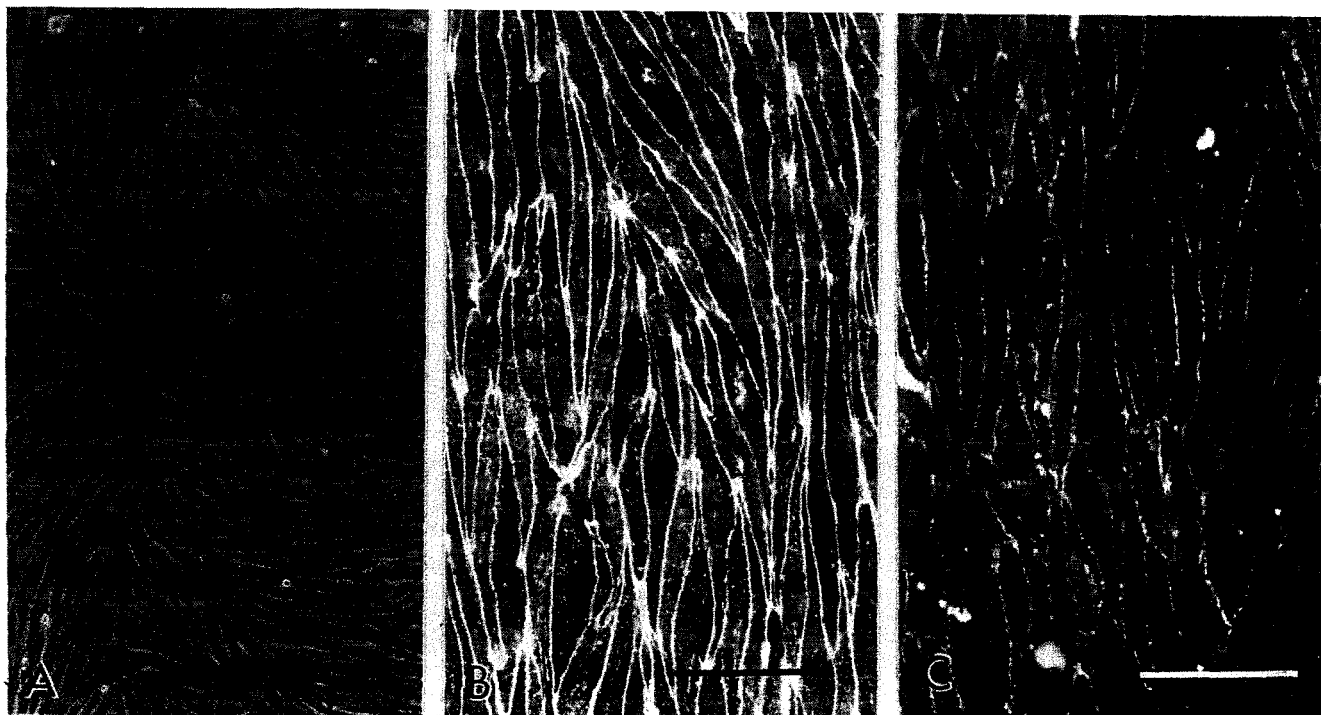


FIGURE 1

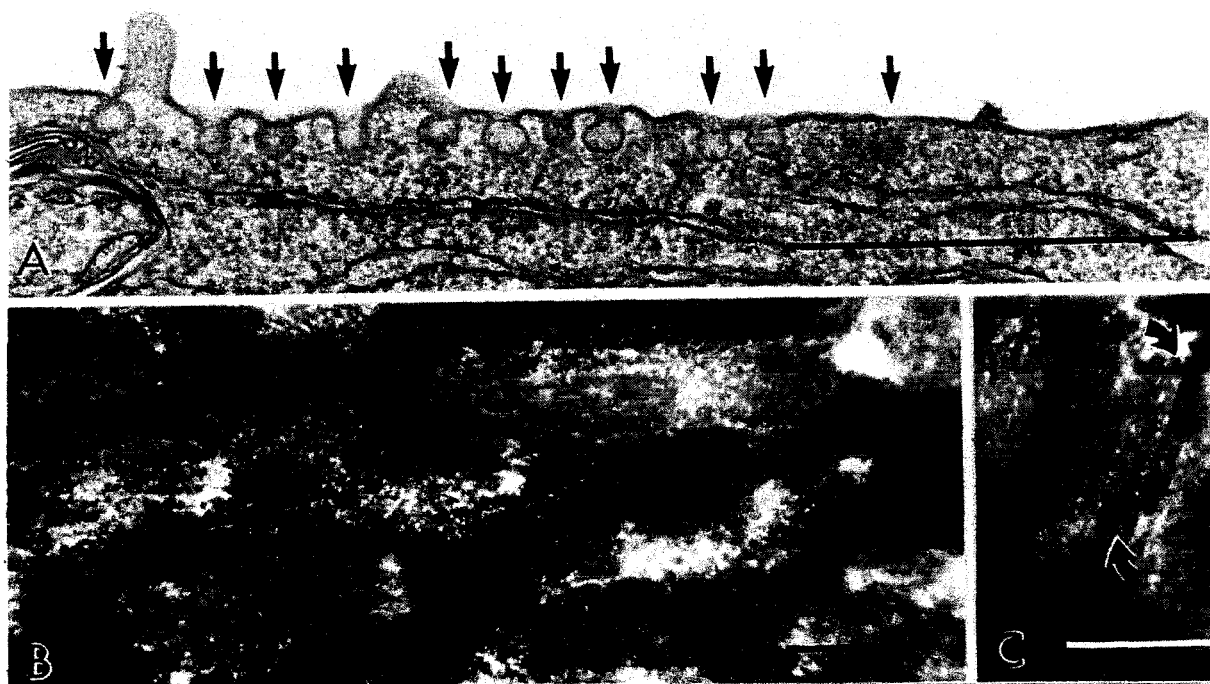


FIGURE 2

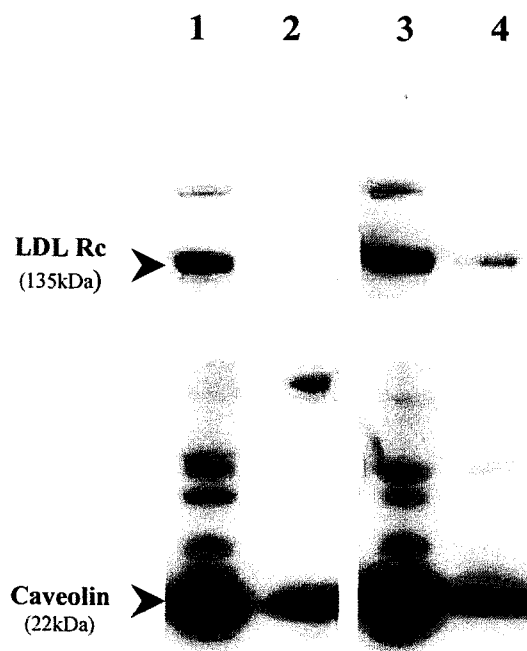


FIGURE 3



FIGURE 4

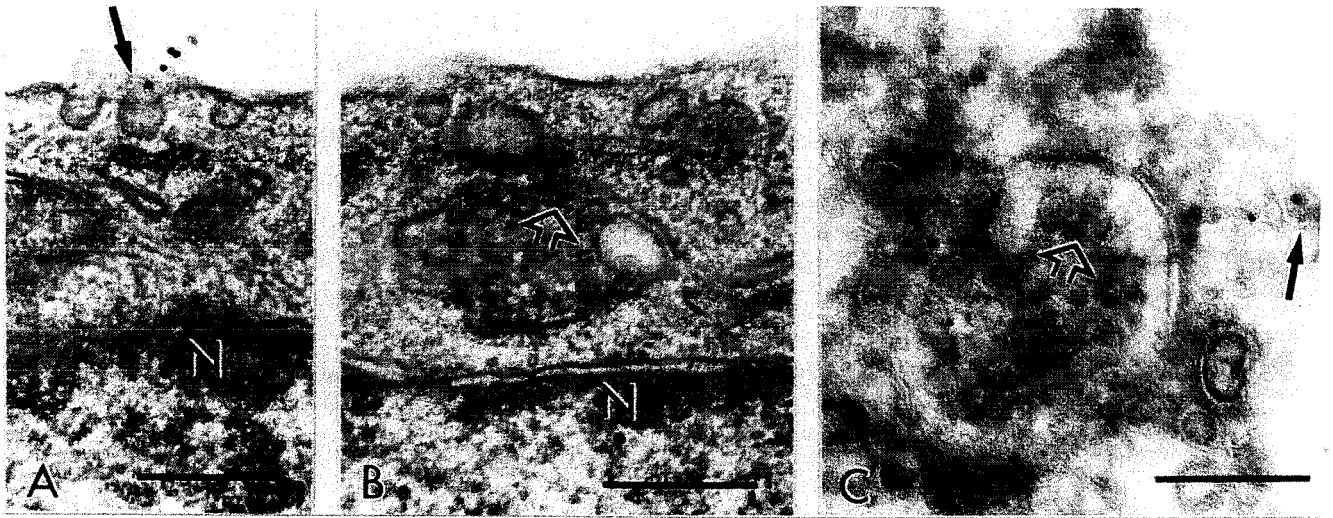


FIGURE 5



FIGURE 6



FIGURE 7

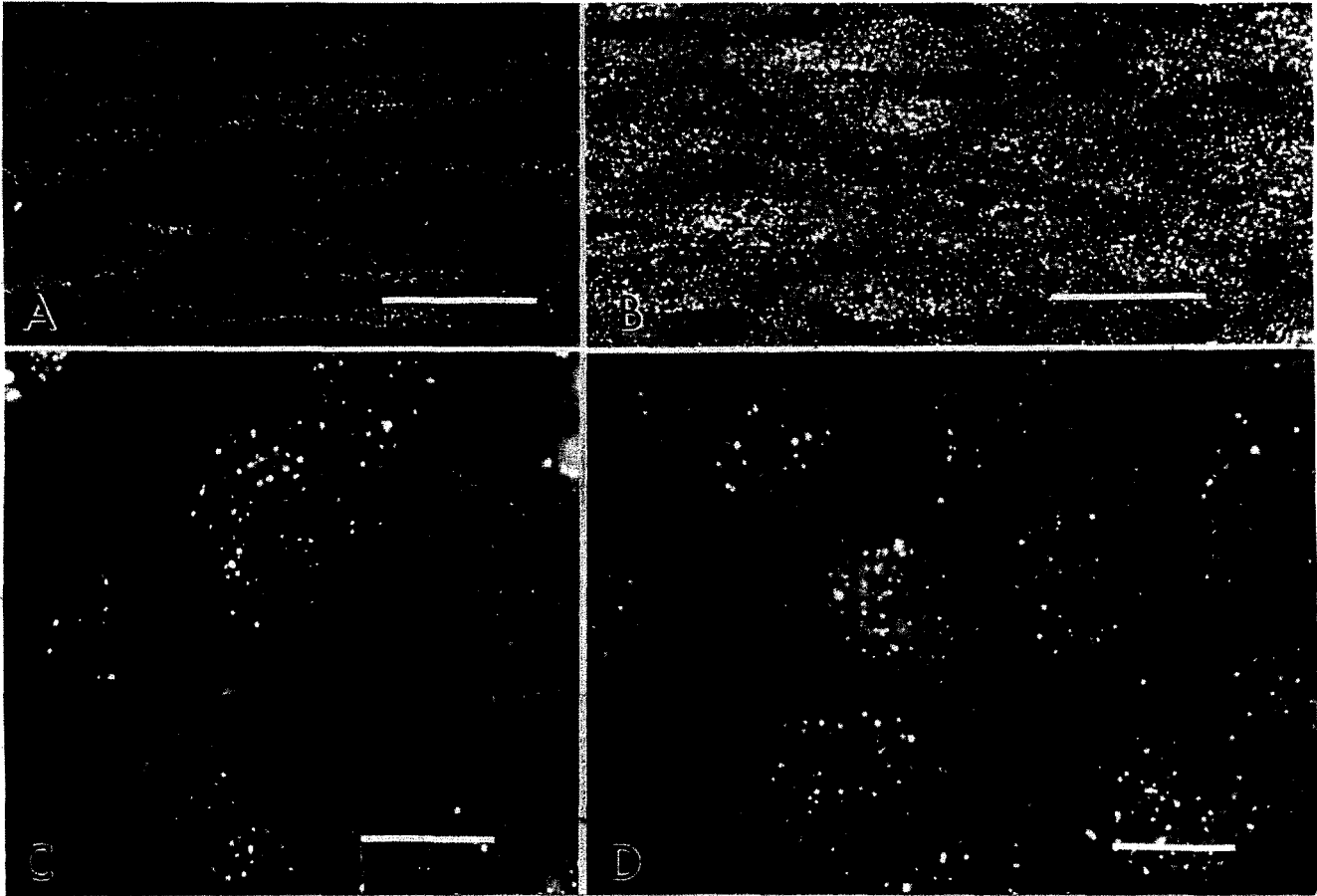


FIGURE 8

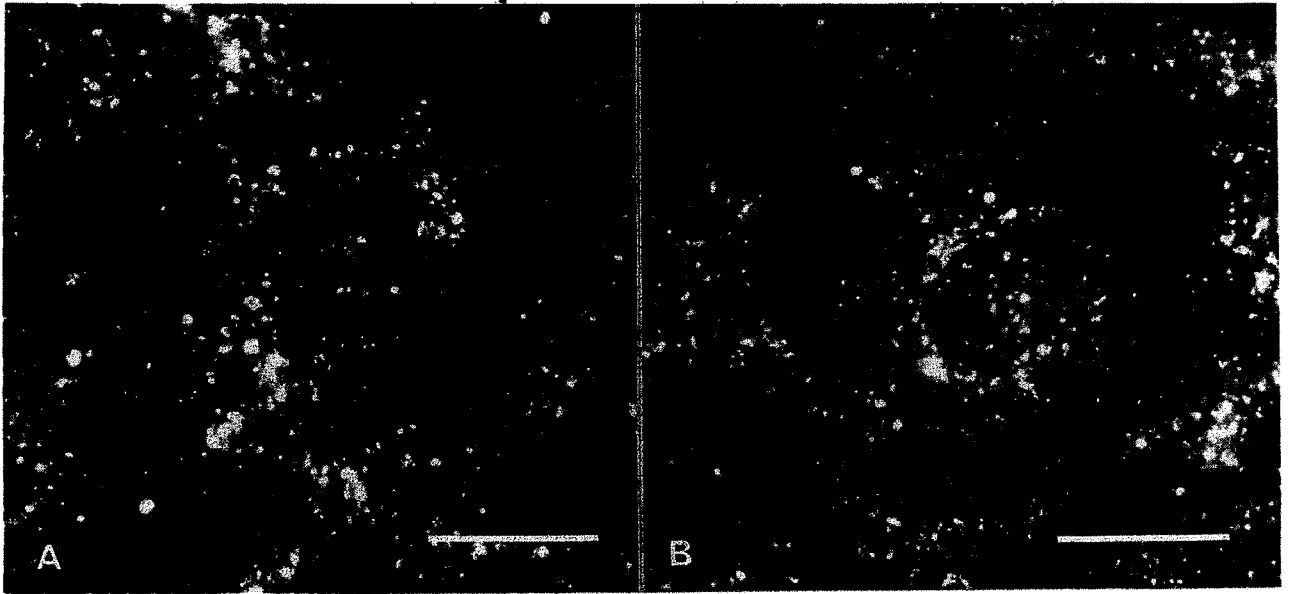


FIGURE 9

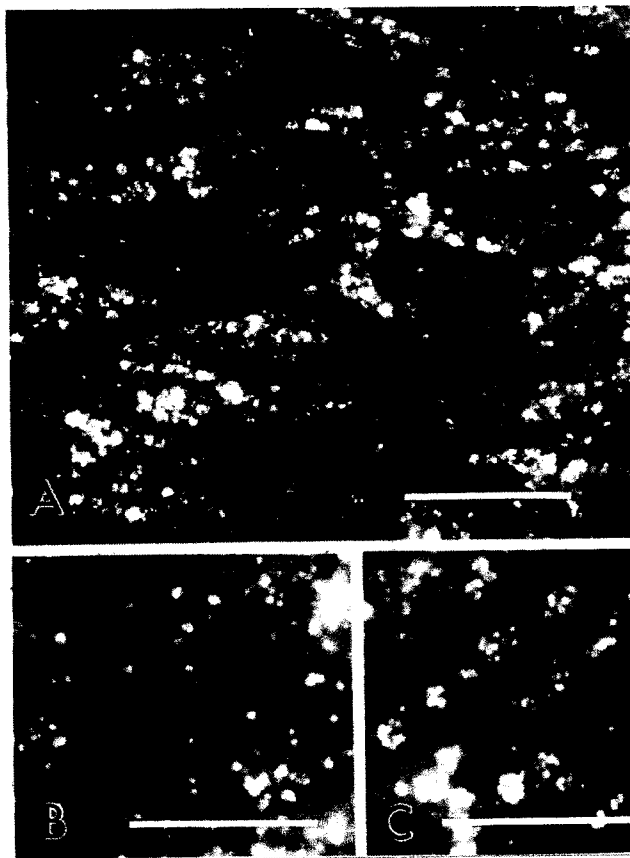


FIGURE 10

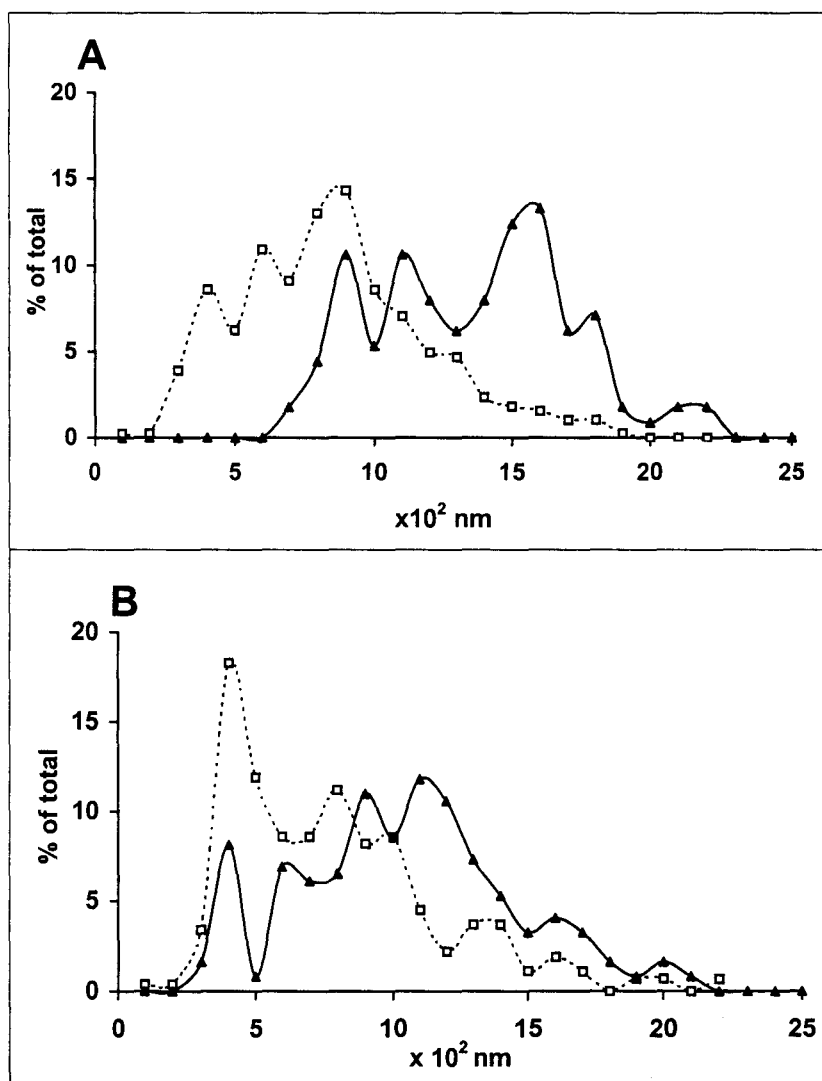


FIGURE 11

CONCLUSIONS DE L'ARTICLE 3

L'ensemble de nos résultats confirme les hypothèses émises dans l'article 2 concernant l'implication des cavéoles dans la transcytose des LDL à travers la BHE. En effet, nos résultats démontrent que **le récepteur apo(B,E) exprimé par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux différenciées est localisé dans la fraction cellulaire enrichie en cavéoles.**

De plus, nos études de microscopie électronique nous ont permis d'établir les premières étapes du trafic intracellulaire des **LDL et de la transferrine** dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux. Après internalisation, ces macromolécules sont véhiculées vers des compartiments de structure « multivésiculaires » formées de l'accumulation de cavéoles, les *cavéosomes*.

Nos études de microscopie à fluorescence ont permis, en utilisant la chloroquine, de conclure que ces compartiments endosomaux **Lamp1 positifs présentent un pH légèrement acide.** Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment publiés (article 2 ; Descamps *et al.*, 1996) démontrant que, les LDL natives et la transferrine, ne sont pas dégradées dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux différenciées et suivent donc une voie de trafic intracellulaire différente de la voie lysosomale classique. Pourtant cette voie est fonctionnelle dans ces cellules, puisqu'elle est induite en présence de LDL acétylées. En effet, lorsque les cellules sont incubées en présence de LDL acétylées, ces **LDL modifiées vont être dirigées dans des compartiments Lamp1 positifs, beaucoup plus acides** dans lesquels elles seront dégradées.

L'ensemble de nos résultats a permis de définir les premières étapes de cette voie originale de transcytose des LDL et de la transferrine, mise en évidence dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux différenciées. Ainsi, ces macromolécules plasmatiques s'accumulent dans des *cavéosomes* Lamp1 positifs et légèrement acides, avant d'être relarguées face abluminale de la cellules endothéliale pour apporter les éléments essentiels aux besoins des cellules nerveuses sous jacentes.

Cette voie de transcytose, mise en évidence dans les 2 articles précédents, ne pourrait-elle pas permettre de court-circuiter les caractéristiques structurales et biochimiques qui réduisent les phénomènes de diffusion non spécifiques à travers la BHE, nécessaires au maintien de l'homéostasie du SNC, mais qui restent un obstacle majeur pour le traitement des maladies cérébrales ? De nombreuses stratégies ont été développées pour améliorer le passage des médicaments vers le cerveau et, **dans l'article suivant, nous présentons une utilisation potentielle de cette voie du trafic intracellulaire pour vectoriser des médicaments vers le parenchyme cérébral.**

ARTICLE 4

Evaluation de l'effet de la présence d'une charge et d'une bicouche lipidique sur la capacité de nanoparticules à traverser un modèle de barrière hémato-encéphalique *in vitro*.

Les études de transport réalisées sur notre modèle de BHE *in vitro*, ont permis de définir une nouvelle voie de transport spécifique de macromolécules à travers les cellules endothéliales de capillaires cérébraux. **Cette voie de transcytose ignorant totalement le compartiment lysosomal de la cellule, permet de relarguer les molécules intactes face abluminale des cellules.**

La mise au point de vecteur pouvant amener, par cette voie, des molécules dans le parenchyme cérébral est un axe de recherche en plein essor dans de nombreuses industries pharmaceutiques.

Utilisant notre modèle de BHE *in vitro*, nous avons étudié le passage de différentes nanoparticules développées par les laboratoires BiovectorTM Therapeutics (Labège, France). Ces nanoparticules sont composées d'un noyau polysaccharidique, ionisé ou non, enrobé d'une bicouche lipidique (BVSM : BioVector SupraMoléculaire)

Nos études ont permis de montrer que :

1. **Le transport des nanoparticules dépend de la charge du noyau polysaccharidique (NPS).** En effet, la présence d'une charge, positive (QAE) ou négative (P), entraîne une diminution du passage des NPS à travers la monocouche de cellules endothéliales. Le passage des NPS ionisés est de 8 à 10 fois inférieur à celui des NPS neutres (Figure 2).

2. **La présence de la bicouche lipidique permet d'augmenter le passage des vecteurs chargés à travers la BHE.** Le pourcentage de passage est 4 fois plus important pour les BVSM QAE et 3 fois pour les BVSM P par rapport à leurs NPS respectifs. Par

contre, la présence de la bicouche n'entraîne pas de modification significative du passage des BVSM neutres par rapport à leur NPS (Figure 2).

3. Les différents biovecteurs ne présentent pas de toxicité pour la monocouche de cellules endothéliales à la concentration utilisée (100µg/ml). Que les cellules soient incubées ou non en présence de NPS ou BVSM, le coefficient de perméabilité pour le saccharose ne varie pas de manière significative. Ces résultats suggèrent que les vecteurs sont transportés face abluminale de la cellule par une voie transcellulaire. Cette hypothèse est confirmée par nos observations de microscopie à fluorescence.

4. Les BVSM QAE sont transportés face abluminale de la cellule par une voie de transcytose. En effet, après 4 heures d'incubation des cellules en présence de ces vecteurs marqués à la fluoresceine, le marquage est localisé dans des vésicules uniformément réparties dans le cytoplasme de la cellule (Figure 3B). A l'inverse, lorsque les cellules sont incubées en présence des noyaux polysaccharidiques (PC QAE), le marquage montre une accumulation de ces particules dans des vésicules périnucléaires caractéristiques de la localisation des lysosomes des cellules endothéliales et par conséquent de la dégradation de ces particules (Figure 3A).

5. L'incorporation d'albumine dans ces vecteurs (BVSM QAE) permet d'améliorer jusqu'à 27 fois le transport de cette protéine à travers la BHE (Figure 4). La présence de saccharose dans le milieu d'incubation nous a permis de vérifier que cette augmentation de transport de l'albumine n'était pas due à une ouverture non spécifique de la BHE en présence des vecteurs chargés d'albumine.

6. L'addition d'hématies face luminale des cellules endothéliales entraîne une diminution du passage de tous les vecteurs à travers la BHE à l'exception de celui des NPS-P et des BVSM-N (Figure 5).

Evaluation of the effect of charge and lipid coating on the ability of 60-nm nanoparticles to cross an *in vitro* model of the blood-brain barrier.

**Fenart L.*, Dehouck B.*, Casanova A.⁺, Duhem C.*, Slupek S.[†], Cecchelli R.[†]
and Betbeder D.⁺**

*: Inserm U325, Département d'Athérosclérose, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille, France.

†: EA 2465, Université d'Artois, Faculté des Sciences Jean-Perrin, 62307 Lens, France.

⁺: Biovector Therapeutics, chemin du Chêne-Vert, BP 169, 31676 Labège cedex, France.

Running title: nanoparticle transport across an *in vitro* BBB model

Corresponding author: L. Fenart, Inserm U325, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur- Calmette, 59019 Lille cedex, France. Tel: (33) 3.20.87.73.85. Fax: (33).3.20.87.73.60. e-mail: laurence.fenart@pasteur-lille.fr

Text of 21 pages

5 figures

32 references

abstract of 112 words

introduction of 580 words

discussion of 1042 words.

Abbreviations used: BBB: Blood-brain barrier; EC: endothelial cell; L-BV: Light biovector; PC: polysaccharide core.

ABSTRACT

The ability of 60-nm nanoparticles with different physico-chemical characteristics to cross the blood-brain barrier (BBB) was evaluated on an *in vitro* BBB. Neutral, anionic and cationic nanoparticles were made from cross-linked malto-dextrins derivatized or not with ionic ligands. These particles were then coated or not with a lipid layer. We observed that lipid coating of nanoparticles could increase BBB crossing three- or four-fold compared with non-lipid coated particles. Lipid coated nanoparticles were non-toxic toward BBB integrity, and crossed the BBB by transcytosis causing no degradation. The influence of red blood cells was evaluated; a marked inhibition of the crossing was observed, probably due to strong interaction between nanoparticles and red blood cells.

INTRODUCTION

The discovery and development over the last decade of a number of neuroactive peptides and proteins as possible therapeutics for a range of neurological disorders has generated much excitement among neuroscientists. Many growth factors have already been shown to support the growth of motor neurons in laboratory cultures and so have become candidates for the treatment of various neurodegenerative diseases (Mobley et al., 1989). However, the clinical utility of these peptide or protein therapeutics in the treatment of neurological disorders is severely limited by their inability to penetrate the blood-brain barrier (BBB) efficiently after systemic administration.

The BBB is formed by the endothelial cells (EC) that make up the brain capillaries. These brain capillary EC are sealed together by complex tight junctions and possess few pinocytic vesicles (Reese et Karnovski, 1967). 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.

Administering drugs directly into the brain can physically circumvent the BBB. For peptide and protein drugs this can be done by: (i) intracerebroventricular infusion of the compound into the cerebrospinal fluid (Olson et al., 1992), (ii) transplantation into the brain of cells that produce the therapeutic compound (Kordower et al., 1994), (iii) implantation into the brain of a polymer matrix impregnated with the therapeutic compound (Krewson et al., 1995), or (iv) delivery of the gene encoding the therapeutic to neuronal cells using viral vectors (Suhr and Gage, 1993). However, all these approaches suffer from the important disadvantage of being invasive procedures requiring neurosurgical intervention.

If the drug is to be administered non-invasively via the bloodstream, one of the available pathways to the brain is between the cells, by opening tight junctions.

Paracellular passage of compounds across the BBB can be increased through the intracarotid infusion of hyperosmotic saccharide solution (Rapoport, 1988), or using RPM-7, an analog of bradykinin (Inamura et al., 1994). A potential drawback to all the methods that involve increasing the permeability of the BBB is poor specificity, allowing compounds in the circulating blood to gain access to the brain indiscriminately.

The specific endogenous transport mechanisms of the brain capillary EC offer a potential route for the development of brain-specific drug delivery systems for neuroactive compounds. Several studies have already shown that OX-26 monoclonal antibody, a receptor-mediated vector, can be successfully used to deliver therapeutic peptides such as NGF (Friden et al., 1993) and vasoactive polypeptide (VIP) (Bickel et al., 1993) into the brain through the BBB. In spite of their high specificity and affinity, a major problem with such antibodies has proved to be their failure to reach the target cells in adequate quantities.

To investigate the fundamental mechanisms of BBB transport biology, we developed an *in vitro* model of the BBB that closely mimics *in vivo* conditions by culturing brain capillary EC and astrocytes on opposite sides of a filter (Dehouck et al., 1990; 1992). Using this model, we obtained evidence that macromolecules such as low density lipoprotein, diferric transferrin and lactoferrin undergo transcytosis through the BBB via a receptor-mediated pathway (Descamps et al., 1996; Dehouck et al., 1997; Fillebeen et al., 1999).

In the work reported here, we analyse the ability of nanoparticle carriers to activate this transcytotic EC pathway. Different physico-chemical parameters were evaluated: charge of the particles (anionic, cationic, neutral), and the influence of a phospholipid coating. To mimic the *in vivo* conditions closely, different incubation media were evaluated (serum with or without red blood cells).

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and antibodies

[U-¹⁴C]-sucrose (677 mCi/mmol) was obtained from Amersham Laboratories (Les Ulis, France). 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) was purchased from NOF Corporation (Hyogo, Japan). 5-([4,6-dichlorotriazin-2-yl]amino) fluorescein (DTAF) was obtained from Sigma (Saint Louis, Mo). 1-Chloro-2,3-epoxypropan (epichlorhydrin) and glycidyltrimethylammonium chloride (hydroxycholine) were obtained from Fluka (Saint-Quentin-Fallavier, France). Phosphoryl chloride was obtained from Prolabo (Paris, France). The rabbit polyclonal antibody against occludin was from Zymed Laboratories (Inc., South San Francisco, CA). Primary antibody was detected using Bodipy-conjugated goat anti-rabbit IgG from Molecular Probes (Inc, Eugene, OR). Albumin (bovine albumin; ICN Biomedicals) was radiolabeled with reductive methylation and tritiation of albumin lysine residues using the borohydride method (Tack et al., 1980). The labeled albumin was checked by capillary electrophoresis. The labeled albumin behaved like endogenous albumin. The resulting [3H]-labeled proteins were at least 97% trichloroacetic acid precipitable.

Preparation of Light-Biovectors™

Polysaccharidic particles were prepared from US Pharmacopoeia maltodextrin (Glucidex, Roquette, Lille, France) as described previously (Betbeder et al., 1996; Prieur et al., 1996). Briefly, 100g of maltodextrin was dissolved in 2N sodium hydroxide with magnetic stirring at room temperature. Addition to the crude mixture of 1-chloro-2,3-epoxypropane (epichlorhydrin) (4.52 ml), or of a mixture of epichlorhydrin (4.72 ml) and glycidyltrimethylammonium chloride (hydroxycholine) (31.18 g), or of phosphoryl

chloride (28.46 ml) yielded neutral, cationic and anionic polysaccharidic gels respectively. The gels were then neutralized with acetic acid and finally sheared under high pressure in a Minilab homogenizer (Rannie, APV Baker, Evreux, France). The 60-nm neutral, cationic and anionic polysaccharidic nanoparticles obtained were ultrafiltered on an SGI Hi-flow system. (30UFIB/1 S.6/ 40 kD) (Setric Génie Industriel, Toulouse, France) to remove low molecular reagents and salts.

Light-Biovectors™ (L-BV) were prepared in a Minilab homogenizer by mixing polysaccharidic nanoparticles, DPPC and cholesterol at a temperature above the gel-to-liquid phase transition temperature of the phospholipid (Woodle et al., 1989). Polysaccharide and phospholipid concentrations were 1.0 mg/ml and 0.3 mg/ml, respectively. Phospholipid concentration was determined using the method of Bartlett (1959) for non-ionic and cationic L-BVs. Additionally, an enzymatic colorimetric test PL/MRP2 from Boehringer (Mannheim, Germany) was used for anionic L-BVs. Cholesterol was analyzed using an enzymatic assay. The mean diameter of Biovectors was determined by laser light scattering with the N4MD Coulter nanoparticle analyzer (Coultronics, Margency, France). Using this technique, the mean diameter obtained was $60 \text{ nm} \pm 15 \text{ nm}$ for all the particles studied (neutral, anionic and cationic).

Fluorescence labeling of Light-Biovectors™

Labeling of the polysaccharidic core with fluorescein was achieved by adding 10 mg of a DTAF water solution (2 mg/ml) to 100 mg of polysaccharidic particles at pH 10, with magnetic stirring. These labeled particles were washed and purified by ultrafiltration on an SGI Hi-flow system (30UFIB / 1S.6 / 40KD) with 1M NaCl and then with demineralized water until no fluorescein was detected in the ultrafiltrate. The fluorescein-

labeled polysaccharidic particles (1mg/ml) were stored in sterile tubes after filtration through a 0.2 µm filter.

Cell culture

Bovine brain capillary endothelial cells

Endothelial cells were isolated and characterized as described by Dehouck et al. (1990). The use of cloned EC afforded a pure EC population without contamination by pericytes. The cells were cultured in the presence of Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated calf serum and 10% (v/v) horse serum (Gibco Life Technologies), 2 mM glutamine, 50 µg/ml gentamycin and basic fibroblast growth factor (bFGF, 1 ng/ml, added every other day).

Rat astrocytes

Primary cultures of mixed astrocytes were grown from newborn rat cerebral cortex. After removing the meninges, the brain tissue was gently forced through a nylon sieve. Astrocytes were plated on six-well dishes (Nunc; Nunc A/S, Roskilde, Denmark) at a concentration of 3×10^4 cells/ml in 2 ml of DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco Life Technologies), and the medium was changed twice a week. Three weeks after seeding, the astrocyte cultures were stabilized and were free of any oligodendrocyte contamination.

Coculture of EC and astrocytes

Filters for coculture were prepared as follows: culture plate inserts (Millicell PC 3 µm, 30 mm diameter; Millipore Corp, Bedford, MA) were coated on the upper side with rat tail collagen.

The experimental procedure was as follows. Cultures of astrocytes were prepared as described above. After three weeks, coated filters were set in six-well dishes containing astrocytes, and EC were plated, with a concentration of 4×10^5 cells/ml, on the upper side of the filters in 1.5 ml of medium. The medium shared by the two cell types was that used for EC cultured alone. This medium was changed every other day. Under these conditions, EC formed 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

EC grown on porous filters were fixed and permeabilized with cold ethanol (-20°C). The samples were washed three times with Tris-buffer saline (TBS: Tris-HCl 20mM, NaCl 0.5M, pH 7) and soaked in the blocking solution (TBS containing 5% ovalbumin (wt/vol)) for 10 min at room temperature. They were then incubated for 1 h 30 min. in a moist chamber with the rabbit anti-occludin pAb in the blocking solution. After rinsing, the cells were incubated for 1h with the secondary antibody, Bodipy-conjugated goat anti rabbit IgG, in the blocking solution. Following a final rinse, the filters and their attached monolayers were mounted on glass microscope slides using Mowiol mountant (Hoechst, Frankfurt). The specimens were visualized and photographed with a Leica fluorescence microscope.

Transendothelial transport studies

On the day of the experiment, the inserts containing confluent EC monolayers and inserts only coated with collagen were washed twice with buffered Ringer solution.

One insert containing a confluent monolayer of EC was transferred to the first well of a six-well plate filled with 2.5 ml of buffered Ringer solution in each compartment. Then, 1.5 ml of buffered Ringer solution supplemented with 10% heat-inactivated calf serum (with or without 4 to 5 million red blood cells per ml) containing the different fluorescein-labelled L-BV or PC (100µg/ml), was placed at time zero in the upper compartment. The incubations were performed for 4 hours at 37°C on a rocking platform. Triplicate inserts coated with collagen seeded or not with EC were incubated for 12 days with astrocytes, and used for each compound. At the end of the experiment, amounts of fluorescein-labeled compounds in the lower compartments were measured with a Hitachi F-2000 spectrofluorimeter. For the fluorescence excitation and emission spectra of fluorescein, the wavelengths λ_{ex} et λ_{em} were 495 nm and 520 nm respectively. For each test compound, results were expressed as percentage of passage across the brain capillary EC monolayer alone, obtained from the passage across the inserts coated with collagen and seeded with EC, and the passage across the inserts coated only with collagen. At the end of the experiments, cells incubated with PC and L-BV QAE were washed five times with ice-cold buffered Ringer solution and fixed in paraformaldehyde. The filters and their attached monolayers were mounted on glass microscope slides using Mowiol mountant. The specimens were visualized and photographed with a Leica fluorescence microscope.

Using the same procedure, the integrity of the brain EC monolayers was checked by adding [^{14}C]-sucrose in the upper compartment containing the different test compounds. Amounts of radiotracers in the lower compartment were measured in a liquid scintillation counter (Wallac 14110, Pharmacia). The endothelial permeability coefficient (Pe in cm/min) was calculated as previously described (Dehouck et al., 1992).

The same experiments were performed with [^3H]albumin and biovectors loaded with [^3H]albumin. The formulations were made up by simple mixing of [^3H]albumin with pre-made L-BV with stirring. The albumin/L-BV ratio was 1/10 (w/w). The analysis of the rate of adsorption was performed using a plasmon resonance experiment (BIAcore).

RESULTS

Endothelial cell criteria

Figure 1 A depicts the typical structure of confluent brain capillary EC cocultured for 12 days with astrocytes on an insert coated with rat tail collagen. The cells form a monolayer of non-overlapping and contact-inhibited cells. The monolayer was homogenous; no contamination by pericytes was observed. Immunofluorescent staining of the tight-junction integral protein, occludin, reveals its preferential cortical membrane localization (figure 1 B). This continuous network of occludin labeling suggests that the tight junction barrier is well established. Added to numerous previous results concerning the high electrical resistance (500-800 $\Omega \cdot \text{cm}^2$), low permeability for sucrose and inulin (Dehouck et al., 1990) and particularly the correlation between drug permeabilities obtained *in vitro* with our model and *in vivo* with the Oldendorf technique (Dehouck et al., 1992) fully demonstrate that this coculture model is a legitimate model of the BBB.

Transendothelial transport studies

Light-biovectorsTM (L-BV) were prepared from 60-nm polysaccharides (PC) enveloped in a lipid bilayer (Major et al., 1997). These PC were neutral (N), cationic (QAE) or anionic (P), depending on the meshing agent and on additional groups used for the synthesis. The transport studies of the different PC (neutral and ionically charged) and their corresponding L-BV across the brain capillary EC monolayer were performed as described in Materials and Methods. To study the luminal to abluminal transport, fluorescein-labeled PC or L-BV were added to the luminal chamber of the coculture

system and the transfer of these nanoparticles across the cell monolayer was observed after 4 h incubation.

As shown in figure 2, transport of all charged PC across the BBEC monolayer was very low (3.4 ± 0.6 % for PC QAE; 2.7 ± 0.5 % for PC P) after 4 h incubation, whereas neutral PC crossed the EC monolayers more easily (9.6 ± 1.81 %). Hence a charge on PC causes a threefold decrease in their transport from the luminal to the abluminal side of the EC monolayers.

Addition of a phospholipid bilayer to the different PC had different effects on their transport across the *in vitro* BBB (figure 2). While the phospholipid bilayer caused no significant changes to the transport of the neutral PC (9.6 ± 1.81 % for PC N vs 9.9 ± 3.1 % for L-BV N), it caused a marked increase in the charged PC transport; a fourfold increase in the transport of L-BV QAE and a threefold increase in the transport of L-BV P compared with their respective PC transport.

By adding a phospholipid bilayer enveloping a charged polysaccharide core, it is therefore possible to increase its transport through the EC monolayer three- or fourfold. To determine whether this transport increase was due to transcytosis directly through the EC or to the opening of the tight junctions between the cells through a toxic effect of the L-BV on the BBEC monolayer, integrity control experiments were performed. Coincubation of these compounds with [14 C]-sucrose enabled us to check their action on the paracellular pathway during the transport experiments. Sucrose diffuses very slowly across the BBB in physiological conditions both *in vitro* and *in vivo* (Dehouck et al., 1992; Dehouck et al., 1995) and is used as an indicator of the functional integrity of tight junctions. The permeability coefficients of EC for sucrose coincubated with or without the tested compounds were not significantly different ($P_{\text{e sucrose}} = 0.42 \pm 0.03 \times 10^{-3}$

cm/min alone; Pe sucrose = $0.58 \pm 0.01 \times 10^{-3}$ cm/min with PC P; Pe sucrose = $0.45 \pm 0.06 \times 10^{-3}$ cm/min with L-BV P). The same results were obtained with the cationic and neutral PC or L-BV, demonstrating that EC monolayer integrity was maintained during the transport experiments and that the concentration used (100µg/ml for all compounds) was non-toxic for the EC.

The results of the experiments described above indicate that PC and L-BV were transported across the *in vitro* BBB directly through the cells. Figure 3 shows the staining obtained with an immunofluorescent microscope after a 4-h incubation of the cells with fluorescein-labeled PC QAE and L-BV QAE at 37°C. As shown in figure 3A, fluorescein-labeled PC QAE show a perinuclear localization characteristic of their lysosomal accumulation. This observation agrees with the low transendothelial transport values obtained for this PC QAE vector. In contrast, fluorescein-labeled L-BV QAE were found as small individual vesicles throughout the cells (figure 3B), as previously demonstrated with fluorescent-labeled low density lipoproteins (LDL) (Dehouck et al., 1997), suggesting that these L-BV QAE are transported through the endothelial cells with no degradation.

These observations were confirmed by albumin transport experiments. Albumin was adsorbed to cationic L-BV by mixing albumin to pre-made L-BV. The rate of adsorption was evaluated by a resonance plasmon experiment and was found to be over 70%. As shown in figure 4, albumin transport through the endothelial cell monolayer was very low. The Pe determined for the passage of albumin was almost 10 times less than for sucrose (0.03×10^{-3} vs. 0.43×10^{-3} cm/min, respectively). However, a 27-fold increase in albumin transport was observed when albumin had previously been loaded in the L-BV

QAE. No toxic effect was detected during the 4-h incubation experiments with albumin alone or albumin loaded on the L-BV QAE at the concentration used ($Pe_{\text{sucrose}} = 0.43 \pm 0.05 \times 10^{-3}$ cm/min alone; $Pe_{\text{sucrose}} = 0.48 \pm 0.05 \times 10^{-3}$ cm/min with albumin; $Pe = 0.45 \pm 0.06 \times 10^{-3}$ cm/min with albumin loaded on L-BV QAE). These results clearly demonstrate that this increase in albumin transport was not due to tight junction opening of the BBB.

To mimic the *in vivo* conditions more closely the luminal-abluminal transport experiments were performed in the presence of serum and red blood cells (4 to 5 million cells per ml) in the luminal compartment of our coculture model. As shown in figure 5, addition of red blood cells on the EC luminal face induced a huge decrease in all vector transports except for that of PC P and L-BV N. The transports decreased 2.4- to 8-fold depending on the vector studied.

DISCUSSION

In vitro blood-brain barrier

By growing primary endothelial cells on one side of a porous filter and astrocytes on the other, we can reconstruct the unique environment that exists *in vivo* and so induce most of the blood-brain barrier characteristics (Dehouck et al., 1992). Among these characteristics, one structural element is of major importance for studying drug transport to the brain; *in vivo*, brain capillary EC form a continuous, tight junction connected lining of the capillary wall that prevents paracellular flux of solutes. Occludin expression can be a determinant of tight junction permeability (McCarthy et al., 1996). Our immunofluorescent studies clearly demonstrate that brain capillary EC in these culture conditions express occludin continuously at cell-to-cell contacts. As described by Hirase et al. (1997), this continuous staining of occludin at the cell border indicates that these cells are highly differentiated EC of cerebral origin. These results, added to previously published results demonstrating high electrical resistance (500-800 $\Omega\cdot\text{cm}^2$) and low permeability (Dehouck et al., 1990), indicate that we have a highly differentiated blood-brain barrier model that is suited to the study of drug transport through the blood-brain barrier. Furthermore, using this *in vitro* model, we found evidence for an original endogenous transcytotic pathway in EC for the transport of different receptor-mediated proteins. This transport process seems to be a feature of capillary EC of cerebral origin as it has been already described for three different blood-borne molecules: low density lipoprotein (LDL), transferrin (Tf) and lactotransferrin (Dehouck et al., 1997; Descamps et al., 1996; Fillebeen et al., 1999). All these macromolecules follow an intracellular pathway by-passing the lysosomal compartment and thus are not degraded within the

cells to be delivered to the abluminal side of the barrier. It was thus of interest to use this endogenous pathway to deliver molecules to the brain. We sought to evaluate whether 60 nm L-BV nanoparticles could cross the BBB. We evaluated various relevant physico-chemical parameters: charge of the core, and coating or not with a lipid bilayer. We observed that by enveloping a charged polysaccharide core with a phospholipid bilayer, it was possible to increase its transport through the EC monolayer. Since no modification of the paracellular permeability was observed during the incubation of cells with L-BV, this increase was not due to a breakdown of the barrier. These results are confirmed by the immunofluorescent study demonstrating that fluorescein-labeled L-BV are distributed throughout the cytoplasm. This intracellular localization is characteristic of transcellular transport, as described for LDL and transferrin (Descamps et al., 1996; Dehouck et al., 1997). In contrast, the perinuclear localization of fluorescein PC depicts an intracellular accumulation of these nanoparticles in a degradation compartment, as already observed for acetylated LDL. These results agree with those of transendothelial transport studies, which showed that caveolae cross the BBB more easily. Taken together, these results clearly demonstrate that the intracellular pathway of PC is different depending on the presence of the phospholipid bilayer, coated PC being transcytosed through the endothelial cells.

In our previous published results, we demonstrated that this pathway was induced by the binding of a ligand to its receptor (apoB-LDL receptor; ferrotransferrin-transferrin receptor). The degradative pathway was also induced by the binding of the degraded apoB to the scavenger receptor. In contrast, the results using the L-BV indicated that the lipid bilayer could activate the transcytotic pathway by a non-specific process that does not involve their binding to a receptor. As we showed that cationic lipid coated nanoparticles were best able to cross the BBB, we loaded BSA to these particles,

expecting that BSA loading would not interfere with their membrane properties. In contrast to the EC of peripheral endothelium, EC from brain capillaries do not express albumin receptors *in vivo* or *in vitro* (Pardridge et al., 1985). Consequently, albumin transport through the EC was extremely low, consistent with the results of Smith and Borchardt (1989), as indicated by the calculated P_e (0.03×10^{-3} cm/min). By loading albumin on L-BV QAE, we were able to increase its transport 27-fold. Recent studies demonstrated that caveolae are involved in the first steps of LDL and transferrin transcytotic pathways (Fenart et al., submitted). Caveolae are small non-coated plasmalemmal vesicles that are particularly abundantly expressed in many endothelia. All recent studies afford evidence for the involvement of these vesicles in both endocytosis and transcytosis (Ghitescu et al., 1992). Moreover, endothelial caveolae have key proteins that mediate different aspects of vesicle formation, docking, and fusion, including the vSNARE, VAMP, and cellubrevin, small and large GTP-binding proteins, the calcium-dependent lipid-binding proteins annexin II and VI, and the NEM-sensitive factor NSF along with SNAP (Schnitzer et al., 1995). All these results demonstrate that caveolae are indeed genuine trafficking organelles capable of budding from the plasmalemma to form discrete carrier vesicles containing the molecular machinery necessary for regulated specific transport.

According to our previously published results (Dehouck et al., 1997; Fenart et al., submitted), which are in agreement with those of Schnitzer et al. (1994), caveolae can be divided into subpopulations depending on their cellular destination. Similar results were obtained in this study with PC and L-BV; PC are delivered to the degradative compartment while L-BV are directed to the abluminal side of the cell. Concerning these results, different signaling molecules have to be activated to induce each of these pathways. Although kinase and phosphatase have been reported to regulate caveolae

internalization (Smart et al., 1995), nothing is known about the different intracellular traffic pathway regulation. These two different vectors could be a valuable tool to discriminate between the intracellular signals leading to the transcytotic or degradative pathway.

We studied the influence of red blood cells on the ability of these nanoparticles to cross the BBB model. We observed a strong inhibition of the crossing, probably due to nanoparticle-red blood cell interactions. This *in vitro* BBB is potentially a valuable tool to analyse stealth particles. The principle of steric stabilization of colloid particles was first introduced by Napper and Natchey (Napper et al, 1971); later it was found (Illum et al, 1983) that i.v administration of nanoparticles could be improved by coating them with poloxamer. On the basis of these results we can expect to improve the ability of Biovector particles to cross the BBB in the presence of red blood cells.

REFERENCES.

- Bartlett GRJ. (1959) Phosphorus assay in column chromatography. *J. Biol. Chem.* **234**: 466-468.
- Betbeder D., Davrinche C., Davignon J.L. and Prieur E. Method for enhancing immunogenicity, product obtained and pharmaceutical composition. WO 96/06638.
- Bickel U., Yoshikawa T., Landaw EM., Faull KF. And Pardridge WM. (1993) Pharmacologic effects in vivo in brain by vector-mediated peptide drug delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 2618-2622.
- Dehouck B., Fenart L., Dehouck MP., Pierce A., Torpier G. and Cecchelli R. (1997) A new function for the LDL receptor: transcytosis of LDL across the blood-brain barrier. *J. Cell. Biol.* **138**: 877-889.
- Dehouck M.P., Dehouck B., Schluep C., Lemaire M. and Cecchelli R. (1995) Drug transport to the brain: comparison between in vitro and in vivo models of the blood-brain barrier. *Eur. J. Pharm. Sc.* **3**: 357-365.
- Dehouck MP., Jolliet-Riant P., Brée F., Fruchart JC., Cecchelli R. and Tillement JP. (1992) 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., Delorme P., Fruchart JC. and Cecchelli R. (1990) An easier, reproducible and mass-production method to study the blood-brain barrier "in vitro". *J. Neurochem.* **54**: 1798-1801.
- Descamps L., Dehouck MP., Torpier G. and Cecchelli R. (1996) Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **270**: H1149-H1158.

- Fillebeen C., Descamps L., Dehouck M.P., Fenart L., Benaïssa M., Spick G., Cecchelli R. and Pierce A. (1999) Receptor mediated transcytosis of lactoferrin through the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* in press.
- Friden PM., Walus LR., Watson P., Doctrow SR., Kozarich JW., Bäckman C., Bergman H., Hoffer B., Bloom F. and Granholm AC. (1993) Blood-brain barrier penetration and “in vivo” activity of an NGF conjugate. *Science*. **259**: 373-377.
- Ghitescu L. and Bendayan M. (1992) Transendothelial transport of serum albumin: a quantitative immunocytochemical study. *J. Cell. Biol.* **117**: 745-755.
- Hirase T., Staddon JM., Saitou M., Ando-Akatsuka Y., Itoh M., Furuse M., Fujimoto K., Tsukita S. and Rubin LL. (1997) Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell. Sci.* **110**: 1603-1613.
- Illum, L., Davies, S.S.(1983) Effect of nonionic surfactant poloxamer 338 on the fate and deposition of polystyrene microspheres following intravenous administration *J. Pharm. Sci.* **72**: 1086-90.
- Inumara T., Nomura T., Bartus RT. And Black KL. (1994) Intracarotid infusion of RMP-7, a bradykinin analog: a method for selective drug delivery to brain tumors. *J. Neurosurg.* **81**: 752-758.
- Kordower JH., Winn SR., Liu YT., Mufson EJ., Sladek JR. Jr., Hammang JP., Baetge EE. and Emerich DF. (1994) The aged monkey basal forebrain: rescue and sprouting of axotomized basal forebrain neurons after grafts of encapsulated cells secreting human nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10898-10902.
- Krewson CE., Klarman ML. And Saltzman WM. (1995) Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium. *Brain Res.* **680**: 196-206.

- Major M., Prieur E., Tocanne JF., Betbeder D. and Sautereau AM. (1997) Characterisation and phase behaviour of phospholipid bilayers adsorbed on spherical polysaccharidic nanoparticles. *Biochim. Biophys. Acta* **1327**: 32-40.
- McCarthy KM., Skare IB., Stankewich MC., Furuse M., Tsukita S., Rogers RA., Lynch RD. And Schneeberger EE. (1996) Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell. Sci.* **109**: 2287-2298.
- Mobley WC. (1989) Nerve growth factor in Alzheimer's disease: to treat or not to treat ? *Neurobiol. Aging.* **10**: 578-590
- Napper D.H., Netchey A. (1971) Studies of the steric stabilisation of colloidal particles *J. Colloid Interface Sci.* **37**: 528-35.
- Olson L., Nordberg A., von Holst H., Backman L., Ebendal T., Alafuzoff I., Hartvig P., Herlitz A. Lilja A. (1992) Nerve growth factor affects ¹¹C-nicotine binding, blood flow, EEG, and verbal episodic memory in an Alzheimer patient (case report). *J. Neural. Transm. Park Dis. Dement. Sect.* **4**: 79-95.
- Pardridge WM., Eisenberg J. and Cefalu WT. (1985) Absence of albumin receptor on brain capillaries in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol.* **249**: E264-E267.
- Prieur E., Betbeder D., Niedergang F., Major M., Alcover A., Davignon JL. and Davrinche C. (1996) Combination of human cytomegalovirus recombinant immediate-early protein (IE1) with 80nm cationic biovectors: protection from proteolysis and potentiation of presentation to CD4⁺ T-cell clones in vitro. *Vaccine* **14**: 511-520.
- Rapoport SI. (1988) Osmotic opening of the blood brain barrier. *Ann. Neurol.* **24**: 677-684.
- Reese TS. and Karnovsky MJ. (1967) Fine structure localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* **34**: 207-217.

- Schnitzer JE. (1993) Update on the cellular and molecular basis of capillary permeability. *TCM*. **3**: 124-130.
- Schnitzer JE. and Oh P. (1994) Albondin-mediated capillary permeability to albumin: differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J. Biol. Chem.* **269**: 6072-6082.
- Smart EJ., Ying YS., Mineo C and Anderson RG. (1995) A detergent free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10104-10108.
- Smith KR. and Borchardt RT. (1989) Permeability and mechanism of albumin and glycosylated albumin transcellular transport across monolayers of cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Pharmacol. Res.* **6**: 466-473.
- Suhr ST. and Gage FH. Gene therapy for neurologic disease. (1993) *Arch. Neurol.* **50**: 1252-1268.
- Tack BF., Dean J., Eilat D., Lorenz PE. and Schechter AN. (1980) Tritium labeling of proteins to high specific radioactivity by reduction methylation. *J. Biol. Chem.* **255**: 8842-8847.
- Woodle HC. and Papahadjopoulos D. (1989) Liposome preparation and size characterization. *Methods enzymol.* **171**: 193-217.

LEGENDS

Figure 1 : Confluent monolayer of bovine brain capillary EC demonstrate homogeneity in phenotype (A). Bovine brain capillary ECs grown on filters were fixed and stained for tight junction protein, occludin (B).

Figure 2 : Luminal to abluminal transport of PC, neutral and ionically charged and their corresponding L-BV. EC monolayers and filters coated with collagen were incubated with PC, neutral and ionically charged (open column) or their corresponding L-BV (hatched column) for 4h at 37°C on a rocking platform. Results were expressed as percentage of each compound passage through the EC monolayer. Each point is the mean of three different filters and the histograms are representative of three series of independent experiments.

Figure 3 : Luminal uptake of fluorescein labelled PC QAE (A) or L-BV QAE (B) by brain capillary ECs. 100µg/ml of each compound were added to the luminal side of the cells for 4h at 37°C. After washing in ice cold buffer Ringer solution, cells were fixed in paraformaldehyde. The filters and their attached monolayers were mounted and visualised with Leica fluorescence microscope. Bars = 50µm.

Figure 4: Luminal to abluminal transport of albumin loaded or not on the L-BV QAE vector. Confluent monolayers of ECs and filter coated with collagen were incubated with albumin, loaded or not on the L-BV QAE, for 4h at 37°C on a rocking platform. To obtain a concentration-independent transport parameter the clearance principle was used. Clearance for inserts covered with collagen and EC monolayers and inserts coated

with collagen were plotted versus time. The slopes of the clearance curves for the cultured inserts were PtS (where PS is permeability x surface area product), the slopes of the clearance curves for control filter were PfS. Permeability of EC monolayers (PeS) for each compound was calculated from : $1/PeS = 1/PtS - 1/PfS$. PeS values were divided by the surface area of the insert to generate the permeability coefficient of ECs (Pe). Each point is the mean of three different filters.

Figure 5 : Luminal to abluminal transport of PC, neutral or ionically charged, and their corresponding L-BV in presence of red blood cells. EC monolayers and filters coated with collagen were incubated with PC, neutral and ionically charged or their corresponding L-BV in a cell culture medium containing (hatched column) or not (open column) red blood cells for 4h at 37°C on a rocking platform. Results were expressed as percentage of each compound passage through the EC monolayer. Each point is the mean of three different filters.

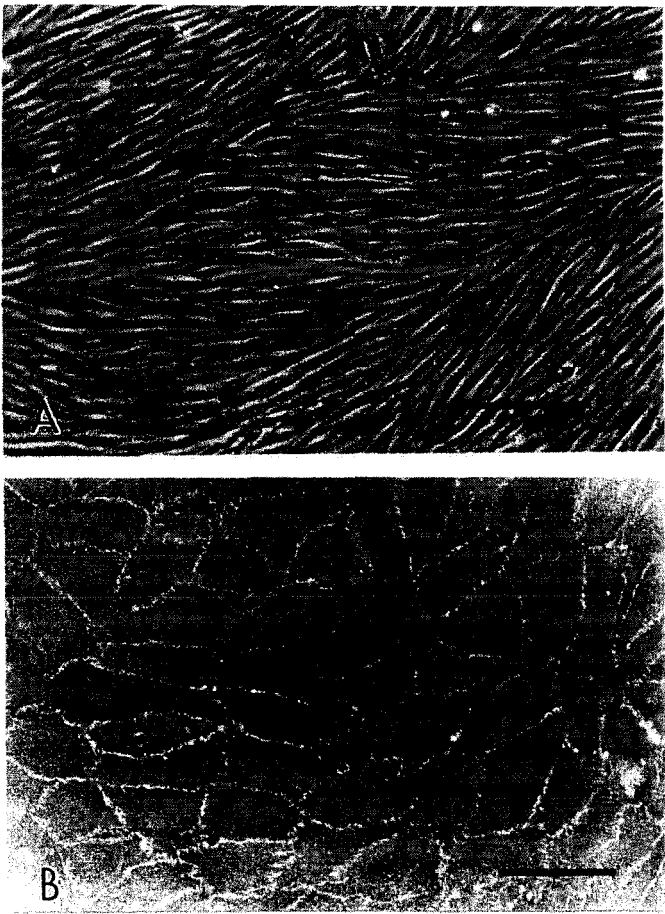


FIGURE 1

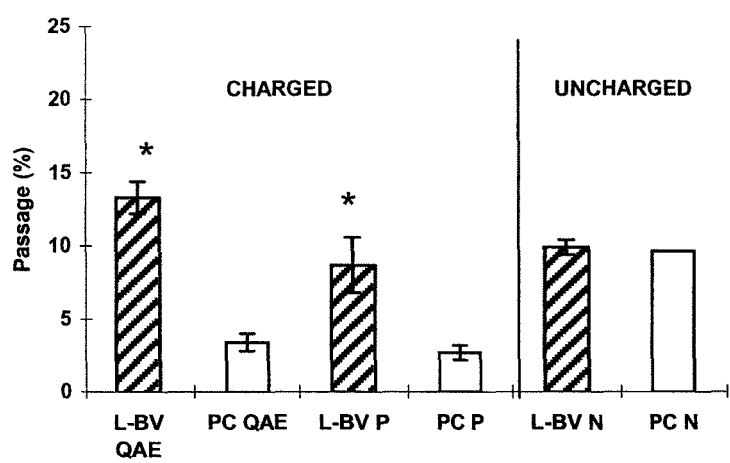


FIGURE 2

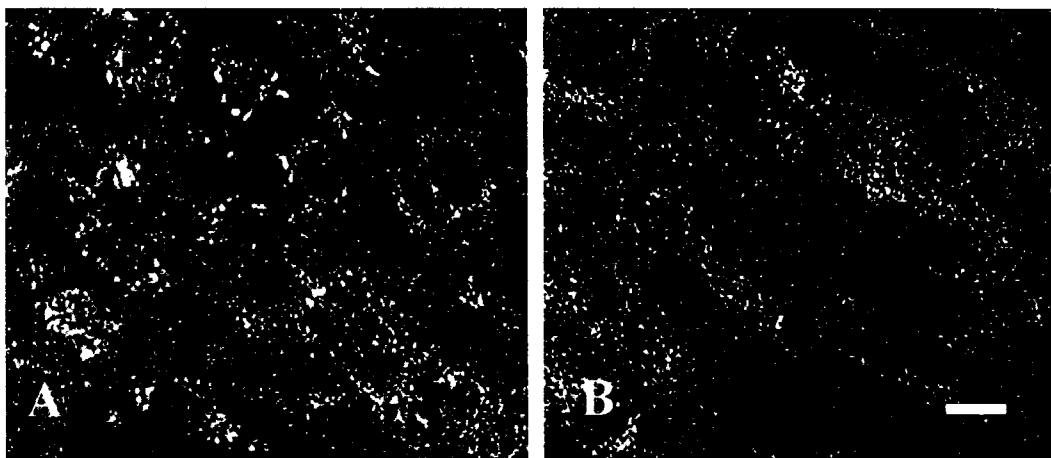


Figure 3

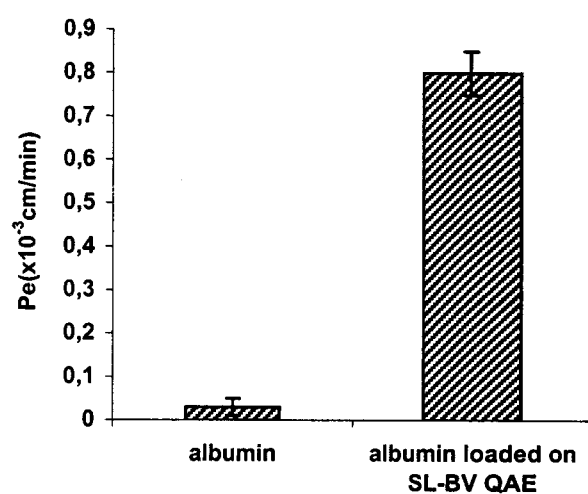


Figure 4

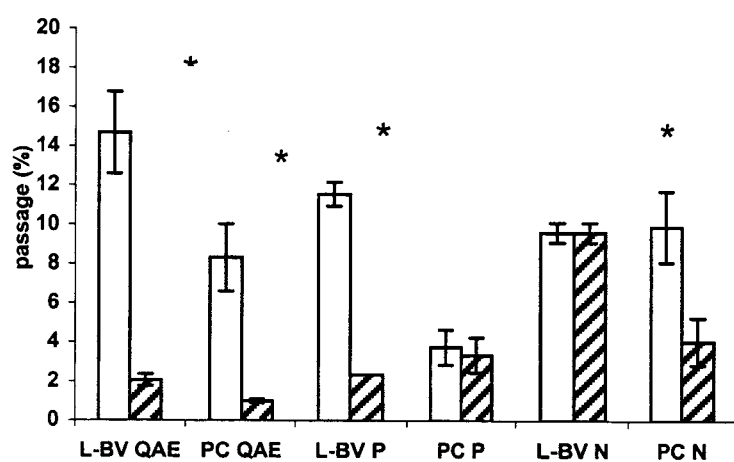


Figure 5



CONCLUSIONS DE L'ARTICLE 4

L'ensemble de nos résultats montre qu'en utilisant la voie de transcytose spécifique de l'endothélium cérébral, **il est possible d'améliorer le passage de protéines vers le cerveau en les incorporant dans des vecteurs synthétiques**. Cette voie de transcytose ne semble pas faire intervenir de récepteur spécifique mais l'endocytose pourrait être initiée par des interactions de charges (positives sur le vecteur et négatives sur la membrane).

Toutefois, pour que la vectorisation soit efficace, il faut éviter que ces vecteurs interagissent avec les protéines plasmatiques ou avec les hématies.

Même si les vecteurs utilisés dans cette étude présente l'avantage de ne pas être toxiques pour l'intégrité de la BHE, leur transport à travers la monocouche de cellules endothéliales est fortement diminué en présence d'hématies. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'améliorer la biodisponibilité de ces vecteurs dans le compartiment sanguin.

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE

Les études de physiologie cellulaire sont souvent réalisées *in vitro* car elles permettent une analyse plus fine des phénomènes observés. En effet, l'approche *in vivo* s'avère souvent délicate en raison de la complexité tissulaire qui rend l'accès direct aux cellules cibles difficile. Il faut toutefois souligner que les études sur cellules isolées peuvent s'avérer trompeuses ; les cellules en culture ayant tendance à se différencier.

Le modèle de BHE *in vitro* mis au point au laboratoire est un outil précieux puisqu'il permet d'obtenir des cellules endothéliales de capillaires cérébraux possédant des caractéristiques très proches des cellules *in vivo*. Ainsi, il a déjà permis non seulement l'étude du transport de certaines substances lipophiles (le propranolol), de substances pénétrant peu dans le cerveau (l'inuline et le saccharose), de molécules de faible poids moléculaire connues pour emprunter des transporteurs spécifiques (le glucose et la leucine) mais également des molécules à visée thérapeutique. Pour toutes ces substances, il existe une parfaite corrélation entre les perméabilités observées *in vitro* et *in vivo* (Dehouck *et al.*, 1990 : 1995).

I. MISE EN EVIDENCE D'UNE VOIE ORIGINALE DE TRANSCYTOSE DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES DE CAPILLAIRES CEREBRAUX.

Si bon nombre d'études de transport ont déjà été réalisées sur le modèle, les modalités de transport transcellulaire dépendant de récepteurs ont été peu étudiées. Méresse *et al.* (1989) ont montré qu'à l'inverse des cellules endothéliales périphériques, des cellules endothéliales des capillaires cérébraux expriment le récepteur apo (B,E) et ceci en dépit de la présence de lipoprotéines dans le milieu de culture et de la confluence des cellules. Nos études ont permis **de déterminer le rôle de ce récepteur apo(B,E) exprimé par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux.**

Dehouck *et al.* (1994) ont démontré que l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales était modulée par le statut lipidique des astrocytes. L'induction de l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules

endothéliales, par les astrocytes déprimés en cholestérol, a permis d'envisager **le rôle de ce récepteur dans le transport des lipides plasmatiques vers les cellules nerveuses.**

Nos résultats ont confirmé cette hypothèse puisque nous avons démontré que les LDL, internalisées face luminale, étaient libérées face abluminale de la cellule endothéliale **par un mécanisme de transcytose spécifique, dépendant du récepteur apo(B,E).** En effet, ce transport est inhibé par un anticorps bloquant la fixation des LDL au récepteur et nécessite de l'énergie. A l'inverse, dans les autres organes, les LDL atteignent les cellules du parenchyme après avoir traversé passivement l'endothélium vasculaire (van Hinsberg *et al.*, 1983 ; Vasile *et al.*, 1983 ; Wiklund *et al.*, 1985 ; Hashida *et al.*, 1986 ; Snelting-Havinga *et al.*, 1989). Ce transport ne fait pas intervenir de récepteur. Pour certains auteurs, ce transport n'est pas saturable (Smith *et al.*, 1983) alors que pour d'autres il l'est, mais l'interaction entre les LDL et l'endothélium serait de faible affinité (Hashida *et al.*, 1986).

Ainsi, le transport des LDL au niveau d'endothelia périphériques n'est pas régulé, provoquant l'accumulation locale des lipides dans les parois vasculaires, pouvant être à l'origine de la formation des plaques athéromateuses (Hoff *et al.*, 1978 ; Smith et Ashall, 1983). A l'inverse, **au niveau de la BHE, le transport des LDL est régulé par le statut lipidique des astrocytes.** En effet, lorsque les astrocytes sont déprimés en cholestérol, ils induisent non seulement une augmentation de l'expression du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales, **mais aussi une augmentation du transport des LDL à travers l'endothélium cérébral.** Nos résultats sont en accord avec les observations faites *in vivo* par Salem *et al.* (1987). Ces auteurs ont observé des taux élevés de cholestanol dans le parenchyme cérébral de patients atteints d'une maladie rare affectant la synthèse du cholestérol. Cette accumulation cérébrale de cholestanol est due à un dysfonctionnement de la synthèse des acides biliaires (Salem et Grungy, 1973). En conséquence, ce dépôt anormalement élevé de stérol dans le cerveau est du à un passage de lipoprotéines plasmatiques contenant du cholestanol à travers la BHE. Ces résultats sont confirmés puisque chez ces patients, on trouve également des taux anormalement élevés d'apolipoprotéine B dans le LCR, suggérant que le transport des lipoprotéines à travers la BHE est activé lors de cette pathologie. Le traitement de ces patients avec l'acide chénodéoxycholique, qui n'agit qu'au niveau du foie, conduit à la fois à une diminution des taux de cholestanol et

d'apolipoprotéine B cérébraux. Nos résultats, démontrant le transport des LDL à travers la BHE et son « uprégulation » par le statut lipidique des astrocytes, sont donc en parfaite corrélation avec les observations faites *in vivo* dans cette pathologie.

Nos résultats démontrent également que **les LDL internalisées sont retrouvées intactes face abluminale de la cellule endothéliale** : le compartiment lysosomal n'est donc pas impliqué dans leur transport à travers la BHE. Des résultats similaires ont été obtenus pour la transferrine qui, après fixation à son récepteur, est transportée face abluminale des cellules endothéliales sans dégradation (Descamps *et al.*, 1996). Il est toutefois important de noter que les LDL acétylées qui se fixent à un récepteur de type « scavenger », sont dégradées par les cellules endothéliales. Ces résultats démontrent que ce phénomène n'est pas lié à un dysfonctionnement du compartiment lysosomal dans les cellules en culture.

Nos résultats démontrent en outre l'existence **d'un « switch » dans le rôle du récepteur apo(B,E)** exprimés dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux : de la voie classique de dégradation, on passe, lors de l'établissement de la BHE, à une voie de transcytose dans les cellules différenciées. Les travaux de Matter *et al.* (1993) ont montré que dans les cellules épithéliales, un tel « switch » pouvait être observé après mutation d'un résidu tyrosine dans la séquence cytoplasmique contenant les signaux d'internalisation du récepteur apo(B,E). La modification, par un mécanisme d'édition, d'un ou plusieurs acides aminés dans cette même séquence de la partie cytoplasmique du récepteur apo(B,E) des cellules endothéliales a été envisagée pour expliquer le changement de fonction du récepteur dans les cellules différenciées. Toutefois, nos résultats n'ont pas permis de confirmer notre hypothèse puisque dans les cellules en croissance comme dans les cellules différenciées, les séquences des ARN messagers codant pour ce domaine se sont avérées identiques. Mais ces résultats n'excluent pas la présence d'autres types de modifications et notamment des modifications post-traductionnelles, déjà décrites pour le récepteur des immunoglobulines polymériques dans les cellules épithéliales. En effet, la phosphorylation d'une sérine en position 664 de la partie cytoplasmique de ce récepteur entraînant sa transcytose à travers la cellule (Casanova *et al.*, 1990 ; Aroeti et Mostov, 1994). La présence d'une telle modification au niveau de la queue cytoplasmique du

récepteur apo(B, E) des cellules endothéliales de capillaires cérébraux reste à déterminer.

Ainsi, les cellules endothéliales de capillaires cérébraux différenciées présentent des mécanismes de transports spécifiques, récepteur-dépendants, n'impliquant pas le compartiment lysosomal et permettant d'amener des macromolécules plasmatiques, comme les LDL ou la transferrine, vers le parenchyme cérébral.

L'existence de transports récepteur-dépendants, qui court-circuitent le compartiment lysosomal, semble être l'une des caractéristiques de nombreux endothélia. En effet, les cellules endothéliales et notamment celles des capillaires de type continu, sont reliées entre elles par des jonctions serrées qui constituent une barrière à la diffusion passive des molécules. L'expression de récepteurs spécifiques présents à la surface des cellules joue un rôle primordial dans le transport des molécules plasmatiques vers les tissus. Ainsi, l'albumine native (Schnitzer et Oh, 1994), l'insuline (King et Jhonson, 1985a), les facteurs de croissance « insuline-like » (King *et al.*, 1985b), la céruplasmine (Tavassoli *et al.*, 1986) les LDL (Nistor et Simionescu, 1986) et la transferrine (Soda et Tavassoli, 1984 ; Tavassoli *et al.*, 1986), sont transportés au niveau de différents endothélia par des mécanismes faisant intervenir des récepteurs spécifiques.

Au niveau des organes périphériques, les cavéoles semblent être les structures vésiculaires impliquées dans les transports transendothéliaux (Schnitzer *et al.*, 1994).

Au niveau cérébral, quelques travaux montrent que le transport, du sang vers le SNC, de l'insuline (Frank *et al.*, 1985 ; Fukata *et al.*, 1994), des facteurs de croissance « insuline-like » (Frank *et al.*, 1985) et de la transferrine (Descamps *et al.*, 1996) s'effectue par des mécanismes récepteur-dépendants. Les étapes précises du trafic intracellulaire de ces macromolécules du sang vers le cerveau commencent à être élucidées (Villegas and Broadwell, 1993 ; Broadwell *et al.*, 1994) et laissent supposer que les cavéoles soient impliquées dans le transport de ces molécules à travers l'endothélium cérébral (Ghitescu *et al.*, 1986, Milici *et al.*, 1987).

Nos études ont permis de confirmer l'intervention de ces structures dans le transport des LDL et de la transferrine à travers la BHE. En effet, des études préliminaires de microscopie à fluorescence laissaient supposer l'intervention des cavéoles dans le trafic intracellulaire des macromolécules vers le cerveau. La filipine, antibiotique capable de fixer le cholestérol membranaire et de déstructurer les cavéoles, inhibe l'internalisation des LDL par les cellules endothéliales. La réversibilité de ces phénomènes montre que la filipine ne présente pas de toxicité pour les cellules endothéliales dans les conditions expérimentales utilisées. Des résultats similaires ont été obtenus par Descamps *et al.* (1996), démontrant ainsi que les cavéoles sont également impliquées dans l'endocytose de la transferrine par les cellules endothéliales de la BHE.

Enfin, utilisant des techniques de fractionnement cellulaire, de microscopie (photonique et électronique) nous avons pu confirmer ces observations et caractériser les compartiments impliqués dans les premières étapes de la transcytose des LDL et de la transferrine à travers la BHE.

Par Western Blot, nous avons localisé le récepteur apo (B,E) dans une fraction cellulaire enrichie en cavéoline, qui correspond aux cavéoles. Cette même fraction, isolée à partir de vaisseaux périphériques, contient différents types de récepteurs aux LDL modifiées (le récepteur scavenger, CD 36 et RAGE) mais ne contient de récepteur apo(B,E) (Lisanti *et al.*, 1994). L'ensemble de ces résultats, apparemment contradictoires, peut s'expliquer par la disparition du récepteur apo(B,E) à la surface des cellules endothéliales périphériques lorsqu'elles ont atteint la confluence. De plus, constitutivement exprimé par les cellules endothéliales de capillaires cérébraux, la détection du récepteur a toutefois nécessité la surexpression préalable du récepteur face luminale des cellules après incubation de celles-ci en présence d'astrocytes carencés en cholestérol. **L'augmentation du nombre de récepteurs au sein des cavéoles laisse supposer que ces structures soient la voie d'entrée majeure des LDL dans la cellule endothéliale.**

Nos observations de microscopie électronique montrent que lorsque les cellules endothéliales sont incubées en présence de LDL, les lipoprotéines se fixent au niveau des cavéoles et ne sont jamais détectées dans des puits recouverts de clathrine. Après internalisation, les LDL mais aussi la transferrine sont détectées dans des structures de

type « multivésiculaire », les *cavéosomes*. Ces compartiments endosomaux, formés de l'accumulation de cavéoles, expriment le marqueur Lamp1 et sont faiblement acides. A l'inverse, lorsque les cellules endothéliales sont incubées en présence de LDL acétylées, les LDL modifiées vont s'accumuler dans des compartiments qui présentent toujours le marqueur Lamp1 mais sont beaucoup plus acides. Ces résultats sont en accord avec nos études de dégradation des lipoprotéines : démontrant que les LDL acétylées sont dégradées par les cellules endothéliales ; ce qui justifie leur accumulation dans des compartiments fortement acides, alors que les LDL natives ne le sont pas ; et s'accumulent dans des compartiments de plus faible acidité pour ensuite être relarguées intactes face abluminale de la cellule. Ces résultats sont en accord avec ceux de Schnitzer *et al.* (1993) suggérant l'existence de deux populations de cavéoles dans les cellules endothéliales pulmonaires. Certaines cavéoles seraient impliquées dans la transcytose de l'albumine native à travers les cellules endothéliales, alors que d'autres cavéoles permettraient le transfert de l'albumine modifiée vers des compartiments de dégradation. Toutefois, ces auteurs n'excluent pas l'existence d'une seule population de cavéoles dont l'internalisation et le trafic intracellulaire serait régulés différemment en fonction de la liaison ligand-récepteur.

Ainsi, dans les cellules endothéliales de capillaires cérébraux différenciées, nous avons mis en évidence une voie endogène du trafic intracellulaire qui court-circuite la voie de dégradation par les lysosomes. Ces résultats ont permis d'envisager l'utilisation de cette voie originale de transcytose pour vectoriser des médicaments vers le cerveau.

II. UTILISATION DE LA TRANSCYTOSE COMME NOUVELLE STRATEGIE DE VECTORISATION DE MEDICAMENTS VERS LE CERVEAU.

Les propriétés structurales et métaboliques caractéristiques de l'endothélium cérébral vont restreindre les échanges non spécifiques entre le sang et le parenchyme cérébral et posent un problème majeur pour le traitement des maladies du système nerveux central. De nombreuses stratégies se sont développées dans le but d'améliorer l'apport de médicaments au cerveau.

Certaines stratégies, cherchant à contourner la BHE, sont invasives et nécessitent une intervention chirurgicale. Le composé actif est soit injecté directement dans les ventricules cérébraux ou fixé sur un implant placé directement dans le parenchyme cérébral (Olson *et al.*, 1992 ; Krewson *et al.*, 1995). Ces techniques en plus d'être onéreuses sont surtout peu efficaces. En effet, injecté dans le ventricule, le médicament est rapidement éliminé dans la circulation générale. Implanté dans le cerveau, sa diffusion dans le parenchyme cérébral est très limitée (1-2 mm autour de l'implant) (Pardridge, 1997).

Sachant que les capillaires cérébraux mis bout à bout représente une longueur de 650km, soit une surface de 20m² (Pardridge 1991), que l'espace maximum entre 2 capillaires n'est que de 40µm (distance parcourue en 1 seconde par un médicament), il semblait alors plus judicieux d'utiliser **la BHE comme voie d'entrée des médicaments vers le cerveau** ; celle ci assurant une large diffusion du composé au sein du parenchyme cérébral. En conséquence, de nouvelles stratégies se sont développées, cherchant à améliorer le transfert des médicaments à travers la BHE.

Les médicaments ont tout d'abord étaient modifiés chimiquement de façon à augmenter leur lipophilie, on parle de « **lipidisation** ». Deux approches peuvent être utilisées pour modifier les propriétés physico-chimiques d'une molécule : la synthèse **de prodrogues ou d'analogues**.

Le principe des **prodrogues** consiste à lier de façon covalente un « groupement transporteur » à une molécule active. La molécule active peut ainsi être libérée préférentiellement dans l'organe cible par clivage grâce à une enzyme ou une substance chimique. La technique la plus classique consiste à limiter les liaisons hydrogènes avec l'eau en substituant les fonctions polaires des molécules. L'exemple le plus marquant est celui de la morphine. L'ajout d'un groupement méthyl sur la morphine forme la codéine qui perd 2 liaisons hydrogènes et permet d'augmenter son passage à travers la BHE d'un facteur 10. Une double acylation de la morphine conduit à la formation d'héroïne qui traverse 100 fois mieux la BHE que la morphine. Après leur passage dans le cerveau, la codéine et l'héroïne sont hydrolysées et ainsi retransformées en morphine qui ressort difficilement du cerveau (Pardridge, 1995).

Cependant, l'utilisation de prodrogues n'est pas toujours simple car généralement les enzymes qui permettent le clivage sont non spécifiques et ubiquitaires, et la plupart des composés transportés dans le sang sont clivés dans le foie avant d'atteindre le cerveau.

La synthèse des **analogues** consiste à remplacer dans une molécule active un groupement non essentiel pour l'activité de façon à la rendre plus lipophile et lui permettre de franchir plus facilement la BHE. Une série d'aziridinyl quinone (pharmacophore commun à un grand nombre d'anticancéreux comme l'adriamycine et la daunorubicine) ont été testée contre des tumeurs cérébrales ou intrapéritonéales chez la souris. Les substances les plus polaires ont été les plus efficaces dans le traitement des tumeurs intrapéritonéales alors que les composés les plus lipophiles ont été plus efficaces dans les tumeurs cérébrales. Toutefois, cette règle n'est pas absolue car en utilisant les nitrosourées (autres agents anticancéreux comme le BCNU ou CCNU) l'efficacité du traitement des tumeurs cérébrales décroît avec la lipophilie. Il semblerait que plus la lipophilie augmente, plus la molécule risque de se lier aux protéines plasmatiques et de perdre ainsi son efficacité.

De plus, la lipidisation est limitée également par son manque de spécificité. En effet, cette approche va permettre également d'augmenter le passage des médicaments dans tous les tissus périphériques.

Des études réalisées au laboratoire concernant le transport de séries d'analogues ou de prodrogues, n'ont pas permis d'établir de corrélation entre les paramètres de lipophilie des molécules et leur transport à travers la BHE.

De plus, des molécules lipophiles comme la vincristine, la doxorubicine et la cyclosporine n'atteignent pas le parenchyme cérébral. Nos résultats sont en accord avec ceux, obtenus *in vivo*, par Cefalu et Pardridge (1985). Ces molécules sont prises en charge par la P-glycoprotéine, agissant comme une pompe d'efflux actif expulsant les molécules hors du cytoplasme de la cellule endothéliale. **Ainsi, l'amélioration du passage de médicaments à travers la BHE par inhibition de la P-gp fait l'objet de nombreuses recherches dans les industries pharmaceutiques.** Nos résultats montrent qu'il est possible d'augmenter le transport d'anticancéreux vers le cerveau en inhibant spécifiquement la P-gp (ex : vincristine). Toutefois, il est indispensable de tester chaque combinaison anticancéreux-inhibiteur, certaines d'entre elles pouvant entraîner une rupture de la BHE (ex : Doxorubicine+S9788).

Le meilleur modulateur serait, comme nous l'avons vu dans les généralités, celui dont on pourrait obtenir un taux sérique supérieur à celui nécessaire, *in vitro*, pour inhiber complètement le P-gp, diffusant bien dans le tissu tumoral et dénué de toxicité. La toxicité des différents agents modulateurs est effectivement le facteur limitant pour leur utilisation en clinique. Les premiers modulateurs utilisés, le vérapamil et la cyclosporine aux taux plasmatiques requis pour obtenir une activité maximale *in vitro*, provoquent *in vivo* un bon nombre d'effets secondaires. C'est pourquoi, plus récemment de nouvelles molécules ont été spécialement développées sur la base de relation structure-activité. Ces composés comme le PSC 833 ou le S9788 se révèlent, *in vitro*, beaucoup plus efficaces que les composés de première génération sans présenter d'effets secondaires notables *in vivo* (Twentyman et Bleehen, 1991). Toutefois, des études réalisées chez la souris montrent qu'à dose maximale tolérée, le PSC833 est incapable d'inhiber complètement la P-gp (Mayer *et al.*, 1997). Cette perte d'efficacité semble être la conséquence de sa liaison aux protéines plasmatiques. De récentes expériences réalisées *in vitro* ont confirmé cette hypothèse (Schinkel *et al.*, 1995b ; 1996). Ce problème de biodisponibilité, *in vivo*, est rencontré pour de nombreux modulateurs (Lehnert *et al.*, 1996). C'est pourquoi de nouvelles stratégies se développent afin de moduler, plus efficacement et/ou plus spécifiquement l'activité de la P-gp en utilisant par exemple des anticorps monoclonaux (Hamada et Tsuoro, 1986 ; Arceci *et al.*, 1993 ; Mechetner et Robinson, 1992) ou des oligonucléotides de synthèse (Taminaga *et al.*, 1995)

Le manque de spécificité et de biodisponibilité des médicaments ont conduit au développement **de nouvelles stratégies utilisant les propriétés physiologiques spécifiques de la BHE**. Ces stratégies intéressent particulièrement les **protéines ou les peptides** qui pourraient être des thérapeutiques efficaces dans le traitement des maladies neurodégénératives et sur lesquels la stratégie de lipidisation est impossible.

Parmi les transports spécifiques de la BHE, **le transport dépendant de récepteur** a été le plus largement utilisé. Les médicaments sont couplés à divers molécules endogènes telles que l'insuline, la transferrine ou les IGFs (insulin-like growth factors) qui se fixent sur un récepteur exprimé face luminale des cellules endothéliales. Toutefois cette technique engendre bon nombre d'effets secondaires. En effet, l'association du médicament à l'insuline provoque des hypoglycémies.

L'association du médicament à la transferrine ne permet pas, *in vivo*, au médicament de traverser la BHE en quantité suffisante, ceci étant dû à la présence d'une forte concentration de transferrine endogène dans la circulation (Skarlatos *et al.*, 1995). Enfin, associé aux IGFs, le complexe se lie aux protéines plasmatiques (Philips, 1986).

Une technique alternative a été mise au point pour pallier ces problèmes. Le médicament a alors été fixé, plus ou moins directement, sur des anticorps monoclonaux capables de se fixer au récepteur. Friden *et al.* (1991) sont les premiers à montrer que l'anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur de la transferrine de rat (OX-26) est retrouvé au sein du parenchyme cérébral après injection par voie intraveineuse. Cet anticorps atteint le parenchyme cérébral de façon sélective comparé à d'autres organes tels que les reins, les poumons ou le cœur. En effet, l'affinité pour le foie et le cerveau semble plus grande que pour les autres organes. Ainsi, après saturation des sites du foie, un passage sélectif vers le cerveau peut être envisagé. La pénétration cérébrale de méthotrexate est augmentée lorsqu'il est lié de façon covalente à l'OX-26 (Friden *et al.*, 1991). De même, le facteur de croissance neuronal (NGF : nerve growth factor), qui ne diffuse pas à travers la BHE, associé à l'OX-26 pénètre dans le parenchyme cérébral (Friden *et al.*, 1993). Le NGF est alors encore capable de favoriser la survie des neurones cholinergiques ce qui prouve qu'il a conservé son activité biologique. Le problème majeur lié à ce système est la forte dégradation et l'élimination du NGF par le foie. Sakane et Pardridge (1997) proposent d'attacher entre le NGF et l'anticorps une molécule de PEG (polyéthylène glycol) afin de limiter son élimination. Toutefois, il semblerait que la conjugaison des groupements amines libres pourrait provoquer une perte d'activité des neurotrophines.

D'autre part, l'utilisation de l'anticorps OX-26 est spécifique du rat et ne peut être utilisée chez l'homme. Ainsi, d'autres anticorps monoclonaux ont été synthétisés pour vectoriser des médicaments chez l'homme et certains d'entre eux, tel que l'anticorps dirigé contre le récepteur humain à l'insuline, sont actifs chez le primate (Walus *et al.*, 1996 ; Pardridge *et al.*, 1995). Cependant le problème majeur de cette stratégie de vectorisation reste la quantité limitée de molécules pouvant être associées à l'anticorps (2 à 3 molécules par complexe). Huwyler *et al.* (1996) suggèrent d'augmenter la capacité de transport de ces vecteurs en leur associant des liposomes, dans lesquels il serait possible de séquestrer au moins 10000 petites molécules pour un

liposome de 100 nm de diamètre, et de créer ainsi de nouveaux vecteurs qu'il nomme immunoliposomes.

Toutefois, l'utilisation de liposomes comme vecteurs à destinée cérébrale a toujours été un échec ; les liposomes étant rapidement éliminés de la circulation sanguine par le système réticulo-endothélial. L'insertion de lipides associés au PEG dans la bicouche lipidique des liposomes augmenterait considérablement la demi-vie des liposomes dans le sang, car en couvrant la surface des liposomes, le PEG empêcherait leur fixation aux protéines plasmatiques et leur reconnaissance par les macrophages. Ces liposomes liés à des anticorps monoclonaux permettraient le passage d'un nombre suffisant de molécules pour obtenir une activité pharmacologique. Les premiers résultats obtenus par l'équipe de Pardridge, montrent que la daunomycine marquée, incorporée dans des liposomes conjugués au PEG et liés à l'OX-26, injectée par voie intraveineuse chez le rat traverse la BHE de manière spécifique et en quantité plus importante que la daunomycine seule ou associée à des liposomes conjugués ou non au PEG. Reste aujourd'hui à déterminer si la daunomycine est toujours active associée aux liposomes ou s'il est possible de la libérer dans le cerveau.

Plus récemment, d'autres vecteurs ont été mis au point. Des nanoparticules de polyisocynoacrylate (PIBCA) recouverte de Tween 80 (PICBA-80) ont été utilisées pour vectoriser vers le cerveau, un peptide à action analgésique centrale, la dalargine (β -endorphine) qui administrée par voie intraveineuse ne franchit pas la BHE. (Kreuter *et al.*, 1995 ; 1997; Alyautdin *et al.* 1997). Un effet analgésique, mesuré chez la souris à l'aide du test « tail flick », suite à des injections de PIBCA-80 chargées en dalargine a été observé. Toutefois plusieurs souris sont mortes au cours du test. De plus, une forte diminution de l'activité spontanée pouvant atteindre 90% ont été observée après injection de PICBA-80 chargées ou non en dalargine (Olivier *et al.*, 1997). Des résultats récents ont permis de montrer que l'effet analgésique obtenu avec les nanoparticules chargées en dalargine était la conséquence d'une perte d'intégrité de la BHE, indépendante du principe actif, mais due aux nanoparticules elles-mêmes (Olivier *et al.*, soumis). Dans notre étude (article 4), le transport du saccharose associé, comme marqueur de l'intégrité des monocouches de cellules endothéliales, aux biovecteurs synthétiques est identique au transport du saccharose utilisé seul. **Ces résultats nous ont permis de vérifier que ces biovecteurs ne sont pas toxiques pour la monocouche**

de cellules endothéliales, démontrant ainsi que l'augmentation du transport associé aux vecteurs n'est pas due à une rupture de la BHE. Ainsi, en utilisant les biovecteurs (BVSM QAE) il est possible d'augmenter le transport de l'albumine d'un facteur 27. Cette augmentation est beaucoup plus importante que celle obtenue après fixation de l'albumine sur l'anticorps OX-26 puisque ce vecteur n'aura permis d'augmenter le transport de l'albumine que d'un facteur 4 (Pardridge *et al.*, 1991).

En plus de ne présenter aucune toxicité sur la BHE et d'être utilisable chez l'homme (contrairement à l'OX-26), les biovecteurs peuvent fixer à la fois des molécules lipophiles au sein de la bicouche lipidique mais aussi des molécules hydrophiles au sein de leur noyau polysaccharidique. Il faut toutefois signaler que la fixation de molécules dans le noyau polysaccharidique va dépendre des interactions de charges entre le noyau et la molécule.

Le mécanisme d'endocytose des biovecteurs (BVSM QAE) ne semble pas faire intervenir de récepteur spécifique mais être initié par la liaison des particules cationisées aux charges négatives de la membrane plasmiques. Des résultats similaires ont déjà été observés par Pardridge *et al.* (1990) qui utilisaient de l'albumine cationisée associée à la β -endorphine (Kumagai *et al.*, 1987) pour vectoriser ce peptide vers le cerveau. Alors que la β -endorphine administrée, même à forte concentration par voie sanguine, n'a aucun effet sur le système nerveux central, associée à l'albumine cationisée, elle atteint le parenchyme cérébral au même taux que l'albumine cationisée seule. D'autres études réalisées sur notre modèle *in vitro* de BHE montrent que la présence d'une charge positive sur un fragment Fab'2 de l'anticorps anti-tétanique permet sa transcytose à travers la BHE par un processus non spécifique, ne faisant pas intervenir de récepteur (Girod *et al.*, soumis).

Ainsi, il est possible, en utilisant des biovecteurs synthétiques, de vectoriser par la voie endogène de transcytose des peptides ou protéines vers le parenchyme cérébral.

III. PERSPECTIVES

- Le séquençage des ARN messagers codant pour le domaine cytoplasmique intervenant dans l'internalisation du récepteur apo(B,E) des cellules endothéliales n'a pas permis d'expliquer le « switch » observé dans la fonction du récepteur apo(B,E) exprimé dans les cellules différenciées. Toutefois, nos résultats n'excluent pas la présence de modifications post-traductionnelles de la queue cytoplasmique du récepteur, modifications déjà mises en évidence sur le récepteur des immunoglobulines polymériques de cellules épithéliales. Des études complémentaires seraient donc nécessaires pour déterminer si ce type de modification existe au niveau du récepteur apo(B,E) des cellules endothéliales et pourrait alors être à l'origine du changement de fonction observé dans les cellules endothéliales différenciées.

- Les études préliminaires concernant la caractérisation des vésicules impliquées dans le trafic intracellulaire des LDL et de la transferrine devront être poursuivies afin de déterminer si ces vésicules sont d'un type nouveau, ou peuvent aussi s'apparenter aux vésicules MIIC (vésicules contenant l'antigène CMH de classe II) qui expriment le marqueur Lamp1 (Ojcius *et al.* 1997) et sont également composées de petites vésicules de 50-60nm de diamètre entourées d'une membrane plasmique (Riberdy *et al.*, 1994).

- De plus, en utilisant les LDL acétylées et les LDL natives, nous avons mis en évidence deux types de vésicules, les unes amenant le ligand vers des compartiments de dégradation, les autres vers la face abluminale des cellules. Les mêmes observations ont pu être faites en utilisant les biovecteurs (PC QAE et BVSM QAE) ; le transport n'étant cette fois pas dépendant d'un récepteur spécifique. Des études complémentaires seront nécessaires afin de déterminer s'il s'agit de deux populations différentes de cavéoles ou d'une seule population dont l'internalisation et le devenir dans la cellule seraient initiés par la fixation du ligand sur son récepteur ou sur la membrane. **Ces molécules seront alors des outils précieux permettant d'étudier les différentes voies de signalisation et les signaux de transduction impliqués dans la régulation de leur trafic intracellulaire.**

- Enfin, sachant que les LDL sont libérées intactes face abluminale des cellules endothéliales, il serait intéressant d'étudier le devenir de ces lipoprotéines et plus particulièrement des lipides dans le parenchyme cérébral. Les astrocytes, capables de fixer et de dégrader les lipoprotéines semblent jouer un rôle dans la distribution des lipides aux cellules nerveuses (Pitas *et al.*, 1987). Des études réalisées en collaboration ont permis de montrer sur les astrocytes étaient capables de sécréter des lipoprotéines contenant de l'apoE. Comme les neurones possèdent des récepteurs à l'apoE (Moestrup *et al.*, 1992 ; Rebeck *et al.*, 1993 ; Christie *et al.*, 1996), **il serait intéressant de rechercher si les lipoprotéines riches en apoE, sécrétées par les astrocytes sont impliquées dans la redistribution des lipides incorporés dans les LDL plasmatiques vers les neurones.** La mise au point d'une triculture (cellules endothéliales, astrocytes et neurones) pourrait probablement permettre une telle étude.

Ainsi, l'ensemble de nos résultats montre que recherche fondamentale et recherche appliquée sont difficilement dissociables ; le développement de nouvelles stratégies de vectorisation des médicaments à travers la BHE nécessitant une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires des cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Les modèles *in vitro* d'études de la BHE peuvent contribuer à l'acquisition de ces nouvelles connaissances.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abbott N.J. and P. Revest.** Control of brain endothelium permeability. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*. 3 : 39-72, 1991.
2. **Abe T., K. Abe, W. D. Rausch, I. Klatzo and M. Spatz.** Characteristics of some monoamine uptake systems in isolated cerebral capillaries. *Adv. Exp. Med. Biol.* 131 : 45-55, 1980.
3. **Abumrad N.A., J.H. Park and C.R. Park.** Permeation of long-chain fatty acid into adipocytes. Kinetics, specificity, and evidence for involvement of a membrane protein. *J. Biol. Chem.* 259 : 8945-8953, 1984.
4. **Achen M.G., M. Clauss, H. Schnürch and W. Risau.** The non-receptor tyrosine kinase lyn is localised in developing murine blood-brain barrier. *Differentiation*. 59 : 15-24, 1995.
5. **Ahmed S.N., D.A. Brown and E. London.** On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes : physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* 36 : 10944-10953, 1997.
6. **Aldred A. R., P. W. Dickson, P. D. Marley and G. Schreiber.** Distribution of transferrin synthesis in brain and other tissues in the rat. *J. Biol. Chem.* 262(11) : 5293-5297, 1987.
7. **Alyautdin R.N., V.E. Petrov, K. Langer, A. Bertold, D.A. Kharkevitch and J. Kreuter.** Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.* 14 : 325-328, 1997.
8. **Ammon H.V., R.E. Loeffler and L.A. Luedtke.** Effects of lysophosphatidylcholine on jejunal water and solute transport in the rat in vivo. *Lipids* 18 : 428-433, 1983.
9. **Anderson G.J. and W.E. Connor.** Uptake of fatty acids by the developing rat brain. *Lipids* 23 : 286-290, 1988.
10. **Anderson G.J., P.S. Tso and W.E. Connor.** Incorporation of chylomicron fatty acids into developing rat brain. *J. Clin. Invest.* 93 : 2764-2767, 1994.
11. **Anderson H.A., Y.Z. Chen and L.C. Norkin.** Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Mol. Biol. Cell.* 7 : 1825-1834, 1996.
12. **Anderson J.M.** Cell signaling : MAGUK magic. *Curr. Biol.* 6 : 382-384, 1996.
13. **Anderson J. M., B. R. Stevenson, L. A. Jesaitis, D. A. Goodenough and M. S. Mooseker.** Characterization of ZO-1, a protein component of the tight junction from mouse liver and Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 106 : 1141-1149, 1988.
14. **Anderson J. M., M. S. Balda and A. S. Fanning.** The structure and regulation of tight junctions. *Cell Biology.* 5 : 772-778, 1993.
15. **Anderson J.M. and C. M. Van Itallie.** Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am. J. Physiol.* 269 : G467-G475, 1995.
16. **Anderson R.G.W.** The caveolae membrane system. *Ann. Rev. Biochem.* 67 : 199-25, 1998.
17. **Anderson R.G.W., B.A. Kamen, K.G. Rothberg and S.W. Lacey.** Potocytosis : sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 255 : 410-411, 1992.
18. **Ando-Akatsuka Y., M. Saitou, T. Hirase, M. Kishi, A. Sakakibara, M. Itoh, S. Yonemura M. furuse and S. Tsukita.** Interspecies diversity of the occludin sequence : cDNA cloning of human, mouse, dog, and rat-kangaroo homologues. *J. Cell. Biol.* 133 : 326-332, 1996.
19. **Antonelli-Orlidge A., K.B. Saunders, S.R. Smith and P.A. D'Amore.** An activated form of transforming growth factor beta is produced by cocultures of endothelial cells and pericytes. *PNAS* 86(12) : 4544-4548, 1989.

20. **Arceci R.J., K. Stieglitz, J. Bras, A. Schinkel, F. Baas and J. Croop.** Monoclonal antibody to an external epitope of the human *mdr1* P-glycoprotein. *Cancer Res.* 53 : 310-317, 1993.
21. **Aroeti B. and K.E. Mostov.** Polarized sorting of the polymeric immunoglobulin receptor in the exocytotic and endocytotic pathways is controlled by the same amino acids. *EMBO J.* 13 : 2297-2304, 1994.
22. **Azzaria M., E. Schurr and P. Gros.** Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Mol. Cell. Biol.* 12 : 5289-5297, 1989.
23. **Babitt J., B. Trigatti, A. Rigotti, E.J. Smart and R.G.W. Anderson.** Murine SR-B1, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* 272 : 13242-13249, 1997.
24. **Balda M. S. and J. M. Anderson.** Two classes of tight junction are revealed by ZO-1 isoforms. *Am. J. Physiol.* 264 : C918-C924, 1993.
25. **Balda M. S., M. B. Fallon, C. M. Van Itallie and J. M. Anderson.** Structure, regulation, and pathophysiology of tight junctions in the gastrointestinal tract. *Yale J. Biol. Med.* 65(6) : 725-740, 1992.
26. **Balda M. S., I. Gonzalez-Mariscal, R. G. Contreras, M. Macias-Silva, M. E. Torres-Marquez, J. A. Garcia-Sainz and M. Cerejido.** Assembly and sealing of tight junctions. Possible participation of G-proteins, phospholipase C, protéine kinase C and calmodulin. *J. Membr. Biol.* 122 : 193-202, 1991.
27. **Balda S. , L. Gonzales-Mariscal, L. Matter, M. Cerejido and J. M. Anderson.** Assembly of the tight junction : the role of diacylglycerol. *J. Cell Biol.* 123 : 293-302, 1993.
28. **Balda M.S., J.A. Whitney, C. Flores, S. Gonzalez, M. Cerejido and K. Matter.** Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J. Cell. Biol.* 134 (4) : 1031-1049, 1996.
29. **Baranczyk-Kuzma A., K. Audus and R.T. Borchardt.** Catecholamine metabolizing enzymes of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *J. Neurochem.* 46 : 1956-1960, 1986.
30. **Barbui T., A. Rambaldi, L. Parenzan, M. Zucchelli, N. Perico and G. Remuzzi.** Neurological symptoms and coma associated with doxorubicin administration during chronic cyclosporin therapy. *Lancet* 339(8806) : 1421, 1992.
31. **Beatch M., L.A. Jesaitis, W.J. Gallin, D.A. Goodenough and B.R. Stevenson.** The tight junction protein ZO-2 contains three PDZ (PSD-95/Discs-Large/ZO-1) domains and an alternatively spliced region. *J. Biol. Chem.* 271 : 25723-25726, 1996.
32. **Beaulieu E., M. Demeule, L. Ghitescu and R. Beliveau.** P-glycoprotein is strongly expressed in the luminal membranes of the endothelium of blood vessels in the brain. *Biochem. J.* 326 : 301-307, 1997.
33. **Beck D.W., R. L. Roberts and J. J. Olson.** Glial cells influence membrane-associated enzyme activity at the blood-brain barrier. *Brain Res.* 381: 131-137, 1986.
34. **Bénistant C., M.P. Dehouck, J.C. Fruchart, R. Cecchelli and M. Lagarde.** Fatty acid composition of brain capillary endothelial cells : effect of the coculture with astrocytes. *J. Lipid Res.* 36 : 2311-2319, 1995.
35. **Bernoud N., L. Fenart, C. Bénistant, J.F. Pageaux, M.P. Dehouck, P. Molière, M. Lagarde, R. Cecchelli and J. Lecerf.** Astrocytes are mainly responsible for the polyunsaturated fatty acid enrichment in blood-brain barrier endothelial cells "in vitro". *J. Lipid Res.* 39 : 1816-1824, 1998
36. **Bernoud N., L. Fenart, P. Molière, M.P. Dehouck, M. Lagarde, R. Cecchelli and J. Lecerf.** Facilitated transfer of 2-docosahexaenoyl-1-lysophosphatidylcholine through an "in vitro" blood-brain barrier over that unesterified docosahexaenoic acid. *J. Neurochem.* 338-345, 1999.

37. **Bertler A., B. Falck and E. Rosengren.** The direct demonstration of a barrier mechanism in the brain capillaries. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 20 : 317-321, 1964.
38. **Bertler A., B. Falck, C. Owman and E. Rosengren.** The localization of monoaminergic blood-brain mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 18 : 369-385, 1966.
39. **Betz A.L.** Sodium transport from blood to brain : inhibition by furosemide and amiloride. *J. Neurochem.* 41 : 1158-1164, 1983.
40. **Betz A.L., J. Csejtei and G.W. Goldstein.** Hexose transport and phosphorylation by capillaries isolated from rat brain. *Am. J. Physiol.* 236 : C96-C102, 1979.
41. **Betz A.L., J.A. Firth and G.W. Goldstein.** 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, 1980.
42. **Betz A.L., D.D. Gilboe and L.R. Drewes.** The characteristics of glucose transport across the blood-brain barrier and its relation to cerebral glucose metabolism. *Adv. Exp. Med. Biol.* 69 : 133-149, 1976.
43. **Betz A.L. and G.W. Goldstein.** Polarity of the blood-brain barrier : neutral amino acid transport into isolated brain capillaries. *Science.* 202 : 225-227, 1978.
44. **Biedl A. and R. Kraus.** Über eine bisher unbekannte toxische wirkung der gallen säuren auf das Zentralnervensystem. *Innere Med.* 47 : 1185-1200, 1898.
45. **Bilberback T.R., R.J. Grisby and R.T. Dobrowsky.** *J. Biol. Chem.* 272 : 10922-10927, 1997.
46. **Bloch B., T. Podovici, M. J. Levin, D. Tuil and A. Kahn.** Transferrin gene expression vizualized in oligodendrocytes of the rat brain by using in situ hybridization and immunohistochemistry. 82 : 6706-6710, 1985.
47. **Boado R.J.** Brain-derived peptides regulates the steady state levels and increase stability of the blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter mRNA. *Neurosci. Lett.* 197 : 179-182, 1995.
48. **Boado R.J., K.L. Black and W.M. Pardridge.** Gene expression of GLUT3 and GLUT1 glucose transporters in human brain tumors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 27 : 51-57, 1994.
49. **Boado R.J. and W.M. Pardridge.** A one-step procedure for isolation of poly A⁺mRNA from isolated brain capillaries and endothelial cells in culture. *J. Neurochem.* 57 : 2136-2139, 1991.
50. **Boado R.J. and W.M. Pardridge.** Glucose deprivation causes post-transcriptional activation of brain capillary endothelial glucose transporter gene expression *via* GLUT1 mRNA stabilization. *J. Neurochem.* 60 : 2290-2296, 1993.
51. **Boado R.J. and W.M. Pardridge.** Differential expression of α actin mRNA and immunoreactive protein in brain microvascular pericytes and smooth muscle cells. *J. Neurosci. Res.* 39 : 430-435, 1994.
52. **Bourre J.M., M. Bonneil, M. Clement, O. Dumont, G. Durand, H. Lafont, G. Nalbone and M. Picciotti.** Function of dietary polyunsaturated fatty acids in the nervous system. *Prostagland. Leuk. Essent. Fatty acids* 48, 5-15, 1993.
53. **Bradbury M.W. B. and B. Stulcova.** Efflux mechanism contributing to the stability of the potassium concentration in cerebrospinal fluid. *J. Physiol.* 208 : 415-430, 1970.
54. **Bradbury M.W.B. and C.R. Kleeman.** Stability of potassium content of cerebrospinal fluid and brain. *J. Physiol.* 213 : 519-528, 1967.
55. **Bretscher M.S. and S. Whytock.** Membrane associated vesicles in fibroblasts. *J. Ultrastruct. Res.* 61 : 215-217, 1977.
56. **Brightman M.W. and T.S. Reese.** Junctions between intimaly apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J. Cell Biol.* 40 : 648-677, 1969.

57. **Brightman M.W.** 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, 1989.
58. **Broadwell R.D., B.J. Baker, W.A. Banks, P. Friden, M. Moran, C. Olivier and J.C. Villegas.** Ferrotransferrin and antibody against the transferrin receptor as potential vehicles for drug delivery across the mammalian blood-brain barrier into the CNS. *Methods Neurosci.* 21 : 93-117, 1994.
59. **Brodsky F.M.** New fashions in vesicle coats. *Trends Cell Biol.* 7 : 175-179, 1997.
60. **Broman T.** The possibilities of the passage of substances from the blood to the central nervous system. *Acta Psych. Neurol.* 16 : 1-25, 1941.
61. **Brossard N., M. Croset, J. Lecerf, C. Pachiaudi, S. Normand, V. Chirouze, O. Macovski, J.P. Riou, J.L. Tayot and M. Lagarde.** Metabolic fate of an oral tracer doe of [¹³C]docosahexaenoic acid triglycerides in the rat. *Am. J. Physiol.* 270 : R846-R854, 1996.
62. **Brown D.A. and J.K. Rose.** Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68 : 533-544, 1992.
63. **Bruns R.R. and G.E. Palade.** Studies on blood capillaries. II. Transport of ferritin molecules across the wall of muscle capillaries. *J. Cell Biol.* 37 : 277-299, 1968.
64. **Bundgaard M., J. Frokjaer-Jensen and C. Crone.** Endothelial plasmalemmal vesicular profiles as elements in a system of branching invaginations from the cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 6439-6442, 1979.
65. **Busche R., B. Tummier, D.F. Cano-Gauci and J.R. Riordan.** Equilibrium, kinetic and photoaffinity labeling studies of daunomycin binding to P-glycoprotein-containing membranes of multidrug-resistant Chinese hamster ovary cells. *Eur. J. Biochem.* 183 : 189-197, 1989.
66. **Campbell F.M., M.J. Gordon and A.K. Dutta-roy.** Plamsa membrane fatty acid-binding protein (FABPpm) of the sheep placenta. *Biochim. Biophys. Acta* 1214 : 187-192, 1994.
67. **Cancilla P.A., J.A. Berliner and J.V. Bready.** 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, 1990.
68. **Casanova J.E., P.P. Breitfeld, S.A. Ross and K.E. Mostov.** Phosphorylation of the polymeric immunoglobulin receptor required for its efficient transcytosis. *Science* 248 : 742-745, 1990.
69. **Cefalu W.T. and W.M. Pardridge.** Restrictive transport of lipid-soluble peptide (cyclosporin) through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 45 : 1954-1956, 1985.
70. **Cerneus D.P., E. Ueffing, G. Posthuma, G.J. Strous and A. van der Ende.** Detergent insolubility of alkaline phophatase during biosynthetic transport and endocytosis. Role of cholesterol. *J. Biol. Chem.* 15 : 3150-3155, 1993.
71. **Chang W.J., K.G. Rothberg, B.A. Kamen and R.G. Anderson.** Lowering the cholesterol content of MA104 cells inhibits receptor-mediated transport of folate. *J. Cell. Biol.* 118 : 63-69, 1992.
72. **Chang C.W., X. Wang and R.B. Caldwell.** Serum open tight junctions and reduces ZO-1 protein in retinal epithelial cells. *J. Neurochem.* 69 : 859-867, 1997.
73. **Chang W.J., Y.S. Ying, K.G. Rothberg, N.M. Hooper, A.J. Turner, H.A. Gambliel, J. De Gunzburg, S.M. Mumby, A.G. Gilmanand R.G. Anderson.** Purification and characterization of smooth muscle cell caveolae. *J. Cell. Biol.* 126 : 127-138, 1994.
74. **Christie R.H., H. Chung, G.W. Rebeck, D. Strickland and B.T. Hyman.** Expression of the very low-density lipoprotein receptor (VLDL-r), an apolipoprotein-E receptor, in the central nervous system and in Alzheimer's disease. *J. neuropathol. Exp. Neurol.* 55 : 491-198, 1996.

75. **Chun M., U.K. Liyanage, M.P. Lisanti and H.F. Lodish.** Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae : colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 11728-11732, 1994.
76. **Citi S.** Protein kinase inhibitors prevent dissociation induced by low extracellular calcium in MDCK epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 117 : 169-178, 1992.
77. **Citi S. and N. Denisenko.** Phosphorylation of the tight junction protein cingulin and the effects of protein kinase inhibitors and activators in MDCK epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 108 : 2917-2926, 1995
78. **Citi S., H. Sabanay, R. Jakes, B. Geiger and J. Kendrick-Jones.** Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature.* 333 : 272-276, 1988.
79. **Citi S., H. Sabanay, J. Kendrick-Jones and B. Geiger.** Cingulin : characterization and localization. *J. Cell Sci.* 93 : 107-122, 1989.
80. **Clemente R., D.R. Jones, P. Ochoa, G. Romero, J.M. Mato and I. Varela-Nieto.** Role of glycosyl-phosphatidylinositol hydrolysis as a mitagenic signal for epidermal growth factor. *Cell Signal* 7 : 411-421, 1995.
81. **Contreras R. G., A. Ponce and J. J. Bolivar.** Calcium and tight junctions. In : *Tight Junctions*, Cereijido M. (ed.) CRC Press. London. pp 139-150, 1992.
82. **Conrad P.A., E.J. Smart, Y.S. Ying, R.G. Anderson and G.S. Bloom.** Caveolin cycles between plasma membrane caveolae and the Golgi complex by microtubule-dependent and microtubule-independent steps. *J. Cell. Biol.* 131 : 1421-1433, 1995.
83. **Cordon-Cardo C., J. P. O'Brien, D. Casals, L. Rittman-Grauer, J. L. Biedler, M. R. Melamed and J. R. Bertino.** Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at the blood barrier sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 816 : 695-698, 1989.
84. **Cornford E.M.** Zur anatomie und entwicklung der blut-hirn-schranke. *Sandorama* 1988. III, 1988.
85. **Cremer J. E., D. E. Ray, G. S. Sama and V. J. Cunningham.** 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, 1981.
86. **Crone C.** Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. *J. Physiol.* 181 : 103-113, 1965.
87. **Crone C.** The blood-brain-barrier. Facts and questions. In *Siesjo B.K. and Sorensen S.C. (eds). Ion homeostasis of the brain.* Munksgaard, Copenhagen. 52-62, 1971.
88. **Crone C. and S.P. Olesen.** Electrical resistance of brain microvascular endothelium. *Brain Res.* 241 : 49-55, 1982.
89. **Croset M., N. Brossard, C. Pachiaudi, S. Normand, J. Lecerf, V. Chirouze, J.L. Tayot and M; Lagarde.** In vivo compartmental metabolism of ¹³C docosahexaenoic acid, studied by gas chromatography-combustion isotope ratio mass spectrometry. *Lipids* 31 : 109-115, 1996.
90. **Dautry-Varsat A., A. Clechanover and H.F. Lodish.** pH and the recycling of Tf during receptor-mediated endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80 : 2258-2262, 1983.
91. **De Almeida J.B., E.J. Holtzman, P. Peters, L. Ercolani, D.A. Ausiello and J.L. Stow.** Targeting of chimeric G alpha i proteins to specific membrane domains. *J. Cell. Sci.* 107 : 507-515, 1994.
92. **DeBault L.E.** γ -glutamyltranspeptidase induction mediated by glial foot process to endothelium contact in co-culture. *Brain Res.* 220 : 432-435, 1981.
93. **DeBault L.E. and P.A. Cancilla.** γ -glutamyltranspeptidase in isolated brain endothelial cells : induction by glial cells *in vitro*. *Science.* 207 : 653-655, 1980.

94. **DeBault L.E., E. Henriquez, M.N. Hart and P.A. Cancilla.** Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture. *In vitro*. 17 : 480-494, 1981.
95. **Dehouck B., M.P. Dehouck, J.C. Fruchart and R. Cecchelli.** Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier : intercommunication between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J. Cell Biol.* 126(2) : 465-473, 1994.
96. **Dehouck M.P., P. Jolliet-Riant, F. Brée, J.C. Fruchart, R. Cecchelli and J.P. Tillement.** Drug transfert across the blood-brain barrier in vitro and in vivo models. *J. Neurochem.* 58 (5) : 1790-1797; 1992.
97. **Dehouck M.P., B. Dehouck , C. Schluep , M. Lemaire and R. Cecchelli.** Drug transport to the brain : comparison between in vitro and in vivo models of the blood-brain barrier. *Eur. J. Pharm. Sc.* 3: 357-365. 1995.
98. **Dehouck M.P., P. Vigne, G. Torpier, J.P. Breitmayer, R. Cecchelli and C. Frelin.** Endothelin-1 as a mediator of endothelial cell pericyte interactions in bovine brain capillaries. 1997.
99. **Dehouck M.P., S. Méresse, P. Delorme, J. C. Fruchart and R. Cecchelli.** An easier, reproducible and mass-production method to study the blood-brain barrier "*in vitro*". *J. Neurochem.* 54 : 1798-1801, 1990.
100. **Delorme P, J. Gayet and G. Grignon.** Ultrastructural study on transcapillary exchanges in the developing telencephalon of the chicken. *Brain Res.* 22 : 269-283, 1970.
101. **Delorme P., G. Grignon and J. Gayet.** Ultrastructure des capillaires dans le télencéphale de poulet au cours de l'embryogénèse et de la croissance post-natale. *Z. Zellforsch.* 87 : 592-602, 1968.
102. **Delton-Vandenbroucke I., P. Grammas and R.E. Anderson.** Polyunsaturated fatty acid metabolism in retinal and cerebral microvascular endothelial cells. *J. Lipid Res.* 38 : 147-159, 1997.
103. **Denker B.M. and S.K. Nigam.** Molecular structure and assembly of the tight junction. *The American physiological Society.* F1-f9, 1998.
104. **Denker B.M., C. Saha, S. Khawaja and S.K. Nigam.** Involvement of a heterotrimeric G protein α subunit in tight junction biogenesis. *J. Biol. Chem.* 271 : 25750-25753, 1996.
105. **Descamps L., M.P. Dehouck, G. Torpier and R. Cecchelli.** Receptor-mediated transcytosis of transferrin through blood-brain barrier endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 270 : H1149-H1158, 1996.
106. **De Weerd WFC and LMF Leeb-Lundberg.** Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 272 : 17858-17866, 1997.
107. **Dhopeshwarkar G.A. and J.F. Mead.** Uptake and transport of fatty acids into the brain and the rôle of the blood-brain barrier system. *Adv. Lipid Res.* 11 : 109-142, 1973.
108. **Diglio C.A., P. Grammas, F. Giacomelli and J. Wiener.** Primary culture of rat cerebral microvascular endothelial cells. *Lab. Invest.* 46 : 554-563, 1982.
109. **Dodane V. and B. Kachar.** Identification of isoforms of G proteins and PKC that colocalize with tight junctions. *J. Membr. Biol.* 149 : 199-209, 1996.
110. **Drenckhahn D. and R. Dermietzel.** Organization of the actin cytoskeleton in the intestinal brush border : a quantitative and qualitative immunoelectron microscopy study. *J. Cell Biol.* 107 : 1037-1048, 1988.
111. **Duckrow R. B.** Glucose transfer into rat brain during acute and chronic hyperglycemia. *Metab. Brain Dis.* 3 : 201-209, 1988.
112. **Duffy D.R., W.M. Pardridge and R.G. Rosenfeld.** Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor. *Metabolism.* 37 : 136-140, 1988.

113. **Duffy D.R., T. B. Cha and W. M. Pardridge.** *In vivo* evidence that brain insulin originates from blood. Clin. Res. 34 : 57A, 1986.
114. **Dupree P., R.G. Parton, G. Raposo, T.V. Kurzchalia and K. Simons.** Caveolae and sorting in the trans-golgi network of epithelial cells. EMBO 12 : 1597-1605, 1993.
115. **Eisenberg H. M. and R. L. Suddith.** Cerebral vessels have the capacity to transport sodium and potassium. Science. 206 : 1083-1085, 1979.
116. **Engelman J.A., C.C. Wykoff, S. Yasuhara, K.S. Song, T. Okamoto and M.P. Lisanti.** Recombinant expression of caveolin-1 in oncogenically transformed cells abrogates anchorage-independent growth. J. Biol. Chem. 272 : 16374-16381, 1997.
117. **Ennis S.R., X.D. Ren and A.L. Betz.** Mechanisms of sodium transport at the blood-brain barrier studied with *in situ* perfusion of rat brain. J. Neurochem. 66 : 756-763, 1996.
118. **Erlich P.** Das sauerstoffbedürfnis des organismus. Ein farbenanalistische studie. A. Hirschwald Edit. Berlin, 1885.
119. **Espinosa A., S. Kumar, S. Scully, R. Cole and J. de Vellis.** Transferrin gene expression and secretion by rat brain cells *in vitro*. J. Neurosci. Res. 25 : 576-580, 1990.
120. **Estrada C., J.V. Bready, J.A. Berliner, W.M. Pardridge and P.A. Cancilla.** Astrocyte growth factor stimulation by soluble factor produced by cerebral endothelial cells *in vitro*. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 49(6) : 539-549, 1990.
121. **Farquhar M.G. and G.E. Palade.** Junctional complexes in various epithelia. J. Cell. Biol. 17 : 375-409, 1963.
122. **Farrell C.L. and W.M. Pardridge.** Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrical by distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal plasma membrane : An electron microscopic immunogold study. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 5779-5783, 1991.
123. **Ferguson P.F., and Y. Chen.** Transient protection of cultured human cells against antitumor agents by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. Cancer Res. 47 : 433-441, 1987.
124. **Feron O., T.W. Smith, T. Michel and R.A. Kelly.** Dynamic targeting of the agonist-stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. J. Biol. Chem. 272 : 17744-17748, 1997.
125. **Fine R.L., J.A. Patel, and B.A. Chabner.** Phorbol esters induce multidrug resistance in human breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 582-586, 1988.
126. **Fishman J. B., J. B. Rubin, J. Handrahan, J. R. Connor and R. E. Fine.** Receptor-mediated transcytosis of transferrin across the blood-brain barrier. J. Neurosci. Res. 18 : 299-304, 1987.
127. **Fojo A., M. Cornwell, C. Cardarelli, D. P., Clark, N. Richert, D. W. Shen, K. Ueda, M. Willingham, M. M. Gottesman and I. Pastan.** Molecular biology of drug resistance. Breast Cancer Res. Treat. 9 : 5-16, 1987.
128. **Forbes M. S., M. L. Rennels and E. Nelson.** Caveolar systems and sarcoplasmic reticulum in coronary smooth muscle cells of the mouse. J. Ultrastruct. Res. 67 : 325-339, 1979.
129. **Ford J.M.** Modulators of multidrug resistance. Preclinical studies. Hematol. Oncol. Clin. North. Am. 9 : 337-361, 1995.
130. **Ford J.M.** Experimental reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by pharmacological chemosensitisers. Eur. J. Cancer 32 : 991-1001, 1996.
131. **Fra A.M., M. Masserini, P. Palestini, S. Sonnino and K. Simons.** A photo-reactive derivative of ganglioside GM1 specifically cross-links VIP21_caveolin on the cell surface. FEBS Lett. 375 : 11-14, 1995.

132. **Frank H.J.L. and W.M. Pardridge.** A direct *in vitro* demonstration of insulin binding to isolated brain microvessels. *Diabetes* 30 : 757, 1981.
133. **Frank H.J.L., T. Jankovic-Vokes, W.M. Pardridge and W.L. Morris.** Enhanced insulin binding to blood-brain barrier *in vivo* and to brain microvessels *in vitro* in newborn rabbits. *Diabetes*. 34 : 728-733, 1985.
134. **Frank H.J.L., W.M. Pardridge, W.L. Morris, R.G. Rosenfeld and T.B. Choi.** Binding and internalization of insulin and insulin-like growth factors by isolated brain microvessels. *Diabetes*. 35 : 654-661, 1986.
135. **Friden P.M., L.R. Walus, G.F. Musso, M.A. Taylor, B. Malfroy and R.M. Starzyk.** Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88 : 4771-4775, 1991.
136. **Friden P.M., L.R. Walus, P. Watson, S.R. Doctrow, J.W. Kozarich, C. Bäckman, H. Bergman, B. Hoffer, F. Bloom and A.C. Granholm.** Blood-brain barrier penetration and "*in vivo*" activity of an NGF conjugate. *Science*. 259 : 373-377, 1993.
137. **Frokjaer-Jensen J.** The endothelial vesicle system in cryofixed frog mesenteric capillaries analysed by ultrathin serial sectioning. *J. Electron. Microsc. Tech.* 19 : 291-304, 1991.
138. **Fujimoto T.** Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J. Cell. Biol.* 120 : 1147-1157, 1993.
139. **Fujimoto T.** GPI-anchored proteins, glycosphingolipids, and sphingomyelin are sequestered to caveolae only after crosslinking. *J. Histochem. Cytochem.* 44 : 929-941, 1996.
140. **Fujimoto T., S. Nakade, A. Miyawaki, K. Mikoshiba and K. Ogawa.** Localization of inositol 1,4,5-triphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J. Cell. Biol.* 119 : 1507-1513, 1992.
141. **Fukata M., H. Okada, S. Iinuma, S. Yanai and H. Toguchi.** Insulin fragments as a carrier for peptide delivery across the blood-brain barrier. *Pharmacol. Res.* 11 : 1681-1687, 1994.
142. **Furuse M., K. Fujita, T. Hiiragi, K. Fujimoto and S. Tsukita.** Claudin-1 and -2 : Novel membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J. Cell. Biol.* 141 : 1539-1550, 1998.
143. **Furuse M., T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura, Sa. Tsukita and Sh. Tsukita.** Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123 : 1777-1788, 1993.
144. **Furuse M., M. Itoh, T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura, Sa. Tsukita and Sh. Tsukita.** Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J. Cell Biol.* 127 : 1617-1626, 1994.
145. **Galli P., A. Brenna, P. De Camilli and J. Meldolesi.** Extracellular calcium and the organization of tight junctions in pancreatic animal cells. *Exp. Cell Res.* 99 : 173-178, 1976.
146. **Ganong W.F.** Circulation through special regions. In *Review of Medical Physiology*. pp, 514-532. Prentice-Hall International Inc, 1989.
147. **Gerhart D.Z., R.J. Levasseur, M.A. Broderius and L.R. Drewes.** Glucose transporter localization in brain using light and electron immunocytochemistry. *J. Neurosci. Res.* 22 : 464-472, 1989.
148. **Germann U.A., T.C. Chambers, S.V. Ambudkar, T. Licht, C.O. Cardarelli, I. Pastan and M.M. Gottesman.** Characterization of phosphorylation-defective mutants of human P-glycoprotein expressed in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 271 : 1708-1716, 1996.
149. **Ghitescu L., A. Fixman, M. Simionescu and N. Simionescu.** Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium : receptor-mediated transcytosis. *J. Cell. Biol.* 102 : 1304-1311, 1986.

150. **Girod J., L. Fenart, A. Regina, M.P. Dehouck, G. Hong, J.M. Scherrmann, R. Cecchelli and F. Roux.** Transport of cationized antitetanus Fab'2 fragments across an in vitro blood-brain barrier model : involvement of the transcytotic pathway. *J. Neurochem. Soumis.*
151. **Glenney J.R.** Two related but distinct forms of the Mr 36,000 tyrosine kinase substrate (calpactin) that interact with phospholipid and actin in a Ca²⁺-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 4258-4262, 1986.
152. **Glenney J.R. Jr.** Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J. Biol. Chem.* 264 : 20163-20166, 1989.
153. **Glenney J.R. Jr and D. Soppet.** Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 : 10517-10521, 1992.
154. **Glenney J.R. Jr and L. Zokas.** Novel tyrosine kinase substrates from Rous sarcoma virus-transformed cells are present in the membrane skeleton. *J. Cell. Biol.* 108 : 2401-2408, 1989.
155. **Goetz I.E., J. Warren, C. Estrada, E. Roberts and D. Krause.** Long-term serial cultivation of arterial and capillary endothelium from adult bovine brain. *In vitro Cellular and Development Biology.* 21 : 172-180, 1985.
156. **Gögelein H.** Ion channels in mammalian proximal renal tubules. *Renal. Physiol. Biochem.* 13 : 8-25, 1990.
157. **Goldberg R.I., R.M. Smith and L. Jarett.** Insulin and alpha 2-macroglobulin-methylamine undergo endocytosis by different mechanisms in rat adipocytes : I. Comparison of cell surface events. *J. Cell. Physiol.* 133 : 203-212, 1987.
158. **Goldmann E.E.** Die äussere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der "vitale Färbung". *Beitr. Klin. Chir.* 64 : 192-265. 1909.
159. **Goldmann E. E.** Vitalfärbung am zentralen Nervensystem. Beitrag zur Physiologie des Plexus choroideus und der Hirnhäute. Berlin, 1913.
160. **Goldstein G. W.** Relation of potassium transport to oxidative metabolism in isolated brain capillaries. *J. Physiol.* 286 : 185-195, 1979.
161. **Goldstein G. W. et A. L. Betz.** La barrière qui protège le cerveau. *Pour la Science.* 109 : 84-94, 1986.
162. **Gonzales- Mariscal L., B. Chavez de Ramirez and M. Cerejido.** Effect of temperature on the occluding junctions of monolayers of epithelioid cells (MDCK). *J. Membrane Biol.* 79 : 175-184, 1985.
163. **Gottesman M. M. and I. Pastan.** Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Ann. Rev. Biochem.* 62 : 385-427, 1993.
164. **Grandgirard A., J.M. Bourre, F. Julliard, P. Homayoun, O. Dumont, M. Piciotti and J.L. Sebedio.** Incorporation of trans long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids in rat brain structures and retina. *Lipids* 29 : 251-258, 1994.
165. **Green P. and E. Yavin.** Elongation, desaturation, and esterification of essential fatty acids by fetal rat brain in vivo. *J. Lipid Res.* 34 : 2099-2107, 1993.
166. **Gros P. and E. Buschman.** The mouse multidrug resistance gene family : structural and functional analysis. International review of cytology. A survey of cell biology. In : Friedlander M. Mueckler M. eds. *Molecular biology of receptors and transporters. Pump, transporters and channels*, vol 137. C. San Diego : Academic Press Inc., 169-197, 1993.
167. **Gros P., J. Croop and D. Housman.** Mammalian multidrug resistance gene : complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell.* 47 : 371-380, 1986.

168. **Gros P. and C. Shustik.** Multidrug resistance : a novel class of membrane-associated transport proteins is identified. *Cancer Invest.* 9 : 563-569, 1991.
169. **Gumbinder B., T. Lowenkopf and D. Apatira.** Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88 : 3460-3464, 1991.
170. **Gumbiner B. and K. Simons.** A functional assay for proteins involved in establishing an epithelial occluding barrier : identification of a uvomorulin-like polypeptide. *J. Cell. Biol.* 102 : 457-468, 1986.
171. **Hadari Y. R., B. Geiger, O. Nadiv, I. Sabanay, C. T. Jr Roberts, D. LeRoith and Y. Zick.** Hepatic tyrosine-phosphorylated proteins identified and localized following in vivo inhibition of protein tyrosine phosphatases : effects of H₂O₂ and vanadate administration into rat livers. *Mol. Cell. Endocrinol.* 97 : 9-17, 1993.
172. **Hamada H., K.I. Hagiwara, T. Nakajima and T. Tsuoro.** Phosphorylation of the M_r 170,000 to 180,000 glycoprotein specific to multidrug-resistant tumor cells: effects of verapamil, trifluoperazine, and phorbol esters. *Cancer Res.* 47 : 2860-2865, 1987.
173. **Hamada H and T Tsuoro.** Functional role for the 170- to 180-kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 7785-7789, 1986.
174. **Hamada H and T Tsuoro.** Characterization of the ATPase activity of the M_r 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells. *Cancer Res.* 48 : 4926-4932, 1988.
175. **Hamilton S.E. and N.M. Nathanson.** Differential localization of G-proteins, G α o and G α i-1, -2 and -3, in polarized epithelial MDCK cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 234 : 1-7, 1997.
176. **Hansen A., H. Lund-Andersen and C. Crone.** K⁺-permeability of the blood-brain barrier investigated by aid of a K⁺-sensitive microelectrode. *Acta Physiol. Scand.* 101 : 438-445, 1977.
177. **Hardebo J.E. and C. Owman.** Barrier mechanisms for neurotransmitter monoamines and their precursor at the blood-brain barrier interface. *Ann. Neurol.* 8 : 1-11, 1980.
178. **Hardebo J.E., B. Falck and C. Owman.** A comparative study on the uptake and subsequent decarboxylation of monoamine precursors in cerebral microvessels. *Acta Physiol. Scand.* 107 : 161-167, 1979.
179. **Harik S.T. and J.C. La Manna.** Vascular perfusion and blood-brain glucose transport in acute and chronic hyperglycemia. *J. Neurochem.* 51 : 1924-1929, 1988.
180. **Harmey J.H., D. Doyle, V. Brown and M.S. Rogers.** The cellular isoform of the prion protein, PrP_c, is associated with caveolae in mouse neuroblastoma (N2a) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 : 753-759, 1995.
181. **Hashida R., C. Anazimu, J. Kimura, S. Ohkuma, Y. Yoshida and T. Takano.** Transcellular transport of lipoprotein through arterial endothelial cells in monolayer culture. *Cell. Struct. Funct.* 11 : 31-37, 1986.
182. **Haskins J., L. Gu, E.S. Wittchen, J. Hibbard and B.R. Stevenson.** ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and Occludin. *J. Cell Biol.* 141 : 199-208, 1998.
183. **Hawkins R.A. and A.M. Mans.** Intermediary metabolism of carbohydrates and other fuels. In : *Handbook of neurochemistry.* Edited by A. Lajtha. New York : Plenum, 259-294, 1983.
184. **Hegmann E.J., H.C. Bauer and R.S. Kerbel.** Expression and functional activity of P-glycoprotein in cultured cerebral capillary endothelial cells. *Cancer Res.* 52 : 6969-6975, 1992.
185. **Hermann I.M. and P.A. D'Amore.** Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *J. Cell. Biol.* 101 : 43-52, 1985.

186. **Higgins C.F.** ABC transporters : from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 8 : 67-113, 1992.
187. **Higgins C.F.** Flip-flop : The transmembrane translocation of lipids. *Cell.* 79 : 393-395, 1994.
188. **Hirase T., J.M. Staddon, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka Y., M. Itoh, M. Furuse, K. Fujimoto, S. Tsukita and L.L. Rubin.** Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J. Cell. Sci.* 110 : 1603-1613. 1997.
189. **Hoff H.F., J.W. Gaubatz and A.M. Jr Gotto.** ApoB concentration in the normal human aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85 : 1424-1430.
190. **Hoi Sang Ü., M.H. Saier and M.M. Elisman.** Tight junction formation is closely linked to the polar redistribution of intramembranous particles in aggregating MDCK epithelia. *Expl. Cell Res.* 122 : 384-392, 1979.
191. **Hope H.R. and L.J. Pike.** Phosphoinositides and phosphoinositide-utilizing enzymes in detergent-insoluble lipid domains. *Mol. Biol. Cell.* 7 : 843-851, 1996.
192. **Hoyer J., R. Popp, J. Meyer, H.J. Galla and H. Gogelein.** Angiotensin II, vasopressin and GTP[γ S] inhibit inward rectifying K⁺ channels in porcine cerebral capillary endothelial cells. *J. Memb. Biol.* 123 : 55-62, 1991.
193. **Howarth A. G., M. R. Hughes and B. R. Stevenson.** Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other non epithelial cell types. *Am. J. Physiol.* 262 : C461-C469, 1992.
194. **Huang C., J.R. Hepler, L.T. Chen, A.G. Gilman, R.G.W. Anderson and S.M. Mumby.** Organization of G proteins and adenylyl cyclase at the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell.* 8 : 2365-2378, 1997.
195. **Huwyler J., D. Wu and W.M. Pardridge.** Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 14164-14169, 1996.
196. **Ide C. and T. Saito.** Electron microscopic histochemistry of ATPase and alkaline phosphatase activities in mouse digital corpuscles. *J. Neurocytol.* 9 : 207-218, 1980.
197. **Ido M., T. asao, M. Sakurai, M. Inagaki, M. Saito and H. Hidaka.** An inhibitor of protein kinase C, 1-(5-isoquinolylsulfonyl)2-methylpiperazine (H-7) inhibits TPA-induced reduction of vincristine uptake from P388 murine leukemic cell. *Leuk. Res.* 10 : 1063-1069, 1986
198. **Ikezu T., H. Ueda, B.D. Trapp, K. Nishiyama, J.F. Sha, D. Volonte, F. Galbiati, A.L. Byrd, G. Bassel, H. Serizawa, W.S. Lane, M.P. Lisanti and T. Okamoto.** Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain : differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. 177-192, 1998.
199. **Illingworth D.R. and O.W. Portman.** The uptake and metabolism of plasma lysophosphatidylcholine in vivo by the brain squirrel monkeys. *Biochem. J.* 130 : 557-567, 1972.
200. **Innis S.M.** Essential fatty acids in growth and development. *Prog. Lipid Res.* 30 : 39-103, 1991.
201. **Itoh M., S. Yoremura, A. Nagafuchi, S. Tsukita and S. Tsukita.** A 220 kDa undercoat-constitutive protein : its specific localization at cadherin based cell-cell adhesion sites. *J. Cell. Biol.* 115 : 1449-1462, 1991.
202. **Itoh M., A. Nagafuchi, S. Yoremura, T. Kitani-Yasuda, S. Tsukita and S. Tsukita.** The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells : cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J. Cell. Biol.* 121 : 491-502, 1993.
203. **Jacobson B.S., J.E. Schnitzer, M. McCaffery and G.E. Palade.** Isolation and partial characterization of the luminal plasmalemma of microvascular endothelium from rat lungs. *Eur. J. Cell. Biol.* 58 : 296-306, 1992.

204. **Janzer R.C. and M.C. Raff.** Astrocytes induce blood-brain properties in endothelial cells. *Nature.* 325 : 253-257, 1987.
205. **Jefferies W.A., M.R. Brandon, S.V. Hunt, A.F. Williams, K.C. Gatter and D.Y. Mason.** Transferrin receptor on endothelium of brain capillaries. *Nature.* 312 : 162-163, 1984.
206. **Jemmerson R. and Agre M.** Monoclonal antibodies to different epitopes on a cell-surface enzyme, human placental alkaline phosphatase, effect different patterns of labeling with protein A-colloidal gold. *J. Histochem. Cytochem.* 35 : 1277-1284, 1987.
207. **Jemmerson R., F.G. Klier and W.H. Fishman.** Clustered distribution of human placental alkaline phosphatase on the surface of both placental and cancer cells. Electron microscopic observations using gold-labeled antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 33 : 1227-1234, 1985.
208. **Jesaitis L.A and D.A. Goodenough.** Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J. Cell. Biol.* 124 : 949-961, 1994.
209. **Joly B., V. Lecureur, C. Puozzo, A. Guillouzo and O. Fardel.** Involvement of P-glycoprotein in an in vitro blood-brain barrier model. *Int. J. Oncol.* 9 : 1029-1033, 1996.
210. **Joo F.** Effect of N6, O6-dibutyl cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate on the pinocytosis of brain capillaries in mice. *Experientia.* 28, 1470-1471, 1972..
211. **Jou T.S., E.E. Schneeberger and W.J. Nelson.** Structural and functional regulation of tight junctions by RhoA and Rac1 small GTPases. *J. Cell. Biol.* 142 : 101-115, 1998.
212. **Juliano R.L. and V. Ling.** A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta.* 455 : 152-162, 1976.
213. **Juranka P. F., R. L. Zastawny and V. Ling.** P-glycoprotein multidrug resistance and a superfamily of membrane transport proteins. *FASEB J.* 3 : 2583-2592, 1989.
214. **Kamen B.A., C.A. Johnson, M.T. Wang and R.G.W. Anderson.** Regulation of the cytoplasmic accumulation of 5-methyltetrahydrofolate in MA104 cells is independent of folate receptor regulation. *J. Clin. Invest.* 84 : 1379-1386, 1989.
215. **Kamen B.A., A.K. Smith and R.G.W. Anderson.** The folate receptor works in tandem with a probenecid-sensitive carrier in MA104 cells in vitro. *J. Clin. Invest.* 87 : 1442-1449, 1991.
216. **Kamen B.A., M.T. Wang, A.J. Strexkfuss, X. Peryea and R.G.W. Anderson.** Delivery of folates to the cytoplasm of MA104 cells is mediated by a surface membrane receptor the recycles. *J. Biol. Chem.* 263 : 13602-13609, 1988.
217. **Kaneko K., M. Vey, M. Scott, S. Pilkuhn, F.E. Cohen and S.B. Prusiner.** COOH-terminal sequence of the cellular prion protein directs subcellular trafficking and controls conversion into the scrapie isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 2333-2338, 1997.
218. **Kartenbeck J., H. Stukenbrok and A. Helenius.** Endocytosis of simian virus 40 into the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 109 : 2721-2729, 1989.
219. **Katzman R.** Maintenance of a constant brain extracellular potassium. *Fed. Proc.* 35 : 1244-1247, 1976.
220. **Keon B.K., S. Schäfer, C. Kuhn, C. Grund and W.W. Franke.** Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J. Cell. Biol.* 134 : 1003-1018, 1996.
221. **Kilberg M.S., B.R. Stevens and D.A. Novak.** Recent advances in mammalian amino acid transport. *Annu. Rev. Nutr.* 13 : 137-165, 1993.
222. **Kimelberg H. and M. Norenberg.** Les astrocytes. *Pour la Science* n°140 : 78-89, 1989.
223. **Kimelberg H.** Primary astrocyte cultures-A key to astrocyte function. *Cell. Mol. Biol.* 3 : 1-15, 1983.

224. **Kimelberg H.K., C. Bowman, S. Biddlecome and R. S. Bourke.** Cation transport and membrane potential properties of primary astroglial cultures from neonatal rat brains. *Brain Res.* 177 : 533-550, 1979.
225. **King G.L. and S. Johnson.** Receptor-mediated transport of insulin across endothelial cells. *Science Wash. D.C.* 227 : 1583-1586, 1985a.
226. **King G.L., A.D. Goodman, S. Buzney, C. Moses and C.R. Kahn.** Receptors and growth promoting effects of insulin and insulin-like growth factors on cells from bovine retinal capillaries and aorta. *J. Clin. Invest.* 75 : 1028-1036, 1985b.
227. **Kobayashi T. and J.M. Robinson.** A novel intracellular compartment with unusual secretory properties in human neutrophils. *J. Cell. Biol.* 113 : 743-756, 1991.
228. **Koleske A.J., D. Baltimore and M.P. Lisanti.** Reduction of caveolin and caveolae in oncogenically transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 1381-1385, 1995.
229. **Kreuter J., R.N. Alyautdin, D.A. Kharkevich and A.A. Ivanov.** Passage of peptides through the blood-brain barrier with colloidal polymer particles (nanoparticles). *Brain Res.* 674 : 171-174, 1995.
230. **Kreuter J., V.E. Petrov, D.A. Kharkevich and R.N. Alyautdin.** Influence of the type of surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the blood-brain barrier using surfactant-coated nanoparticles. *J. Controlled Rel.* 40 : 81-87, 1997.
231. **Krewson CE., Klarman ML. And Saltzman WM.** Distribution of nerve growth factor following direct delivery to brain interstitium. *Brain Res.* 680 : 196-206, 1995.
232. **Kulh W.E. and A.A. Spector.** Uptake of long-chain fatty acids methyl esters by mammalian cells. *J. Lipid Res.* 11 : 458-465, 1970.
233. **Kumagai A.K., J. Eisenberg and W.M. Pardridge.** Absorptive-mediated endocytosis of cationized albumin and a β endorphin-cationized albumin chimeric peptide by isolated brain capillaries. Model system of blood-brain barrier transport. *J. Biol. Chem.* 262 : 15214-15219, 1987.
234. **Kurtz A., A Zimmaer, F. Schnutgen, G. Bruning, F. Spener and T. Muller.** The expression pattern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein correlates with neuronal and glial cell development. *Development* 70 : 2070-2081, 1994.
235. **Kurzchalia T.V., P. Dupree, R.G. Parton, R. Kellner, H. Virat, M. Lehnert and K. Simons.** VIP21, a 21-kD membrane protein is an integral component of trans-Golgi-network-derived transport vesicles. *J. Cell. Biol.* 118 : 1003-1014, 1992.
236. **Lai F.M., S. Udenfriend and S. Spector.** Presence of norepinephrine and related enzymes in isolated brain microvessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72 : 4622-4625, 1975.
237. **Lakter C.H., N.L. Shinowara, J.C. Miller and S.I. Rapoport.** Differential localization of alkaline phosphate in barrier tissues of the frog and rat nervous systems : a cytochemical and biochemical study. *J. Comp. Neurol.* 264 : 291-302, 1987.
238. **Lamaze C. and S.L. Schmid.** The emergence of clathrin-independent pinocytotic pathways. *Cur. Opin. Cell Biol.* 7 : 573-580, 1995.
239. **Langeler E. . and V.W. Van Hinsberg.** Norepinephrine and iloprost improve barrier function of human endothelial cell monolayers : role of cAMP. *Am. J. Physiol.* 260 : C1052-C1059, 1991.
240. **Lasbennes F. and J. Gayet.** Capacity for energy metabolism in microvessels isolated from rat brain. *Neurochem. Res.* 9 : 1-10, 1984.
241. **Lechardeur D. and D. Scherman.** Functional expression of the P₁ glycoprotein mdr in primary cultures of bovine cerebral capillary endothelial cells. *Cell. Biol. Toxicol.* 11 : 283-293, 1995.

242. **Lee W.J., R.A. Hawkins, J.R. Vina and D.R. Peterson.** Glutamine transport by the blood-brain barrier : a possible mechanism for nitrogen removal. *Am. J. Physiol.* 274 : C1101-C1107, 1998.
243. **Lee W.J., D.R. Peterson, E.J. Sukowski and R.A. Hawkins.** Glucose transport by isolated plasma membranes of the bovine blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.* 272 : C1552-C1557, 1997.
244. **Lehnert M., R. De Giuli, K. Kunke, Twentyman P.R.** Serum can inhibit reversal of multidrug resistance by chemosensitisers. *Eur. J. Cancer.* 32 : 862-867, 1996.
245. **Levine V.A.** Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. *J. Med. Chem.* 23 : 682-684, 1980.
246. **Lewandowsky M.** Zur lehre von der cerebrospinalflüssigkeit. *Z. Klin. Med.* 40 : 480-494, 1900.
247. **Li S., T. Okamoto, M. Chung, M. Sargiacomo, J.E. Casanova, S.H. Hansen, I. Nishimoto and M.P. Lisanti.** Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J. Biol. Chem.* 270 : 15693-15701, 1995.
248. **Li S., K.S. Song and M.P. Lisanti.** Expression and characterization recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J. Biol. Chem.* 271 : 568-573, 1996.
249. **Lidinsky W. A. and L. R. Drewes.** Composition of the blood-brain barrier : protein composition of the capillaries endothelial cell membrane. *J. Neurochem.* 41 : 1341-1348, 1983.
250. **Lindvall M., J.E. Hardebo and C. Owman.** Barrier mechanisms for neurotransmitter monoamines in the choroid plexus. *Acta. Physiol. Scand.* 108 : 215-221, 1980.
251. **Lisanti M. P., P. E. Scherer, J. Vidugiriene, Z. Tang, A. Hermanowskivosatka, Y.H. Tu, R.F. Cook and M. Sargiacomo.** Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source : implications for human disease. *J. Cell. Biol.* 126 : 111-126, 1994.
252. **Lisanti M.P., Z.L. Tang and M. Sargiacomo.** Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein : implications for the biogenesis of caveolae. *J. Cell. Biol.* 123 : 595-604, 1993.
253. **Liu J., P. Oh, T. Horner, R.A. Rogers and J.E. Schnitzer.** Organized endothelial cell surface signal transduction in caveolae distinct from glycosylphosphatidylinositol-anchored protein microdomains. *J. Biol. Chem.* 272 : 7211-7222, 1997.
254. **Liu P. and R.G. Anderson.** Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 270 : 27179-27185, 1995.
255. **Liu P., Y. Ying, Y.G. Ko and R.G. Anderson.** Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J. Biol. Chem.* 271 : 10299-10303, 1996.
256. **Liu R. and F.J. Sharom.** Site-directed fluorescence labeling of P-glycoprotein on cysteine residues in nucleotide binding domains. *Biochemistry* 35 : 11865-11873, 1996.
257. **Loo T.W. and D.M. Clarke.** Functional consequences of glycine mutations in the predicted cytoplasmic loops of P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 269 : 7243-7248, 1994.
258. **Lund-Andersen H.** Transport of glucose from blood to brain. *Physiol. Rev.* 59 : 305-352, 1979.
259. **Madara J. L.** Intestinal absorptive cell tight junctions are linked to cytoskeleton. *Am. J. Physiol.* 253 : C171-C175, 1987.
260. **Madara J. L. and J. R. Pappenheimer.** Structural basis for physiological regulation of paracellular pathways in intestinal epithelia. *J. Membr. Biol.* 100 : 149-164, 1987.
261. **Madara J. L. and J. Stafford.** Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J. Clin. Invest.* 83(2) : 724-727, 1989.

262. **Makrides M., M.A. Neumann, R.W. Byard and R.A. Gibson.** Fatty acid composition of brain, retina and erythrocytes in breast-and formulae-fed infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 60 : 189-194, 1996.
263. **Mandarino L.J., N. Sundarraj, J. Finlayson and H.R. Hassell.** Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp. Eye Res.* 57(5) : 609-621, 1993.
264. **Martinez M. and A. Ballabriga.** Effects of parental nutrition with high doses of linoleate on the developing human liver and brain. *Lipids* 22 : 133-138, 1987.
265. **Martinez-Palomo A., I. Meza, G. Beaty and M. Cerejido.** Experimental modulation of occluding junctions in a cultured transporting epithelium. *J. Cell. Biol.* 87 : 736-745, 1980.
266. **Mastick C.C., M.J. Brady and A.R. Saltiel.** Insulin stimulates the tyrosine phosphorylation of caveolin. *J. Cell. Biol.* 129 : 1523-1531, 1995.
267. **Matter K., A. Whitney, E.M. Yamamoto and I. Mellman.** Common signals control low density lipoprotein receptor sorting in endosomes and the Golgi complex of MDCK cells. *Cell* 74 : 1053-1064, 1993.
268. **Maxwell K., J. Berliner and P. A. Cancilla.** Induction of γ -glutamyl-transpeptidase in cultured cerebral endothelial cells by a product release by astrocytes. *Brain Res.* 410 : 309-314, 1987.
269. **Mayor S., K.G. Rothberg and F.R. Maxfield.** Sequestration of GPI-anchored proteins in caveolae triggered by cross-linking. *Science* 264 : 1948-1951, 1994.
270. **Mayer U., E. Wagenaar, J.H. Beijnen, J.W. Smith, D.K. Meijer, J. van Asperen, P. Borst and A.H. Schinkel.** Substantial secretion of digoxin via intestinal mucosa and prevention of long-term digoxin accumulation in the brain by the *mdr1a* P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* 119 : 1038-1044, 1996.
271. **Mayer U., E. Wagenaar, B. Dorobek., J.H. Beijnen, P. Borst and A.H. Schinckel.** Full blockage of intestinal P-glycoprotein and extensive inhibition of blood-brain barrier P-glycoprotein by oral treatment of mice with PSC-833. *J. Clin. Invest.* 100 : 2430-2436, 1997.
272. **Mechetner E.B. and I.B. Roninson.** Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody. *Proc; Natl. Acad. Sci.* 89 : 5824-5828., 1992.
273. **Méresse S., M.P. Dehouck, P. Delorme, J.C. Fruchart and R. Cecchelli.** Lipoproteins and reconstituted blood-brain barrier. *Pharmaceutical Applications of Cell and Tissue Culture to Drug Transport* 217-229, 1991.
274. **Méresse S., C. Delbart, J. C. Fruchart and R. Cecchelli.** Low-density lipoprotein receptor on endothelium of brain capillaries. *J. Neurochem.* 53 : 340-345, 1989.
275. **Meyer J. S., E. Stoica and I. Paxu.** Catecholamine concentration in CSF and plasma of patients with cerebral infarction and haemorrhage. *Brain Res.* 96 : 277-288, 1973.
276. **Milici A.J., N.E. Watrous, H. Stukenbrok and G.E. Palade.** Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J. Cell. Biol.* 105 : 2603-2612, 1987.
277. **Miller D.W., B.T. Keller and R.T. Borchardt.** Identification and distribution of insulin receptors on cultured bovine brain microvessel endothelial cells : possible function in insulin processing in the blood-brain barrier. *J. Cell. Physiol.* 161 : 333-341, 1994.
278. **Minakawa T., J. Bready, J. Berliner, M. Fisher and P. A. Cancilla.** *In vitro* interaction of astrocytes and pericytes with capillary-like structures of brain microvessel endothelium. *Lab. Invest.* 65 : 32-40, 1991.
279. **Mineo C., G.L. James, E.J. Smart and R.G.W. Anderson.** Lacolization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane. *J. Biol. Chem.* 271 : 11930-11935, 1996.
280. **Mineo C. and R.G.W. Anderson.** A vacuolar-type proton ATPase mediates acidification of plasmalemmal vesicles during potocytosis. *Exp. Cell Res.* 224 : 237-242, 1996.

281. **Moestrup S.K., J. Gliemann and G. Pallesen.** Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res.* 269 : 375-382, 1992.
282. **Møllgård K. and Y. Balslev.** The subcellular distribution of transferrin in rat choroid plexus studied with immunogold labelling of ultracyrosections. *Histochem. J.* 21 : 441-448, 1989
283. **Moore S.A.** Local synthesis and targeting of essential fatty acids at the cellular interface between blood and brain : a role for cerebral endothelium and astrocytes in the accretion of CNS docosahexaenoic acid. In : *Fatty acids and Lipids : Biological aspects.* World Rev. Nutr. Diet. Edited by C. Galli, A.P. Simopoulos, E. Tremoli, Kerger, Basel, 75 : 128-133, 1994.
284. **Moore S.A.** Cerebral endothelium and astrocytes cooperate in supplying docosahexaenoic acid to neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 331 : 229-233, 1993.
285. **Moore S.A., E. Yoder, S. Murphy, G.R. Dutton and A.A. Spectror.** Astrocytes, not neurons, produce docosahexaenoic acid (22:6n-3) and arachidonic acid (20:4n-6). *J. Neurochem.* 56 : 518-524, 1991.
286. **Moore S.A., E. Yoder and A.A. Spectror.** Role of the blood-brain barrier in the formation of long chain n-3 and n-6 fatty acids from essential fatty acid precursors. *J. Neurochem.* 55 : 391-402, 1990.
287. **Morris C. M., A. B. Keith, J. A. Edwardson and R. G. L. Pullen.** Uptake and distribution of iron and transferrin in the adult rat brain. *J. Neurochem.* 59 : 300-306, 1992.
288. **Murata M., J. Peränen, R. Schreiner, F. Wieland, T. V. Kurzchalia and K. Simons.** VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 : 10339-10343, 1995.
289. **Nagatsu T.** Biochemistry of catecholamines : Biochemical methods. Tokyo: University of Tokyo Press, 1973.
290. **Nagy Z., V.G. Goehlert, L. S. Wolfe and I. Hüttner.** Ca⁺⁺ depletion-induced disconnection of tight junctions in isolated rat brain microvessels. *Acta Neuropathol. (Berlin).* 68 : 48-52, 1985.
291. **Naslavsky N., R. Stein, A. Yannai, G. Friedlander and A. Taraboulos.** Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J. Biol. Chem.* 272 : 6324-6331, 1997.
292. **Nathanson M. H., A. Gautam, Ng O. C. R. Bruck and J. L. Boyer.** Hormonal regulation of paracellular permeability in isolated rat hepatocyte couplets. *Am. J. Physiol.* 262 : G1079-G1086, 1992.
293. **Neiderhiser D., E. Thornell, S. Björck and J. Svanvik.** The effect of lysophosphatidylcholine on gallbladder function in the cat. *J. Lab. Clin. Med.* 101 : 699-707, 1983.
294. **Neubig R.R., M.P. Connolly and A.E. Remmers.** Rapid kinetics of G protein sbunit association : a rate-limiting conformational change? *FEBS Lett.* 355 : 251-253, 1994.
295. **Neuringer M., W.E. Connor, D.S. Lin, L. Barstad and S.J. Luck.** Biochemical and functional effects of prenatal and postnatal w3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 : 4021-4025, 1986.
296. **Nibom P. and K.E. Magnusson.** Modulation of the junctional integrity by low or high concentrations of cytochalasin B and dihydrocytochalasin B is associated with distinct changes in F-actin and ZO-1. *Biosci. Rep.* 16 : 313-326, 1996.
297. **Nigam S. K., N. Denisenko, E. Rodriguez-Boulan and S. Citi.** The role of phosphorylation in development of tight junctions in cultured renal epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181 : 548-553, 1991.
298. **Nistor A. and M. Simionescu.** Uptake of low density lipoprotein by the hamster lung. Interactions with capillary endothelium. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134 : 1266-1272, 1986.
299. **Noy N., T.M. Donnelly and D. Zakim.** Physical-chemical model for the entry of water-insoluble compounds into cells. Studies of fatty acid uptake by the liver. *Biochemistry* 25 : 2013-2021, 1986.

300. **O'Brien J.S. and E.L. Sampson.** Lipid composition of normal human : gray matter, white matter and myelin. *J. Lipid. Res.* 6 : 537-544, 1965.
301. **O'Donnell M.E., A. Martinez and D. Sun.** Cerebral microvascular endothelial cell Na-K-Cl cotransport : regulation by astrocyte-conditioned medium. *Am. J. Physiol.* 268 : C747-C754, 1995.
302. **Ohnishi T., I. Tamai, K. Sakanaka, A. Sakata, T. Yamashima, J. Yamashita and A. Tsuji.** In vivo and in vitro evidence for ATP-dependency of P-glycoprotein-mediated efflux of doxorubicin at the blood-brain barrier. *Biochemical Pharmacology.* 49 : 1541-1544, 1995.
303. **Ojakian G.K.** Tumor promoter-induced changes in the permeability of epithelial cell tight junctions. *Cell* 23 : 95-103, 1981.
304. **Ojcus D.M., R. Hellio and A. Dautry-Varsat.** Distribution of endosomal, lysosomal, and major histocompatibility complex markers in a monocytic cell line infected with chlamydia psittaci. *Infect. Immun.* 65 : 2437-2442, 1997.
305. **Oldendorf W. H.** Brain uptake of radiolabeled aminoacids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am. J. Physiol.* 221 : 1629-1639, 1971.
306. **Oldendorf W.H. J. and J. Szabo.** Amino acid assignment to one of three blood-brain barrier amino acid carriers. *Am. J. Physiol.* 230 : 94-98, 1976.
307. **Oliver J. A.** Adenylate cyclase and protein kinase C mediate opposite actions on endothelial junctions. *J. Cell Physiol.* 145 : 536-542, 1990.
308. **Olivier J.C., L. Fenart, R. Chauvet, C. Pariat, R. Cecchelli and W. Couet.** Indirect evidence that drug brain targeting using tween 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles is related to toxicity. *Pharm. Res. Soumis.*
309. **Olson L., Nordberg A., von Holst H., Backman L., Ebendal T., Alafuzoff I., Hartvig P., Herlitz A. Lilja A.** Nerve growth factor affects ¹¹C-nicotine binding, blood flow, EEG, and verbal episodic memory in an Alzheimer patient (case report). *J. Neural. Transm. Park Dis. Dement. Sect. 4* : 79-95, 1992.
310. **Oudard S., J.P. Marie and E. Pujade Lauraine.** Résistance à la chimiothérapie de type MDR en pratique clinique. *Bull. Cancer* 83 : 609-618, 1996.
311. **Ozawa M., H. Baribault and R. Kemler.** The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J.*, 8 : 1711-1717., 1989.
312. **Palade G.E.** Fine structure of blood-capillaries. *J. Appl. Physics.* 24 : 1424, 1953.
313. **Pardridge W.M.** Kinetics of competitive inhibition of neutral aminoacid transport across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 28 : 103-108, 1977.
314. **Pardridge W.M.** Brain metabolism : a perspective from the BBB. *Physiol. Rev.* 63 : 1481-1535, 1983.
315. **Pardridge W.M.** Receptor-mediated peptide transport through the blood-brain barrier. *Endocrine Rev.* 7 : 314-330, 1986.
316. **Pardridge W.M.** Overview of blood-brain barrier transport biology and experimental methodologies. In Pardridge W.M. (eds). *Peptide drug delivery to the brain.* Raven Press, New York, 99-122, 1991.
317. **Pardridge W.M.** The blood-brain barrier : cellular and molecular biology. New York : Raven Press, 395-440, 1993.
318. **Pardridge W.M.** Transport of small molecules through the blood-brain barrier : biology and methodology. *Advanced drug delivery reviews.* 15 : 5-36, 1995.
319. **Pardridge W.M.** Drug delivery to the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 : 713-731, 1997.

320. **Pardridge W.M., R.J. Boado and C.R. Farrell.** 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, 1990a.
321. **Pardridge W.M., J.L. Buciak and P. Friden.** Selective transport of an anti-transferrin receptor antibody through the blood-brain barrier "*in vivo*". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259 : 66-70, 1991.
322. **Pardridge W.M., J. Eisinger and J. Yang.** Human blood-brain barrier insulin receptor. *J. Neurochem.* 44 : 1771-1778, 1985.
323. **Pardridge W.M., P.L. Golden, Y.S. Kang and U. Bickel.** Brain microvascular and astrocyte localization of P-glycoprotein. *J. Neurochem.* 68 : 1278-1285, 1997.
324. **Pardridge W.M., Y.S. Kang, J.L. Buciak and J. Yang.** Human insulin receptor monoclonal antibody undergoes high affinity binding to human brain capillaries in vitro and rapid transcytosis through the blood-brain barrier in vivo in the primate. *Pharm. Res.* 12 : 807-816, 1995.
325. **Pardridge W.M. and Mietus L.** Palmitate and cholesterol transport through the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 34 : 463-466, 1980.
326. **Pardridge W.M., D. Triguero and C. R. Farrell.** Down-regulation of blood-brain barrier glucose transporter in experimental diabetes. *Diabetes.* 39 : 1040-1044, 1990b.
327. **Parpal S., J. Gustavsson and P. Stralfors.** Isolation of phosphooligo-saccharide/phosphoinositol glycan from caveolae and cytosol of insulin-stimulated cells. *J. Cell. Biol.* 131 : 125-135, 1995.
328. **Parton R.G.** Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J. Histochem. Cytochem.* 42 : 155-166, 1994.
329. **Parton R.G., B. Joggerst and K. Simons.** Regulated internalization of caveolae. *J. Cell. Biol.* 127 : 1199-1215, 1994.
330. **Parton R.G., M. Way, N. Zorki and E. Stang.** Caveolin-3 associates with developing T-tubules during muscle differentiation. *J. Cell. Biol.* 136 : 137-154, 1997.
331. **Pauloin A.** Vésicules recouvertes, polypeptides d'assemblage et phosphorylation. *médecine/sciences.* 7 : 561-568, 1991.
332. **Pawlosky R.J., K. Asotra, Y.C. Patel, R.C. Macconathy, R.C. Patel and S. Suresh.** Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *Neuro. Report* 6 : 653-657, 1995.
333. **Peters et al.,** 1991 membrane basale
334. **Peters A., S. Palay and H. F. Webster.** The fine structure of the nervous system : the neurons and supporting cells. W.B. Saunders, Philadelphia, London, Toronto, pp. 231-263, 1976.
335. **Philips L.S.** *Metabolism* 35 : 78-87, 1986.
336. **Pike L.J. and L. Casey.** Localization and turnover of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in caveolin-enriched membrane domains. *J. Biol. Chem.* 271 : 26453-26456, 1996.
337. **Pitas R.E., J.K. Boyles, S.H. Lee, D. Foss and R.W. Maley.** Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 917 : 148-161, 1987.
338. **Pollitt E. and R. J. Leibel (Eds).** "Iron deficiency : Brain and biochemistry and behaviour". New York : Raven Press. 1982.
339. **Popescu L.M.** *Stud. Biophys.* 44 : 141-153, 1974.
340. **Portman O.W. and D.R. Illingworth.** Lysolecithin in vivo and in vitro with particular emphasis on the arterial wall. *Biochim. Biophys. Acta* 326 : 34-42, 1973.

341. **Puro D. G. and E. Agardh.** Insulin-mediated regulation of neuronal maturation. *Science* 1170-1172, 1984.
342. **Ramsohoye P.V. and Fritz I.B.** Preliminary characterization of glial-secreted factors responsible for the induction of high electrical resistances across endothelial monolayers in a blood-brain barrier model. *Neurochem. Res.* 23 : 1545-1551, 1998.
343. **Raub T.J. and C.R. Newton.** Recycling kinetics and transcytosis of transferrin in primary cultures of bovine brain microvessel endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 149 : 141-151, 1991.
344. **Raub T.J., S.L. Kuentzel and G.A. Sawada.** Permeability of bovine brain microvessel endothelial cells *in vitro* : barrier tightening by a factor released from astrogloma cells. *Exp. Cell Res.* 199 : 330-340, 1992.
345. **Rebeck G.W., J.S. Reiter, D.K. Strickland and B.T. Hyman.** Apolipoprotein E in sporadic Alzheimer disease : allelic variation and receptor interactions. *Neuron* 11 : 575-580, 1993
346. **Reese T.S. and M.J. Karnovsky.** Fine structure localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.* 34 : 207-217, 1967.
347. **Reuter S.F., R.L. Prairie and E.S. Kaneshiro.** The kinetics of fatty acid uptake by *Paramecium tetraurelia*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40 : 370-376, 1993.
348. **Reynolds A.B., J. Daniel, P.D. McCrea, M.J. Wheelock, J. Wu and Z. Zhang.** Identification of a new catenin : the tyrosine kinase substrate p120cas associates with E-cadherin complexes. *Mol. Biol. Cell.* 14 : 8333-8342, 1994.
349. **Riberdy J.M., R.R. Avva, H.J. Geuze and P. Cresswell.** Transport and intracellular distribution of MHC class II molecules and associated invariant chain in normal and antigen-processing mutant cell lines. *J. Cell. Biol.* 125 : 1225-1237, 1994.
350. **Risau W., A. Dingler, U. Albrecht, M. P. Dehouck and R. Cecchelli.** Blood-brain barrier pericytes are the main source of g-glutamyltranspeptidase activity in brain capillaries. *J. Neurochem.* 58 : 667-671, 1992.
351. **Risau W., R. Hallmann, U. Albrecht and H. Henze-Fahle.** Brain induces the expression of an early cell surface marker for blood-brain barrier - specific endothelium. *EMBO J.* 5 : 3179-3183, 1986.
352. **Roberts R. L., R. E. Fine and A. Sandra.** Receptor-mediated endocytosis of transferrin at the blood-brain barrier. *J. Cell Sci.* 104 : 521-532, 1993.
353. **Robinson M. S.** The role of clathrin, adaptators, and dynamin in endocytosis. *Curr. Op. Cell Biol.* 6 : 538-544, 1994.
354. **Roettger B.F., R.U. Rentsch, D. Pinon, E. Holicky and E. Hadac.** Dual pathways of internalization of the cholecystokinin receptor. *J. Cell. Biol.* 128 : 1029-1041, 1995.
355. **Rogan A.M., T.C. Hamilton, R.C. Young, J.R.W. Klecker and R.F. Ozols.** Reversal of adriamycin resistance by verapamil in human ovarian cancer. *Science* 224 : 994-996, 1984.
356. **Rosenfeld G., H. Pham, B. T. Keller, R. T. Borchardt and W. M. Pardridge.** 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, 1987.
357. **Rosson D., T.G. O'Brien, J.A. Kampherstein, Z. Szallasi, K. Bogi, P.M. Blumberg and J.M. Mullin.** Protein kinase C- α activity modulates transepithelial permeability and cell junctions in the LLC-PK1 epithelial cell line. *J. Biol. Chem.* 272 : 14950-14953, 1997.
358. **Rothberg K.G., J.E. Henser, W.C. Donzell, Y.S. Ying, J.R. Glenney and R.G.W. Anderson.** Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell.* 68 : 673-682, 1992.

359. **Rothberg K.G., Y.S. Ying, B.A. Kamen and R.G. Anderson.** Cholesterol controls the clustering of the glycosphospholipid-anchored membrane receptor for 5-methyltetrahydrofolate. *J. Cell. Biol.* 111 : 2931-2938, 1990.
360. **Rothenberg M. and V. Ling.** Multidrug resistance : molecular biology and clinical relevance. *J. Natl. Cancer Inst.* 81 : 907-910, 1989.
361. **Rubin L. L. , D. E. Hall, S. Porter, K. Barbu, C. Cannon, H. C. Horner, M. Janatpour, C. W. Liaw, K. Manning, J. Morales, L. I. Tanner, K. J. Tomaselli and F. Bard.** A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 115 : 1725-1735, 1991.
362. **Rutten M. J. , R. L. Hoover, M. J. Karnovsky.** Electrical resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures. *Brain Res.* 425 : 301-310, 1987.
363. **Safa A.R., C.J. Glover, M.B. Meyers, J.L. Biedler and R.L. Felsted.** Vinblastine photoaffinity labeling of a high molecular weight surface membrane glycoprotein specific for multidrug-resistant cells. *J. Biol. Chem.* 261 : 6137-6140, 1986.
364. **Safa A.R., N.D. Mehta and M. Agresti.** Photoaffinity labeling of P-glycoprotein in multidrug resistant cells with photoactive analogs of colchicine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 162 : 1402-1408, 1989.
365. **Saitou M., Y. Ando-Akatsuka, M. Itoh, M. Furuse, J. Inazawa, K. Fujimoto and Sh. Tsukita.** Mammalian occludin in epithelial cells : its expression and subcellular distribution. *Eur. J. Cell Biol.* 73 : 222-231, 1997.
366. **Saitou M., K. Fujimoto, Y. Doi, M. Itoh, T. Fujimoto., M. Furuse, H. Takano, T. Noda and Sh Tsukita.** Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J. Cell. Biol.* 137 : 1393-1401, 1998.
367. **Sakakibara A., M. Furuse, M. Saitou, Y. Ando-Akatsuka and S. Tsukita.** Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J. Cell. Biol.* 137 (6) : 1393-1401. 1997.
368. **Sakane T. and W.M. Pardridge.** Carboxyl-directed pegylation of brain-derived neurotrophic factor markedly reduces systemic clearance with minimal loss of biologic activity. *Pharm. Res.* 14 : 1085-1091, 1997.
369. **Salem G., V. Berginer, V. Shore, I. Horak, E. Horak, G.S. Tint and S. Shefer.** Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *N. Engl. J. Med.* 316 : 1233-12138, 1987.
370. **Salem G. and S.M. Grundy.** Metabolism of cholestanol, cholesterol and bile acid in cerebrotendinous xanthomatosis. *J. Clin. Invest.* 52 : 28322-28352, 1973.
371. **Salem N. Jr., H.Y. Kim and J.A. Yergey.** Docosahexaenoic acid membrane function and metabolism. In : *Health Effects of polyunsaturated Fatty acid in Seafoods.* Edited by A.P. Simopoulos, R.R. Kifer and R. Martin. New York : Academic Press 15 : 263-317, 1986.
372. **Sanchez del pino M.M., D.R. Peterson and R.A. Hawkins.** Neutral aminoacid transport characterization of isolated luminal and abluminal membranes of the blood-brain barrier. *J. Biol. Chem.* 270 : 14913-14918, 1995.
373. **Sandoval I.V. and O. Bakke.** Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends. Cell Biol.* 4 : 292-297, 1994.
374. **Sara V. R., K. Hall, C. H. Rodeck and L. Wetterberg.** Human embryonic somatomedin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78 : 3175-3179, 1981.
375. **Sara V. R., K. Hall, M. Misaki, L. Fryklund, N. Christensen and L. Wetterberg.** Ontogenesis of somatomedin and insulin receptor in the human fetus. *J. Clin. Invest.* 71 : 1084-1094, 1983.
376. **Sargiacomo M., M. Sudol, Z. Tang and M.P. Lisanti.** Signal transducing molecules and glycosyl-phosphatidylinositol-linked proteins form a caveolin-rich insoluble complex in MDCK cells. *J. Cell. Biol.* 122 : 789-807, 1993.

377. **Satoh H., Y. Zhong, H. Isomura, M. Saitoh, K. Enomoto, N. Sawada and M. Mori.** Localization of 7H6 tight junction-associated antigen along the cell border of vascular endothelial cells correlates with paracellular barrier function against ions, large molecules and cancer cells. *Exp. Cell Res.* 222 : 269-274, 1996.
378. **Schaffer J.E. and H.F. Lodish.** Expression, cloning and characterization of a novel adipocyte long chain fatty acid transport protein. *Cell* 79 : 427-436, 1994.
379. **Scherer P.E., T. Okamoto, M. Chung, I. Nishimoto, H.F. Lodish and M.P. Lisanti.** Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 131-135, 1996.
380. **Schinkel A.H., J.J.M. Smit, O. van Tellingen, J.H. Beijnen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C.A. Mol, M.A. van der Valk, E.G. Robanus-Maanda, H.P.J. de Riele, A.J.M. Berns and P. Borst.** 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, 1994.
381. **Schinkel A.H., E. Wagenaar, C.A. Mol and L. van Deemter.** P-glycoprotein in blood-brain barrier of mice influences the brain penetration and pharmacological activity of many drugs. *J. Clin. Invest.* 97 : 2517-2524, 1996.
382. **Schinkel A.H., E. Wagenaar, L. van Deemter, C.A. Mol and P. Borst.** Absence of the *mdr1a* P-glycoprotein in mice affects tissue distribution and pharmacokinetics of dexamethasone, digoxin and cyclosporinA. *J. Clin. Invest.* 96 : 1698-1705, 1995.
383. **Schlossman D.M., S.L. Schmid, W.A. Braell and J.E. Rothman.** An enzyme that removes clathrin coats : purification of an uncoating ATPase. *J. Cell Biol.* 99 : 722-733, 1984.
384. **Schnitzer J.E.** Update on the cellular and molecular basis of capillary permeability. *TCM.* 3(4) : 124-130, 1993.
385. **Schnitzer J.E. and J. Bravo.** High affinity binding, endocytosis, and degradation of conformationally modified albumins. Potential role of gp30 and gp18 as novel scavenger receptors. *J. Biol. Chem.* 268 : 7562-7570, 1993.
386. **Schnitzer J.E., J. Liu and P. Oh.** Endothelial caveolae have the molecular transport machinery for vesicle budding, docking, and fusion including VAMP, NSF, SNAP, annexins, and GTPases. *J. Biol. Chem.* 270 : 14399-14404, 1995b.
387. **Schnitzer J.E. and P. Oh.** Albondin-mediated capillary permeability to albumin. Differential role of receptors in endothelial transcytosis and endocytosis of native and modified albumins. *J. Biol. Chem.* 269 : 6072-6082, 1994.
388. **Schnitzer J.E. and P. Oh.** Aquaporin-1 in plasma membrane and caveolae provides mercury-sensitive water channels across lung endothelium. *Am. J. Physiol.* 270 : H416-H422, 1996.
389. **Schnitzer J.E., P. Oh, B.S. Jacobson and A.M. Dvorak.** Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium : microdomains enriched in caveolin, Ca²⁺-ATPase, and inositol triphosphate receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 1759-1763, 1995a.
390. **Schnitzer J.E., P. Oh, D.P. McIntosh.** Role of GTP hydrolysis in fission of caveolae directly from plasma membranes. *Science* 274 : 239-242, 1996.
391. **Schnitzer J.E., P. Oh, E. Pinney and J. Allard.** Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium : reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J. Cell Biol.* 127(5) : 1217-1232, 1994.
392. **Schoeller C., M. Keelan, G. Mulveg, W. Stremmel and A.B. Thompson.** Oleic acid uptake into rat and rabbit jejunal brush border membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1236 : 51-64, 1995.
393. **Schroeder R., E. London and D. Brown.** Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins : GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 : 12130-12134, 1994.

394. **Scott B.L. and Bazan N.G.** Membrane docosahexaenoate is supplied to the developing brain and retina by the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 2903-2907, 1989.
395. **Selivonchick D.P. and B.I. Roots.** Lipid and fatty acyl composition of rat brain capillary endothelia isolated by a new technique. *Lipids* 12 : 165-169, 1977.
396. **Senior A.E., M.K. Al-Shawi and I.L. Urbatsch.** The catalytic cycle of P-glycoprotein. *Febs letter* 377 : 285-289, 1995.
397. **Shapiro A. B., and V. Ling.** ATPase activity of purified and reconstituted P-glycoprotein from chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 269 : 3745-3754, 1994.
398. **Shaul P.W., E.J. Smart, L.J. Robinson, Z. German, I.S. Yuhanna.,** *J. Biol. Chem.* 271 : 6518-6522, 1996.
399. **Shirai A., M. Naito, T Tatsuta, J. Dong, K. Hanaoka, K. Mikami, T. Oh-hara and K. Tsuoro.** Transport of cyclosporin A across the brain capillary endothelial cell monolayer by P-glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1222 : 400-404, 1994.
400. **Siliciano J. D. and D. A. Goodenough.** Localization of the tight junction protein. ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby kidney epithelial cells. *J. Cell Biol.* 107 : 2389-2399, 1988.
401. **Simionescu M. and N. Simionescu.** Endothelial transport of macromolecules : transcytosis and endocytosis. A look from cell biology. *Cell Biol. Rev.* 25 : 1-78, 1991.
402. **Simionescu N., M. Simionescu and G. E. Palade.** Permeability of muscle capillaries to small heme-peptides. Evidence for the existence of patent transendothelial channels. *J. Cell Biol.* 64 : 586-607, 1975.
403. **Sinclair A.J.** Incorporation of radioactive polyunsaturated fatty acids into liver and brain of developing rat. *Lipids* 10 : 175-184, 1975.
404. **Sinclair A.J. and M.A. Crawford.** The accumulation of arachidonate and docosahexaenoate in the developing rat brain. *J. Neurochem.* 19 : 1753-1758, 1972.
405. **Skarlatos S., T. Yoshikawa and W.M. Pardridge.** Transport of [¹²⁵I]transferrin through the rat blood-brain barrier. *Brain Res.* 683 : 164-171, 1995.
406. **Smart E.J., Y.S. Ying, P.A. Conrad and R.G. Anderson.** Caveolin moves from caveolae to the Golgi apparatus in response to cholesterol oxidation. *J. Cell. Biol.* 127 : 1185-1197, 1994.
407. **Smart E.J., Y.S. Ying, W.C. Donzell and R.G. Anderson.** A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 271 : 29427-29435, 1996.
408. **Smart E.J., Y.S. Ying, C. Mineo and R.G. Anderson.** A detergent-free method for purifying caveolae membrane from tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 10104-10108, 1995.
409. **Smith E.B. and C. Ashall.** Low density lipoprotein concentration in intestinal fluid from human atherosclerotic lesions. *Biochim. Biophys. Acta.* 754 : 249, 1983.
410. **Smith Q.R. and S. I. Rapoport.** Carrier-mediated transport of chloride across the blood-brain barrier. *J. Neurochem.* 42 : 754-763, 1984.
411. **Smith Q.R. and S. I. Rapoport.** Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium, and chloride. *J. Neurochem.* 46 : 1732-1742, 1986.
412. **Sobel B.E., P.B. Corr, A.K. Robinson, R.A. Goldstein, F.X. Witowski and M.S. Klein.** Accumulation of lysophosphoglycerides with arrhythmogenic properties in ischemic myocardium. *J. Clin. Invest.* 62 : 546-553, 1978.
413. **Soda R. and M. Tavassoli.** Transendothelial transport (transcytosis) of iron-transferrin complex in the bone marrow. *J. Ultrastruct. Res.* 88 : 18-29, 1984.

414. Song K.S., P.E. Scherer, Z. Tang, T. Okamoto, S. Li, M. Chafel, C. Chu, D.S. Kohtz and M.P. Lisanti. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dzstrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 271 : 15160-15165, 1996.
415. Sorrentino D., D. Stump, K; Van Ness, A. Simard, A.J. Schwab, S.L. Zhou, C.A. Gorensky and P.D. Berk. Oleate uptake by isolated hepatocytes and perfused rat liver is competitively inhibited by palmitate. *Am. J. Physiol.* 270 : G385-G392, 1996.
416. Spatz H. Die bedeutung der vitalen farbung für die lehre von stoffanstauch zwischen dem zntalnervensystem und dem übrigen körper. Das morphologische substat der stoffwechselschraken im zentralorgan. *Arch. Physiat. Nervenkr.* 101 : 267-358, 1933.
417. Spatz M. Attenuated blood-brain barrier. In : *Handbook of Neurochemistry*, ed A. Lajtha, 7-501-543. New York : plenum, 1984.
418. Spatz M., and B. B. Mrsulja. Progress in cerebral microvascular studies related to the function of the blood-brain barrier. In *Advances in cellular neurobiology*. Vol 3 Ed S. Federoff and H. Hertz. 311-337, 1982.
419. Spatz M., C. Maruki, T. Abe, W. D. Rausch, K. Abe and N. Merkel. The uptake and fate of the radiolabeled 5-hydroxytryptamine in isolated cerebral microvessels. *Brain Res.* 220 : 214-219, 1981.
420. Spooner P.J.R., D.L. Gantz, J.A. Hamilton and D.M. Small. The distribution of oleic acid between chylomicron-like emulsions, phospholipid bilayers, and serum albumin. *J. Biol. Chem.* 265 : 12650-12657, 1990.
421. Staddon J.M., K. Herrenknecht, C. Smales C. and L.L. Rubin. Evidence that tyrosine phosphorylation may increase tight junction permeability. *J. Cell. Biol.* 108 : 609-619, 1995.
422. Stahl A. and B.M. Mueller. The urokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI-linked protein, is localized in caveolae. *J. Cell. Biol.* 129 : 335-344, 1995.
423. Stan R.V., W.G. Roberts, D. Predescu, K. Ihida, L. Saucan, L. Ghitescu and G.E. Palade. Immunoisolation and partial characterization of endothelial plasmalemmal vesicles (caveolae). *Mol. Biol. Cell.* 8 : 595-605, 1997.
424. Stang E., J. Karkenbeck and R.G. Parton. Major histocompatibility complex class I molecules mediate association of SV40 with caveolae. *Mol. Biol. Cell.* 8 : 47-57, 1997.
425. Stefnová I., V. Horejsí, I.J. Ansotegui, W. Knapp and H. Stockinger. GPI-anchored cell-surface molecules complexed to protein tyrosine kinases. *Science* 254 : 1016-1019, 1991.
426. Stelzner T. J., J. V. Weil and R. F. O'Brien. Role of cyclic adenosine monophosphate in the induction of endothelial barrier properties. *J. Cell Physiol.* 139 : 157-166, 1989.
427. Stern L. S. et R. Gautier. Les rapports entre le liquide céphalo-rachidien et les éléments nerveux de l'axe cérébrospinal. *Arch. Inter. Physiol.* 17 : 391-488, 1922.
428. Stevenson B. R., J. M. Anderson, D. A. Goodenough and M. S. Mooseker. Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J. Cell Biol.* 107 : 2401-2408, 1988.
429. Stevenson B. R. and D. A. Goodenough. Zonulae occludentes in junctional complex-enriched fractions from mouse liver : preliminary morphological and biochemical characterization. *J. Cell. Biol.* 98 : 1209-1221. 1984.
430. Stevenson B. R., M. B. Heintzelman, J. M. Anderson, S. Citi and M. S. Mooseker. ZO-1 and cingulin : tight junction proteins with distinct identities and localizations. *Am. J. Physiol.* 257 : C621-C628, 1989.
431. Stevenson B. R., J. D. Siliciano, M. S. Moosker and D.A Goodenough. 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, 1986.

432. **Stewart P. A. and M. J. Wiley.** 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, 1981.
433. **Stralford P.** Insulin second messengers. *BioEssays.* 19 : 327-335, 1997.
434. **Stremmel W.** Fatty acid uptake by isolated rat heart myocytes represents a carrier-mediated transport process. *J. Clin. Invest.* 81 : 844-852, 1988.
435. **Stremmel W. and J. Gunnawan.** Indication for a specific interaction of fatty acids with a liver sinusoidal plasma membrane carrier. *Eur. J. Med. Res.* 3 : 71-76, 1998.
436. **Strohmeier G.R., W.I. Lencer, T.W. Patapoff and L.F. Thompson.** Surface expression , polarization, and functional significance of CD73 in human intestinal epithelia. *J. Clin. Invest.* 99 : 2588-2601, 1997
437. **Stuart R. O. and S.K. Nigam.** Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 6072-6076, 1995.
438. **Sugawara I.** Expression and functions of P-glycoprotein (mdr1 gene product) in normal and malignant tissues. *Acta. Pathol. Jpn.* 40 : 545-553, 1990.
439. **Svendgaard N.A., A. Björklund, J. H. Hardebo and U. Steneir.** Axonal degeneration associated with a defective blood-brain barrier in cerebral implants. *Nature.* 255 : 334-337, 1975.
440. **Switzer S. and H.A. Eder.** Transport of lysolecithin by albumin in human and rat plasma. *J. Lipid Res.* 6 : 506-511, 1965.
441. **Tachado S.D., P. Gerold, M. McConville, T. Baldwin, D. Quilici, R. Schwarz and L. Schofield.** Glycosylphosphatidylinositol toxin of *Plasmodium* induces nitric oxide synthase expression in macrophages and vascular endothelial cells by a protein kinase C-dependent signaling pathway. *J. Immunol.* 156 : 1897-1907, 1996.
442. **Tachado S.D., P. Gerold, R. Schwarz, S. Novakovic, M. McConville and L. Schofield.** Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania* : activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 : 4022-4027, 1997.
443. **Takemoto H., K. Kaneda, M. Hosokawa, M. Ide and H. Fukushima.** Conditioned media of glial cell lines induce alkaline phosphatase activity in cultures artery endothelial cells. *FEBS Letters* 350 : 99-103, 1994.
444. **Tamai I. and A.R. Safa.** Competitive interaction of cyclosporins with vinca alkaloid-binding site of p-glycoprotein in multidrug resistance. *J. Biol. Chem.* 265 : 16509-16513, 1990.
445. **Tanaka Y., Y. Abe, A. Tsugu, Y. Takamiya, A. Akatsuka, T. Tsuoro, H. Yamazaki, Y. Ueyama, O. Sato, N. Tamaoki and M. Nakamura.** Ultrastructural localization of P-glycoprotein on capillary endothelial cells in human gliomas. *Virchows Arch.* 425 : 133-138, 1994.
446. **Tang Z., P.E. Scherer, T. Okamoto, K. Song, C. Chu, D.S? Kohtz, I. Nishimoto, H.F. Lodish and M.P. Lisanti.** Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J. Biol. Chem.* 271 : 2255-2261, 1996.
447. **Tao-Cheng J. H. and M. Brightman.** Development of membrane interactions between brain endothelial cells and astrocytes. *Int. J. Devl. Neurosci.* 6 : 25-37, 1988.
448. **Tao-Cheng M., Z. Nagy and M. W. Brightman.** Astrocytic orthogonal arrays of intramembranous particle assemblies are modulated by brain endothelial cells *in vitro*. *J. Neurocytol.* 19 : 143-153, 1990.
449. **Taraboulos A., M. Scott, A. Semenov, D. Avrahami, L. Laszlo and S.B. Prusiner.** Cholesterol depletion and modification of COOH-terminal targeting sequence of the prion protein inhibit formation of the scrapie isoform. *J. Cell. Biol.* 129 : 121-132, 1995.

450. **Tavassoli M., T. Kishimoto and M. Kataoka.** Liver endothelium mediates the hepatocyte's uptake of ceruloplasmin. *J. Cell. Biol.* 102 : 1298-1303, 1986a.
451. **Tavassoli M., T. Kishimoto, M. Kataoka, R. Soda and K. Harjes.** Liver endothelium mediates the uptake of iron-transferrin complex by hepatocytes. *Exp. Cell Res.* 165 : 369-379, 1986b.
452. **Tayarani I., J. Chaudière, J. M. Lefauconnier and J. M. Bourre.** Enzymatic protection against peroxidative damage in isolated brain capillaries. *J. Neurochem.* 48 : 1399-1402, 1987a.
453. **Tayarani I., J. M. Lefauconnier, F. Roux and J. M. Bourre.** Evidence for an alanine serine and cysteine system of transport in isolated brain capillaries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 7 : 585-591, 1987b.
454. **Taylor E. M. and E. H. Morgan.** Developmental changes in transferrin and iron uptake by the brain in the rat. *Dev. Brain Res.* 55 : 35-42, 1990..
455. **Thiebault F., T. Tsuruo, H. Hamada, M. M. Gottesman, I. Pastan and M. C. Willingham.** Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 7735-7738, 1987.
456. **Thiebault F., T. Tsuruo, H. Hamada,** Immunohistochemical localization in normal tissues of different epitopes in the multidrug transport protein P170 : Evidence for localization in brain capillaries and crossreactivity of one antibody with a muscle protein. *J. Histochem. Cytochem.* 37 : 159-164, 1989.
457. **Thiès F., M.C. Delachambre, M. Bentejac, M. Lagarde and J. Lecerf.** Unsaturated fatty acids esterified in 2-acyl-1-lysophosphatidylcholine bound to albumin are more efficiently taken up by the young rat brain than the unesterified form. *J. Neurochem.* 59 : 1110-1116, 1992.
458. **Thiès F., C. Pilon, P. Molière, M. Lagarde and J. Lecerf.** Preferential incorporation of sn-2 lysoPC DHA over unesterified DHA in the young rat brain. *Am. J. Physiol.* 267 : R1273-R1279, 1994.
459. **Tilling T., D. Korte, D. Hoheisel and H.J. Galla.** Basement membrane Proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. *J. Neurochem.* 71 : 1151-1157, 1998.
460. **Tishler D.M., K.I. Weinberg, D.R. Hinton, N. Bardaro, G.M. Annett and C. Raffel.** MDR1 gene expression in brain of patients with medically intractable epilepsy. *Epilepsia* 36 : 1-6, 1995.
461. **Tominaga M., T. Tominaga, A. Miwa and Y. Okada.** Volume-sensitive chloride channel activity does not depend on endogenous P-glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 270 : 27887-27893, 1995.
462. **Tseng L. Y. H., A. L. Brown, Y. W. H. Yang, J. A. Romanus, C. C. Orlowski, T. Taylor and M. M. Rechler.** 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, 1989.
463. **Tsuji A., I. Tamai, A. Sakata, Y. Tenda and T. Terasaki.** Restricted transport of cyclosporin A across the blood-brain barrier by a multidrug transporter, p-glycoprotein. *Biochem. Pharmacol.* 46 : 1096-1099, 1993.
464. **Tsuji A., T. Terasaki, Y. Takabatake, Y. Tenda, I. Tamaj, T. Yamashima, S. Moritani, T. Tsuruo and J. Yamashita.** P-glycoprotein as the drug efflux pump in primary cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Life Sci.* 51 : 1427-1437, 1992.
465. **Tsukamoto T. and S.K. Nigam.** Tight junction proteins form large complexes and associate with the cytoskeleton in an ATP depletion model for reversible junction assembly. *J. Biol. Chem.* 272 : 16133-16139, 1997.
466. **Tsukita S., K. Oishi, T. Akiyama, T. Yamanashi, T. Yamamoto and S. Tsukita.** Specific proto-oncogenic tyrosine kinase of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J. Cell. Biol.* 113 : 867-879, 1991.
467. **Tsukita S., M. Furuse and M. Itoh.** Molecular architecture of tight junctions : occludin and ZO-1. In *Cytoskeletal regulation of membrane function.* Rockefeller University Press. 69-76, 1997.

468. **Turcotte L.P., B. Kiens and E.A. Richter.** Saturation kinetics of palmitate uptake in perfused skeletal muscle. *FEBS Lett.* 279 : 327-329, 1991.
469. **Twentyman P.T. and N.M. Bleehen.** Resistance modification by PSC-833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin A. *Eur. J. Cancer* 27 : 1639-1642, 1991.
470. **Ueda K., C. Cardarelli, M.M. Gottesman and I. Pastan.** Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin and vinblastine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 3004-3008, 1987.
471. **Ueda F., K. B. Raja, R. J. Simpson, I. S. Trowbridge and M. W. B. Bradbury.** Rate of ⁵⁹Fe uptake into brain and cerebrospinal fluid and the influence thereon of antibodies against the transferrin receptor. *J. Neurochem.* 60 : 106-113, 1993.
472. **Ueda K., N. Okamura, M. Hirai, Y. Tanigawara, T. Saeki, N. Kioka, T. Komano and R. Hori.** Human P-glycoprotein transports cortisol, aldosterone and dexamethasone but not progesterone. *J. Biol. Chem.* 267 : 24248-24252, 1992.
473. **Uriel J., J. Naval and J. Laborda.** Alpha-fetoprotein-mediated transfer of arachidonic acid into cultured cloned cells derived from a rat rhabdomyosarcoma. *J. Biol. Chem.* 262 : 3579-3585, 1987.
474. **Urien S., J.L. Pinquier, B. Paquette, P. Chaumet-Riffaud, J.R. Kiechel and J.P. Tillement.** 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 transfer of drug. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 242 : 349-353, 1987.
475. **Utsunomiya A., Y. Owada, T. Yoshimoto and H. Kondo.** Localization of mRNA for fatty acid transport protein in developing and mature brain of rats. *Mol. Brain Res.* 46 : 217-222, 1997.
476. **van Helvoort A., A.J. Smith, H. Sprong, I. Fritzsche, A.H. Schinkel, P. Borst and G. van Meer.** MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87 : 507-517, 1996.
477. **Van Hinsberg V.W., L. H. Avekes, J.J. Emeis, E. Van Corven and M. Scheffer.** Low density lipoprotein metabolism by endothelial cells from human umbilical vein arteries and veins. *Arteriosclerosis* 3 : 547, 1983.
478. **Van Houten M. and B. I. Posner.** Insulin binds to brain blood vessels *in vivo*. *Nature.* 282 : 623-625, 1979.
479. **Van Itallie C.M. and J.M. Anderson.** Occludin confer adhesiveness when expressed in fibroblasts. *J. Cell. Sci.* 110 (9) : 1113-1121, 1997.
480. **Van Renterghem C., P. Vigne and C. Frelin.** A charybdotoxin sensitive Ca²⁺ activated K⁺ channel with inward rectifying properties in brain microvascular endothelial cells. Properties and activation by endothelins. *J. Neurochem.* 65 : 1274-1281, 1995.
481. **Varon S. and G. G. Somjen.** Neuron-glia interactions. *Neurosci. Res. Prog. Bull.* 17 : 1-239, 1979.
482. **Vasile E., M. Simionescu and N. Simionescu.** Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low density lipoprotein in the arterial endothelium *in situ*. *J. Cell. Biol.* 96 : 1677, 1983.
483. **Vepa S., W.M. Scribner and V. Natarajan.** Activation of protein phosphorylation by oxidants in vascular endothelial cells : identification of tyrosine phosphorylation of caveolin. *Free. Radic. Biol. Med.* 22 : 25-35, 1997.
484. **Vey M., S. Pilkuhn, H. Wille, R. Nixon, S.J. Dearmond, E.J. Smart, R.G. Anderson, A. Taraboulos and S.B. Prusiner.** Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 : 14945-14949, 1996.

485. **Vigne P., G. Champigny, R. Marsault, P. Barbry, C. Frelin and M. A. Lazdunski.** A new type of amiloride sensitive cationic channel in endothelial cells of brain microvessels. *J Biol. Chem.* 264 : 7663-7668, 1989
486. **Vigne P., E. Feolde, C. Van Renterghem, J.P. Breittmayer and C. Frelin.** Properties and functions of neuromedin B preferring bombesin receptor in brain microvascular endothelial cells. *Eur. J. Biochem.* 233 : 414-418, 1995.
487. **Vigne P., A. L. Farre and C. Frelin.** Na⁺-K⁺-Cl⁻-cotransporter of brain capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 269 : 19925-19930, 1994.
488. **Villegas J.C. and R.D. Broadwell.** Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium. II. Adoptive transcytosis of WGA-HP and the blood-brain and brain-blood barriers. *J. Neurocytol.* 22 : 67-80, 1993.
489. **Vogel U., K. Sandvig and B. van Deurs.** Expression of caveolin-1 and polarized formation of invaginated caveolae in Caco-2 and MDCK II cells. *J. Cell. Sci.* 111 : 825-832, 1998.
490. **Vorbrodt A.W., A. S. Lossinsky and H. M. Wisniewski.** 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, 1982.
491. **Wainwright P.E., Y.S. Huang, B. Bulman-fleming, D.E. Mills, P. Redden and D. McCutcheon.** The role of n-3 essential fatty acids in brain and behavioural development : a cross-fostering study in the mouse. *Lipids* 26 : 37-45, 1991.
492. **Walter F.K.** Die allgemeinen grunglagen des stoffaus tauscher zwischen dem zentralnervensystem und dem übrigen körper. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* 101 : 195-230, 1933.
493. **Walus L.R., W.M. Pardridge, R.M. Starzyk and P.M. Friden.** Enhanced uptake of rsCD4 across the rodent and primate blood-brain barrier after conjugation to anti-transferrin receptor antibodies. *J. pharmacol. Exp. Ther.* 277 : 1067-1075, 1996.
494. **Wang G., R. Pincheira and J.T. Zhang.** Dissection of drug-binding-induced conformational changes in P-glycoprotein. *Eur. J. Biochem.* 255 : 383-390, 1998.
495. **Wang P.Y., R.L. Kitchens and R.S. Munford.** *J. Inflamm.* 47 : 126-137, 1996
496. **Weber E., G. Berta, A. Tousson, P. StJohn, M.W. Green, U. Gopalokrishnan, T. Tilling, E.J. Sorscher, T.S. Elton, D.R. Abrahamson and K.L. Kirk.** Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells; *J. Cell. Biol.* 125 : 583-594, 1994.
497. **Werther G. A., M. Abate, A. Hogg, H. Chessman, B. Oldfield, D. Hards, P. Hudson, B. Power, K. Freed and A. C. Herington.** Localization of insulin-like growth factor-I mRNA in rat brain by in situ hybridization-relationship to IGF-I receptors. *Molec. Endocrinol.* 4 : 773-778, 1990.
498. **Wiklund O., T.E. Carew and D. Steinberg.** Role of the low density lipoprotein receptor in penetration of low density lipoprotein into rabbit aortic wall. *Arteriosclerosis* 5 : 135, 1985.
499. **Wilkin G.P., D. R. Marriott and A. J. Cholewinski.** Astrocyte heterogeneity. *TINS.* 13 : 43-46, 1990.
500. **Willot E., M. S. Balda, M. Heintzelman, B. Jameson and J. M. Anderson.** Localization and differential expression of 2 isoforms of the tight-junction protein ZO-1. *Am. J. Physiol.* 262 : C1119-C1124, 1992.
501. **Wolburg H. and K. Berg.** Distribution of orthogonal arrays of particles in the Müller cell membrane of the mouse retina. *Glia.* 1 : 246-252, 1988.
502. **Wolburg H., J. Nehaus, U. Kniesel, B Krauss, E. M. Schmid, M. Öcalan, C. Farrell and W. Risau.** Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells : effects of tissue culture, second massagers and cocultured astrocytes. *J. Cell Sci.* 107 : 1347-1357, 1994.

503. **Wolf D. C. and S. B. Horwitz.** P-gp transports corticosterone and is photoaffinity-labeled by the steroid. *Int. J. Cancer.* 52 : 141-146, 1992.
504. **Wolff J. R. and T. Bär.** 'Seamless' endothelia in brain capillaries during development of the rat's cerebral cortex. *Brain Res.* 41 : 17-24, 1972.
505. **Wooldridge K.G., P.H. Williams and J.M. Ketley.** Host signal transduction and endocytosis of *Campylobacter jejuni*. *Microb. Pathog.* 21 : 299-305, 1996.
506. **Wu C., S. Butz, Y. Ying and R.G. Anderson.** Tyrosine kinase receptor concentrated in caveolae-like domains from neuronal plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 272 : 3554-3559, 1997b.
507. **Wu M., J. Fran, W. Gunning and M. Ratnam.** Clustering of GPI-anchored folate receptor independent of both cross-linking and association with caveolin. *J. Membr. Biol.* 159 : 137-147, 1997a.
508. **Xu L.Z., R. Sanchez, A. Sali and N. Heintz.** Ligand specificity of brain lipid-binding protein. *J. Biol. Chem.* 271 : 24711-24719, 1996.
509. **Yamada K.M. and B. Geiger.** Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 136 : 399-409, 1997.
510. **Yamada E.** The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1 : 445-448, 1955.
511. **Yamamoto N., H. Saitoh, A. Moriuchi, M. Nomura and H. Okuyama.** Effect of dietary α -linoleate balance on brain lipid compositions and learning ability of rats. *J. Lipid Res.* 28 : 144-151, 1987.
512. **Ying Y.S., R.G.W. Anderson and K.G. Rothberg.** Each caveolae contains multiple glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 57 : 593-604, 1992.
513. **Yoshikawa T. and W. M. Pardridge.** Biotin delivery to brain with a covalent conjugate of avidin and a monoclonal antibody to the transferrin receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263 : 897-903, 1992.
514. **Zahraoui A., G. Joberty, M. Arpin, J.J. Fontaine, R. Hellio, A. Tavitian and D. Louvard.** A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with the tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J. cell. Biol.* 124 : 101-115, 1994.
515. **Zakim D.** fatty acids enter cells by simple diffusion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 212 : 5-14, 1996.
516. **Zhong Y., K. Enomoto, H. Tobioka, Y. Konishi, M. Satoh and M. Mori.** Sequential decrease in tight junctions as revealed by 7H6 tight junction-associated protein during rat hepatocarcinogenesis. *Jpn. J. Cancer. Res.* 85 : 351-356, 1994.
517. **Zhong Y., T. Saitoh, T. Minase, N. Sawada, K. Enomoto and M. Mori.** Monoclonal antibody 7H6 reacts with junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. *J. Cell Biol.* 120 : 477-483, 1993.
518. **Zhou S.L., D. Stump, L. Isola and P.D. Berk.** Constitutive expression of a saturable transport system for non esterified fatty acids in *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 297 : 315-319, 1994.

