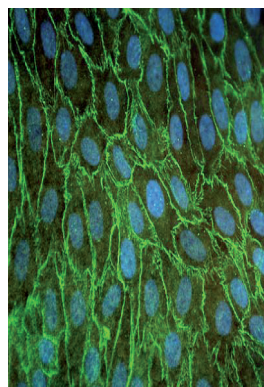


Modélisation *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique

Fabien Gosselet

► La barrière hémato-encéphalique (BHE) se situe au niveau des microvaisseaux cérébraux. Elle contrôle étroitement les échanges de molécules et de cellules entre les compartiments sanguin et cérébral. Par son rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cérébrale, cette barrière est impliquée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives et représente un obstacle majeur à la délivrance cérébrale de médicaments. Afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires caractérisant la BHE, de nombreux modèles *in vitro* ont été développés à partir de cellules animales ou humaines, primaires ou transformées. L'objet de cette revue est de discuter différents modèles, et notamment les modèles dits statiques, afin de présenter les caractéristiques de certains d'entre eux. ◀



Université Artois, EA 2465,
laboratoire de la Barrière
Hémato-Encéphalique (LBHE),
rue Jean Souvraz, SP18,
F-62300 Lens, France.
fabien.gosselet@univ-artois.fr

La barrière hémato-encéphalique (BHE)

Pour préserver son fonctionnement, le système nerveux central (SNC) nécessite des structures régulatrices. Parmi celles-ci figure la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui, grâce à ses propriétés physiques et métaboliques, limite l'entrée dans le SNC de molécules étrangères (xénobiotiques) et de cellules circulantes, l'alimente finement en nutriments, régule la composition du liquide interstitiel en eau et en électrolytes, et enfin élimine certains déchets métaboliques [1].

La BHE est localisée au niveau des cellules endothéliales cérébrales (CEC) qui tapissent la paroi des microvaisseaux cérébraux. Les CEC arborent des propriétés physiques et métaboliques essentielles au rôle de « gardienne du SNC » de la BHE. Elles forment avec les neurones, les péricytes cérébraux, les astrocytes, les oligodendrocytes, la microglie et la membrane basale, une unité fonctionnelle dénommée complexe neuro-vasculaire (CNV) [2] (Figure 1A). Les péricytes et les astrocytes participent également à la formation de la BHE et au maintien de ses propriétés structurales et métaboliques. En interagissant continuellement

avec les autres types cellulaires constituant le CNV, ils ajustent les apports en nutriments, ou en molécules, aux besoins du SNC [2]. Ces propriétés reposent sur les caractéristiques physiologiques des CEC qui forment une réelle barrière physique entre le SNC et le sang. En effet, contrairement aux cellules endothéliales des microvaisseaux situés en périphérie, les CEC sont enrichies en mitochondries, ne présentent pas de fenestration ni de canal transendothélial, et très peu de vacuoles d'endocytose. Les CEC expriment en outre de nombreuses protéines qui interviennent dans l'édification des jonctions serrées (JS) et adhérentes (JA), composées de protéines transmembranaires et cytoplasmiques les reliant au cytosquelette des cellules (Figure 2), restreignant ainsi le passage de molécules entre deux cellules adjacentes [3].

La BHE est également considérée comme une barrière métabolique. La régulation des échanges entre circulation sanguine et cerveau se réalise en effet au travers du cytoplasme des CEC, par des systèmes de transports spécialisés, comme la transcytose impliquant des récepteurs, et les systèmes *solute carrier* (SLC) [4, 5] (→).

Les SLC participent au transport de nutriments (glucose, acides aminés, nucléosides, acides monocarboxyliques, vitamines, etc.), en général du sang vers le cerveau, et en fonction des besoins cérébraux [3]. Quant au mécanisme de transcytose impliquant des récepteurs, il permet les échanges de grosses molécules (protéines, peptides, lipoprotéines, anticorps) [3]. Certains de ces récepteurs comme le récepteur de la transferrine (TfR pour *transferrin receptor*), sont utilisés pour traverser la BHE et délivrer des médicaments à visée cérébrale [6]. Les CEC expriment également de nombreuses enzymes intra- et extracellulaires comme la monoamine oxydase (MAO) ou la γ -glutamyl transpeptidase (γ -GT) qui sont capables d'éliminer par

(→) Voir la Synthèse de
F. Gosselet et al., m/s
n° 11, novembre 2011,
page 987

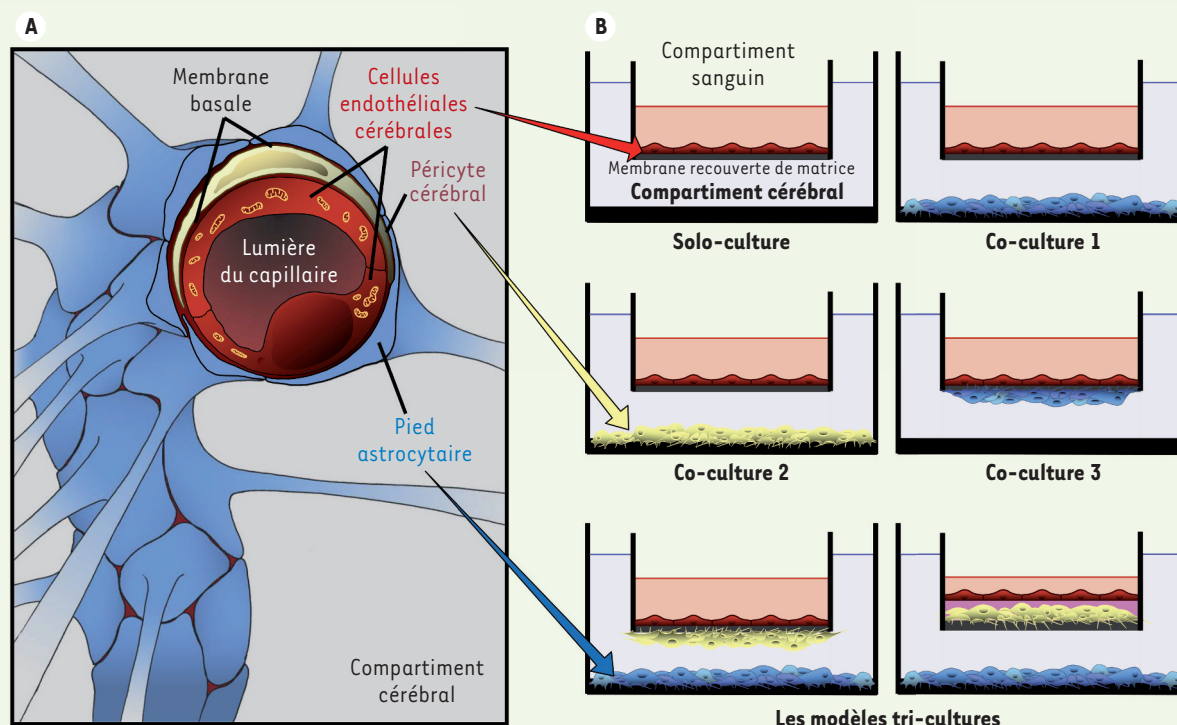


Figure 1. Représentation schématique du complexe neuro-vasculaire. **A.** La barrière hémato-encéphalique (BHE) localisée au niveau des capillaires cérébraux est constituée de cellules endothéliales cérébrales (CEC) aux propriétés particulières décrites précédemment [4, 49, 50]. En interagissant avec les neurones, la membrane basale et les autres cellules non-neuronales (péricytes, astrocytes, microglie, oligodendrocytes) forment le complexe neuro-vasculaire. **B.** Les modèles *in vitro* de BHE ont initialement consisté à cultiver les CEC seules sur un filtre (de type Transwell®) (solo-culture) recouvert de matrice. Les systèmes de co- et tri-cultures avec des cellules gliales, des astrocytes ou des péricytes cérébraux permettent généralement d'améliorer les propriétés de barrière de ces modèles mais sont plus difficilement manipulables.

hydrolyse des substrats qui seraient toxiques pour le SNC. Des pompes d'efflux, utilisant l'énergie résultant de l'hydrolyse de l'ATP, telles que la P-glycoprotéine (P-gp), la BCRP (*breast cancer resistance protein*) ou la famille des MRP (*multidrug resistance-associated proteins*), sont exprimées par les CEC. Elles limitent l'accès de certaines substances et xénobiotiques au SNC ou facilitent leur élimination du cerveau [4]. Afin de mieux comprendre la physiologie de la BHE et ainsi mieux cerner son rôle dans le fonctionnement cérébral, sa participation dans les maladies neurodégénératives, ou pour développer des systèmes de vectorisation ciblant le SNC, il est apparu utile de développer des modèles *in vitro*. Depuis le début des années 1970, plusieurs modèles de BHE ont ainsi été développés, caractérisés et améliorés. Chacun de ces modèles présente ses propres caractéristiques. Il n'est donc pas toujours aisé de choisir le plus pertinent permettant de répondre aux questions qui sont posées. La multiplication de travaux qui révèlent des différences inter-espèces, et l'apparition récente de nouveaux modèles humains changent nos habitudes d'études de la BHE, montrant ainsi la nécessité de bien comprendre les modèles afin d'optimiser leur utilisation. L'objet de cette revue est donc de donner aux

lecteurs des informations utiles sur ce qu'est un modèle statique *in vitro* de BHE. Nous décrivons ensuite brièvement certains d'entre eux, en particulier les modèles de BHE humaine, récemment développés à partir de cellules souches.

Reproduire la BHE *in vitro*

Les premières cultures *in vitro* de CEC ont été initiées à la fin des années 1970 par l'utilisation de capillaires cérébraux bovins, murins et porcins dont l'isolement était suivi d'étapes de digestion enzymatique afin d'éliminer la membrane basale et les péricytes cérébraux [7, 8]. Les compartiments cérébral et sanguin peuvent alors être reconstitués par la mise en place des CEC sur un filtre (de type transwell®, qui permet la culture des cellules) possédant des pores, préalablement recouvert d'un gel ou de protéines de matrice. Il est alors possible d'étudier le passage ou le transport de molécules, du

sang vers le cerveau, ou *vice-versa* (Figure 1B, modèle solo-culture). Ces cultures primaires sont cependant souvent difficiles à obtenir et à cultiver et il est inévitable d'observer d'importantes variations entre différentes extractions [9]. C'est pourquoi certains modèles de cellules transformées ont émergé. Ces derniers ont effectivement facilité la culture des cellules, mais ils ont l'inconvénient majeur d'utiliser des cellules établies en lignée qui présentent parfois des modifications profondes de leur métabolisme et leur physiologie. Certaines lignées montrent ainsi une perte ou une diminution d'expression des protéines de JS, à l'origine de perméabilités paracellulaires élevées [9].

Un autre inconvénient des cultures de CEC primaires provient du fait que leurs propriétés de BHE sont parfois perdues [10]. Pour améliorer ces systèmes, des cellules gliales ou des péricytes cérébraux ont alors été ajoutés en fond de puits afin de créer un système de co-culture (Figure 1, modèles de co-cultures 1 à 3) [11]. Comme *in vivo*, les propriétés physiques et métaboliques des CEC ainsi cultivées sont renforcées et/ou maintenues grâce aux facteurs solubles et diffusibles sécrétés par les cellules gliales ou les péricytes [10]. Il est alors devenu possible d'étudier *in vitro* les intercommunications entre les CEC et les autres types cellulaires. C'est notamment grâce à ces modèles que les facteurs WNT (*Wingless*) furent identifiés comme des acteurs importants des premières étapes de formation de la BHE humaine [12, 13]. Certains travaux ont ensuite permis de développer des systèmes de tri-cultures consistant à cultiver des CEC en présence de cellules gliales et de péricytes cérébraux, simultanément (Figure 1, modèles de tri-cultures) [11]. Cependant, dans ces différents systèmes, quelques paramètres additionnels, autres que la nature des cellules, restent à considérer et à ne surtout pas négliger : la nature de la matrice, la taille de la porosité du filtre utilisé, l'origine et l'hétérogénéité des cellules endothéliales.

La matrice

La matrice extracellulaire (MEC) déposée sur le filtre afin que les CEC puissent adhérer et proliférer, doit pouvoir mimer celle qui est présente au niveau des microvaisseaux cérébraux. *In vivo*, la MEC est très hétérogène. Elle est synthétisée par les CEC elles-mêmes mais également par les péricytes et les cellules gliales [14, 15]. Les matrices artificielles communément utilisées, composées de collagène, de matrigel¹, ou de poly-D-lysine², peuvent ainsi influencer les propriétés des CEC *in vitro* [14]. Cependant, la composition exacte de la MEC reste peu caractérisée. Elle représente actuellement un sujet d'étude en pleine expansion. Il est probable que dans les prochaines années, les matrices évolueront, ce qui participera à l'amélioration des pertinences de plusieurs modèles de BHE [14].

Le filtre, la taille de la porosité

La taille des pores du filtre utilisé pour les différentes expériences de transport est un point fondamental. Des pores de 0,4 µm de diamètre sont utilisés afin d'estimer la vitesse de passage de petites molécules au

travers de la BHE. Cependant, pour étudier le passage de peptides, de protéines, de nanoparticules ou de cellules, il est nécessaire d'utiliser des pores plus larges (1, 3 ou 8 µm). Or les cellules endothéliales présentent la propriété de migrer qui leur est intrinsèque. Des précautions sont donc nécessaires lorsque les CEC sont cultivées sur ces systèmes de filtre à larges pores afin d'éviter qu'elles ne les traversent et qu'elles colonisent la partie inférieure [16], ce qui génère des modèles de double couche où des CEC sont en fait présentes non seulement sur le filtre mais également en dessous. Bien évidemment, les résultats expérimentaux seront ainsi impactés, notamment ceux concernant la perméabilité. Des protocoles de culture sur ce type de filtres ont été développés et il est conseillé de les appliquer [16].

L'origine et l'hétérogénéité des cellules endothéliales de l'arbre vasculaire cérébral

Un autre facteur primordial à considérer, pourtant trop souvent négligé, est l'origine anatomique des CEC utilisées dans les modèles. La BHE est localisée au niveau des microvaisseaux cérébraux. Ils constituent un réseau dense, complexe et hétérogène d'artérioles, de veinules et de capillaires. Il est ainsi clairement admis désormais que différents types de CEC ou de péricytes composent la BHE [17, 18]. Ainsi, un modèle reposant sur des CEC provenant essentiellement d'artérioles et de veinules aura inévitablement des caractéristiques différentes d'un modèle enrichi ou composé exclusivement de CEC provenant de capillaires. Les méthodes d'isolement et de purification de ces cellules sont donc primordiales. Elles doivent être absolument optimisées et standardisées afin de connaître l'origine exacte des cellules manipulées, et ainsi assurer la reproductibilité des résultats.

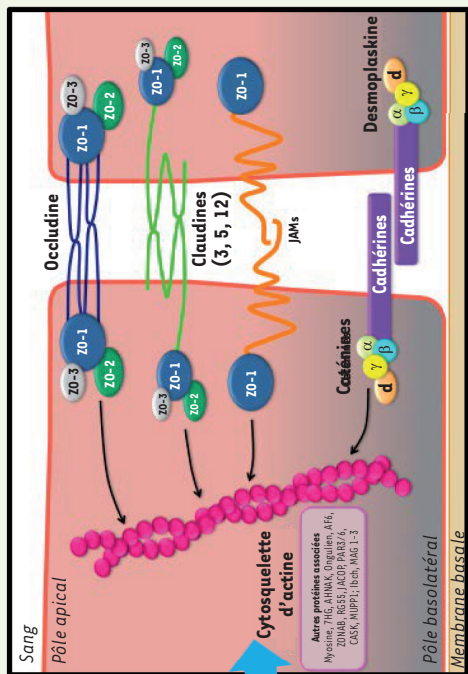
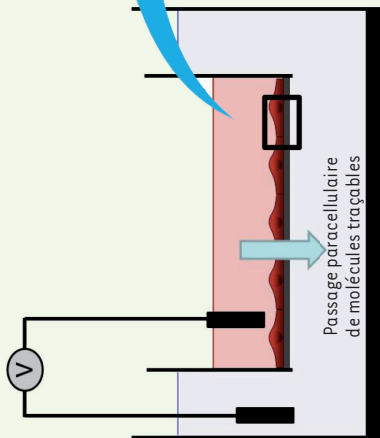
Des différences inter-espèces

Il est maintenant largement démontré que la physiologie de la BHE de l'animal, en particulier la BHE de rongeurs, est différente de la BHE humaine [19]. Le développement d'un modèle humain était donc primordial afin de générer des informations qui soient pertinentes et fiables pour permettre une extrapolation à l'homme. Or, étudier la BHE humaine à partir de cellules primaires a longtemps été difficile à réaliser du fait de la difficulté de récolter du tissu d'origine humaine de manière régulière, des faibles rendements de purification obtenus, et de la dédifférenciation des CEC humaines en culture. Un modèle humain statique fondé sur l'isolement et la purification de cellules endothéliales de microvaisseaux à partir de résection de lobe temporal de patient atteint d'épilepsie, a cependant

¹ Le matrigel est une membrane basale soluble extraite de tumeur EHS (*engelbreth-holm-swarm*) qui en se solidifiant forme une structure équivalente à une membrane basale.

² La poly-D-lysine (PDL) est un composé synthétique qui améliore l'adhésion cellulaire.

Mesure de la résistance
trans-épi(thé)liale électrique
(TEER)



Visualisation des jonctions
serrées par marquage
immunofluorescent

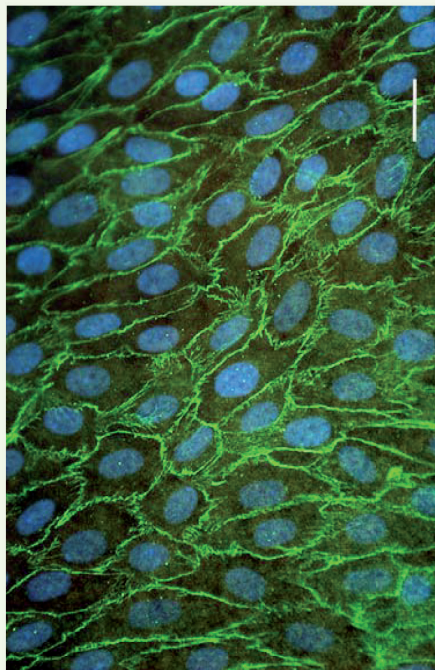


Figure 2. Perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les deux techniques utilisées pour mesurer la perméabilité paracellulaire des modèles *in vitro* de BHE sont la résistance trans-endothéliale électrique (TEER, en $\Omega \cdot \text{cm}^2$) et la vitesse de passage de petites molécules (masses moléculaires inférieures à 800 Daltons) comme le saccharose ou le jaune lucifer. Ces données sont exprimées en vitesse de perméabilité (Pe) ou perméabilité apparente (Papp) (unités respectives, 10^{-3} cm/min et 10^{-6} cm/s). Cette faible perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales cérébrales (CCE) est due à la présence entre deux cellules adjacentes, de jonctions serrées (JS) et adhérentes (JA) représentées dans l'encadré (en haut à droite). Les JS sont formées de nombreuses protéines transmembranaires telles que l'occludine et les claudines 3/5/12 qui interagissent en leur partie C-terminale avec des protéines d'échafaudage zonula occludens (ZO) qui sont elles-mêmes reliées au cytosquelette d'actine. Le rôle des molécules de jonction d'adhésion (JAM, *junctional adhesion molecules*) reste mal compris mais elles semblent intervenir comme molécules d'adhésion cellulaire, avec les leucocytes par exemple. Les JA sont constituées des protéines transmembranaires, cadhérines qui sont reliées au cytosquelette d'actine via les caténines. Contrairement aux cellules épithéliales où les JS et JA sont distinctes, ces différentes jonctions interagissent au niveau des CEC. Ainsi, l'expression des protéines de JS et leur localisation sont modulées par les cadhérines. En bas à droite, le marquage des protéines de JS par la technique d'immunofluorescence permet de s'assurer de la correcte expression et localisation des protéines ZO, occludine ou claudines. Ainsi, le marquage de ZO-1 (en vert) sur un modèle de cellules primaires de souris C57BL/6 [25] permet d'observer la localisation de cette protéine clé des JS au niveau des contacts entre les CEC. Les noyaux sont marqués au Hoechst (bleu). Barre = 50 μm .

émergé au début des années 2000 dans le laboratoire d'Alexandre Prat [20]. Ce modèle a en particulier été utilisé afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le contexte de la sclérose en plaques [21]. Avec l'apparition de lignées transformées ou l'utilisation de cellules souches, solo- ou co-cultivées, étudier la BHE humaine *in vitro* est ainsi devenu accessible et est même parfois devenu beaucoup plus simple et routinier que la mise en place de certains modèles utilisant des cellules animales.

Étudier la BHE sans modèle de BHE

Certains travaux, pourtant focalisés sur la BHE, utilisent des cellules endothéliales d'origine non cérébrale (des cellules isolées de la veine ombilicale humaine, HUVEC) ou des cellules non endothéliales et non cérébrales (comme les cellules d'adénocarcinome intestinal, Caco-2, ou encore les cellules de rein canin *Madin-Darby canine kidney* [MDCK]). Ces deux derniers types cellulaires possèdent évidemment des propriétés de barrière et sont polarisés mais ils sont physiologiquement et morphologiquement très différents des CEC qui composent la BHE [22].

Les modèles statiques de BHE *in vitro*

Les attentes

Avant de présenter les principaux modèles statiques de BHE, il est important de se demander ce qu'est un modèle statique de BHE pertinent et fiable. Il est donc nécessaire de s'attarder sur les critères permettant de répondre à cette question. Le Centre européen de validation de méthodes alternatives (ECVAM), constitué en particulier d'experts dans le domaine de la BHE, a établi une liste de critères que se doit de posséder un modèle de BHE [23] :

1. Les CEC doivent présenter la morphologie et les marqueurs traditionnels observés *in vivo* [4] : protéines de JS et JA, pompes d'efflux fonctionnelles (P-gp, BCRP, etc.), récepteurs (de la transferrine, des LDL, etc.), enzymes (MAO, γ -GT, etc.).
2. Cultivées sur filtre, les CEC doivent posséder une perméabilité paracellulaire très faible aux petites molécules. La vitesse de passage des petites molécules traditionnellement utilisées (jaune lucifer, *lucifer yellow* [LY], saccharose, etc.) est généralement calculée en vitesse de perméabilité (Pe) ou perméabilité apparente (Papp) (Figure 2). Un autre paramètre également considéré est la mesure de la résistance trans-endothéliale électrique (TEER) qui correspond à la résistance électrique fournie par les cellules. Mais cette technique est peu reproductible et les résultats obtenus dépendent de l'appareil utilisé et du manipulateur [24], ce qui rend difficile la comparaison des modèles entre eux.
3. Enfin, ces modèles ont pour vocation d'être transférés dans les autres laboratoires ou compagnies pharmaceutiques, ils doivent donc être reproductibles, fiables et faciles à cultiver.

Les différents modèles statiques de BHE

Les modèles souris

En complément de résultats obtenus *in vivo* chez la souris, ou lorsqu'il est envisagé d'utiliser des animaux transgéniques, il peut être judi-

cieux de reproduire *in vitro* la BHE de cet animal. Étudier la BHE de souris sauvages ou transgéniques en utilisant des cellules primaires co-cultivées avec des cellules gliales est possible grâce à des protocoles précis qui ont été optimisés depuis de nombreuses années [25]. Ces protocoles sont cependant très lourds et nécessitent une excellente dextérité ainsi que l'utilisation de nombreux animaux pour chaque expérience. Afin de s'affranchir de ces obstacles, des lignées de cellules murines transformées ont été générées. Elles sont commercialisées, ce qui permet un développement plus aisé et plus rapide du modèle. Ainsi, les lignées b.END3³ et b.END5 [26] sont communément utilisées. Elles présentent cependant des perméabilités élevées, ce qui limite leur utilisation pour l'étude du transport ou du passage de molécules de faible masse moléculaire. Des variantes de ces cellules, les cEND et les cerebEND ont donc été générées. Elles présentent une perméabilité plus basse mais la fonctionnalité des pompes d'efflux ou des récepteurs clés impliqués dans la BHE manque de caractérisation [27].

Les modèles développés chez le rat

Les modèles développés chez le rat permettent des études en co-culture [28] mais aussi en tri-culture [29] (Figure 1B). Tout comme pour ceux utilisés chez la souris, l'avantage de ces modèles repose sur l'utilisation de cellules dont le génome et le transcriptome sont bien caractérisés et pour lesquelles de nombreux anticorps sont disponibles. Ces modèles sont maintenant bien validés en termes de JS et présentent de faibles niveaux de perméabilité au saccharose ou au jaune lucifer (LY), ainsi que des pompes d'efflux actives. Cependant, comme les modèles développés chez la souris, ils sont lourds et longs à mettre en place. Certains de ces modèles sont désormais commercialisés sous forme de kits [24].

Les modèles bovins et porcins

Contrairement à la majorité des modèles murins primaires, il est possible de congeler les cellules primaires bovines et porcines. Ceci autorise donc l'amplification des cellules et la réalisation de plusieurs études sur un cerveau unique permettant de conserver un même fond génétique pour toutes les analyses [30, 31]. Les rendements de purification et de culture obtenus avec ces types de modèles sont bien supérieurs aux modèles précédemment cités. Pour ces raisons, les modèles por-

³ Ces cellules proviennent d'une tumeur de l'endothélium de souris SV129. Les cellules endothéliales cérébrales ont été immortalisées par infection avec un rétrovirus codant l'antigène T du *polyoma virus middle*.

cins et bovins sont intensivement étudiés et utilisés dans les laboratoires spécialisés. Ils présentent d'excellents niveaux de perméabilité et d'expression des protéines de JS. Ils ont été largement utilisés pour comprendre le rôle des pompes d'efflux, comme P-gp ou BCRP [32], pour caractériser le rôle et le fonctionnement de nombreux récepteurs majeurs tels que les récepteurs des LDL, mais aussi pour étudier les intercommunications entre CEC, péricytes cérébraux et cellules gliales [10]. Le modèle bovin a aussi la particularité d'avoir été miniaturisé afin de s'adapter aux nécessités requises pour le criblage haut débit des industriels et pour être commercialisé sous un format de kit prêt à l'emploi (*ready-to-use*) [33]. Malheureusement, comme tout modèle reposant sur des cellules primaires, des variations inter-expériences sont parfois observées entre populations cellulaires isolées (surtout pour le modèle porcin) et peu d'anticorps qui reconnaissent des protéines importantes sont disponibles [24]. Même si les études menées à partir de microvaisseaux cérébraux isolés semblent suggérer que la BHE porcine est plus proche de la BHE humaine que ne l'est la BHE murine, il est souvent délicat de comparer des données obtenues chez le porc avec les informations relatives à l'homme [34].

Les modèles humains

C'est dans le laboratoire d'Alexander Prat qu'a été développée, dans les années 2000, une méthode d'isolement et de purification de cellules endothéliales issues de résection provenant d'individus atteints d'épilepsie. Utilisées intensivement dans l'étude de la sclérose en plaques, ces cellules ont permis d'identifier les mécanismes d'interaction et d'extravasation des cellules immunitaires à travers la BHE [21]. La lignée cellulaire hCMEC/D3 (*human cerebral microvascular endothelial cell line/D3*) reste néanmoins incontestablement la lignée la plus utilisée dans les études portant sur la BHE humaine [35]. À ce jour, ces cellules ont contribué à la publication de près de 200 travaux (référéncés dans Pubmed). Cette lignée est issue de microvaisseaux de lobe temporal isolés d'une patiente atteinte d'épilepsie. Les cellules ont ensuite été immortalisées par transduction avec un vecteur lentiviral contenant la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (hTERT) et l'antigène T du virus SV49. Elle possède la majorité des propriétés de la BHE : expression de récepteurs et transporteurs spécifiques, et d'enzymes et de protéines importantes impliquées dans des voies de signalisation primordiales pour la physiologie de la BHE [35]. En conditions de culture classique, une faible expression par ces cellules de la claudine-5, une protéine clé des JS (Figure 2) est cependant rapportée [36, 37]. Ceci explique probablement l'origine des niveaux de perméabilité élevés que l'on observe avec ce modèle pour les molécules de faible masse moléculaire [24]. Cependant, ces propriétés peuvent être améliorées en ajoutant aux milieux de culture certains facteurs de croissance [24]. Ainsi, seule une partie des molécules présentant une masse moléculaire élevée et prises en charge par des récepteurs/transporteurs membranaires pourra être étudiée avec cette lignée. Il est à noter également que la co-culture et la tri-culture en présence de cellules gliales et de péricytes influencent peu les propriétés physiologiques, métaboliques et physiques des hCMEC/D3 [24]. Comme toute lignée de cellules

immortalisées, de nombreux réarrangements et aberrations chromosomiques sont par ailleurs observés lorsque ces cellules sont cultivées exagérément ou que les protocoles de cultures ne sont pas standards [38]. Jusqu'à récemment, il était néanmoins indéniable que les hCMEC/D3 représentaient le meilleur outil pour étudier la BHE humaine. De nouvelles lignées de BHE humaine ont émergé récemment comme les lignées TY10, TY08, BB19, HBMEC (*human brain microvascular endothelial cells*), NIKM-6, HCEC (*human brain endothelial cell line*), HBEC-5i et HBMEC-3, mais peu de données quant à leurs fiabilités sont disponibles et peu d'entre elles expriment les protéines de JS et présentent de réelles propriétés de BHE [14].

Certains modèles développés à partir de cellules souches semblent prometteurs pour l'étude des mécanismes physiologiques de la BHE. L'un d'eux utilise des cellules souches pluripotentes (hPSC pour *human pluripotent stem cells*) [13], deux autres des cellules souches isolées du sang de cordon ombilical humain [12, 39]. Le modèle fondé sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ou de cellules souches embryonnaires humaines (hESC) a été développé par Lippmann *et al.* [13]. Ces cellules cultivées dans des milieux non-conditionnés pendant plusieurs jours se différencient en progéniteurs de cellules neurales et en cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont alors isolées et cultivées sur filtre, seules ou en co-culture avec des cellules gliales. Les perméabilités sont similaires à celles obtenues avec les modèles animaux et plusieurs pompes d'efflux sont fonctionnelles. Cependant, aucune expérience de transport de grosses molécules impliquant des récepteurs n'a été réalisée à ce jour. L'impossibilité de congeler ces cellules endothéliales condamne les utilisateurs de ce modèle à systématiquement repartir de cellules originelles qui doivent être différenciées en cellules endothéliales puis caractérisées en termes de perméabilité, expression des protéines de JS, des récepteurs et transporteurs, etc. avant de pouvoir être cultivées en présence de cellules gliales afin de les re-caractériser de nouveau. Ces nombreuses étapes critiques ont cependant été publiées en détail afin de favoriser la dissémination de cette technique au sein de la communauté scientifique [40].

Deux laboratoires ont en parallèle développé des modèles de BHE humaine fondés sur l'utilisation de cellules souches isolées du sang de cordon ombilical. Ces modèles reposent sur la co-culture soit de cellules endothéliales progénitrices circulantes en présence d'astrocytes [39], soit de cellules souches hématopoïétiques avec des péricytes cérébraux [12]

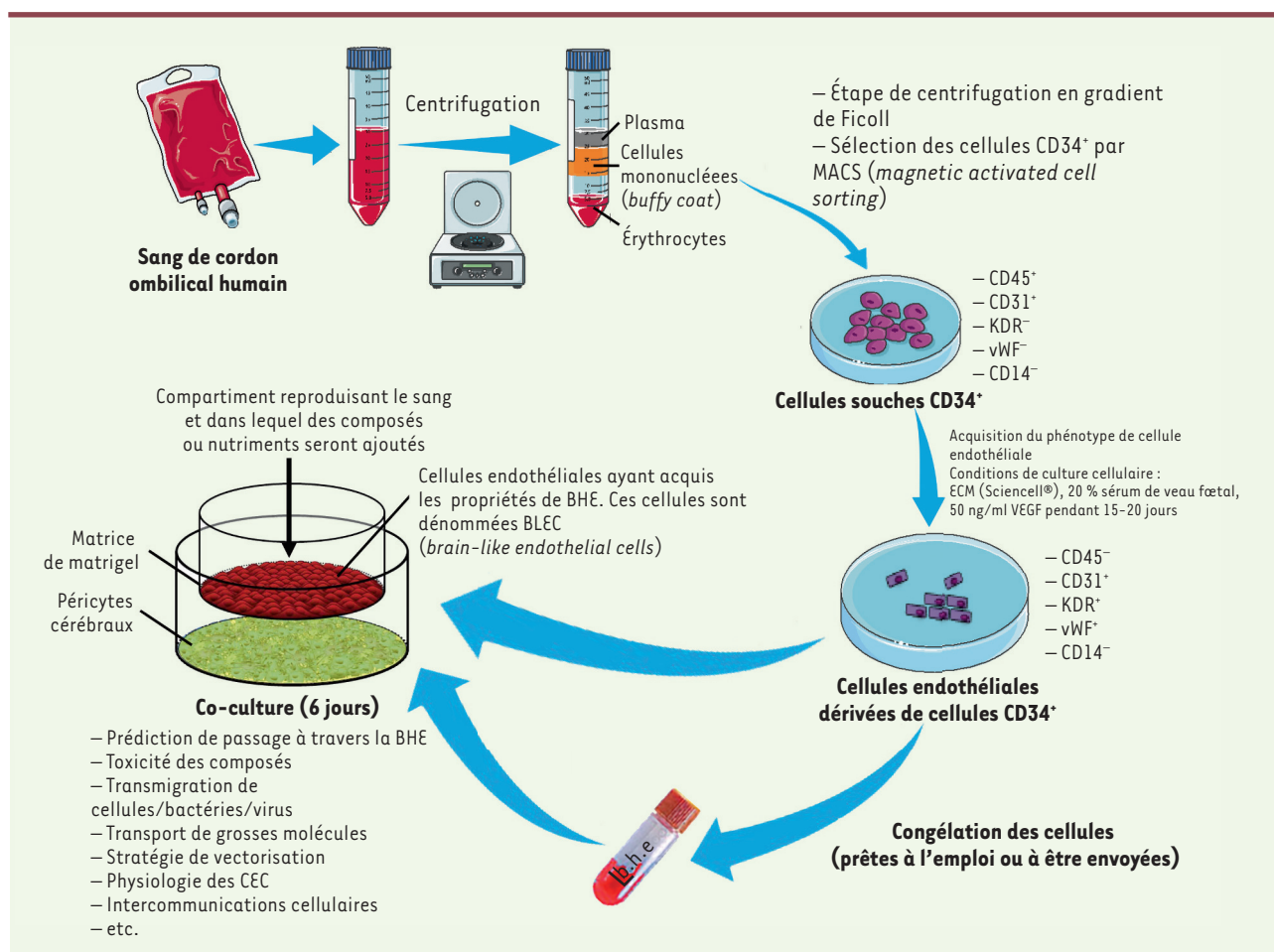


Figure 3. Modèle de BHE développé au laboratoire LBHE à partir de cellules souches hématopoïétiques issues de sang de cordon ombilical. En accord avec la législation française et avec le consentement des parents des donneurs, le sang de cordon ombilical est prélevé et centrifugé. Le « buffy coat » composé des cellules leucocytaires est prélevé puis de nouveau centrifugé en gradient de Ficoll. Le marqueur membranaire CD34⁺ est ensuite utilisé afin d'isoler les cellules souches hématopoïétiques par la technique de billes magnétiques (MACS®). Ces cellules expriment également les marqueurs CD45 et CD31, spécifiques respectivement des cellules hématopoïétiques et endothéliales. Les cellules CD34⁺ purifiées sont ensuite cultivées 15 à 20 jours comme décrit précédemment [51]. À la fin de cette étape, le phénotype de cellules endothéliales est acquis et validé par l'expression du facteur von willebrandt (vWF) et du récepteur 2 du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (KDR pour *kinase insert domain receptor*). Dès lors, les cellules sont amplifiées afin de permettre de mener de nombreux projets avec les mêmes fonds génétiques. Les cellules peuvent être congelées pour utilisation ultérieure ou pour envoi aux collaborateurs qui souhaitent les utiliser dans leur laboratoire. Lors de la décongélation, elles sont ensemencées en co-culture avec des péricytes cérébraux. Après 6 jours de co-culture, les cellules endothéliales ont acquis les propriétés des cellules endothéliales cérébrales et sont ainsi appelées *brain-like endothelial cells* (BLEC) [12].

(Figure 3). Dans ces deux modèles, les cellules endothéliales expriment des protéines de JS/JA et des récepteurs/transporteurs spécifiques de la BHE. Cependant le premier modèle fondé sur la co-culture de cellules endothéliales progénitrices circulantes en présence d'astrocytes, développé par Boyer-Di Ponio *et al.* [39], présente des niveaux de perméabilité paracellulaire qui sont similaires à ceux de la lignée hCMEC/D3, et donc trop élevés pour étudier les mécanismes de transport/passage de petites molécules au travers de la BHE. En revanche, le modèle développé par Cecchelli *et al.* [12] s'est avéré pertinent pour prédire la distribution cérébrale de petites molécules [12, 41] mais aussi pour étudier les capacités de vectorisation de peptides [42], les

intercommunications entre péricytes cérébraux et CEC [12], le métabolisme du cholestérol et les échanges de peptides A β (*amyloid β -peptides*) impliqués dans la maladie d'Alzheimer [43] ainsi que les mécanismes de transmigration de cellules tumorales au travers de la BHE [44].

Conclusion

Les modèles statiques sont utilisés afin de mieux comprendre la physiologie de la BHE. Ils sont également

utiles comme outils de criblage de molécules à destinée cérébrale. Leur utilisation a ainsi permis de réaliser des avancées significatives pour le traitement de la sclérose en plaques et de certaines tumeurs [21, 45]. Cependant, chaque modèle de BHE *in vitro* a ses particularités. Choisir le modèle le plus pertinent revient à bien cerner la question pour laquelle une réponse est attendue. La possibilité de transposer en clinique les résultats obtenus avec ces modèles repose sur l'origine des cellules utilisées, mais aussi sur les différences inter-espèces qui existent et doivent être évaluées. La commercialisation de plusieurs de ces modèles qui rend plus aisée leur utilisation, ne doit cependant pas dispenser du respect des pratiques permettant la reproductibilité et la validation des données obtenues (utilisation des bons protocoles de culture cellulaire, des méthodes de calculs adéquates [46], prise en compte des matrices et des filtres pour l'étude du passage des molécules [14], de la taille des molécules étudiées, de la porosité des filtres [16], etc.).

Quoiqu'il en soit, ces modèles ont lentement évolué ces 30 dernières années. Ils atteignent désormais le raffinement des modèles humains fondés sur l'utilisation de cellules souches. Ils arrivent à point nommé pour répondre à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer), comme une alternative des modèles utilisant des cellules animales primaires. Ils représentent également de puissants outils permettant d'étudier les mécanismes moléculaires à l'origine de la formation et de la physiologie de la BHE. Ils permettent également de réaliser les criblages de toxicité et les prédictions de passage de molécules thérapeutiques à visée cérébrale [12]. Cependant, ces modèles sont récents et il est indéniable que des étapes de caractérisation restent à effectuer, notamment en ce qui concerne la fonctionnalité des récepteurs clés de la BHE tels que les récepteurs des lipoprotéines (LDLR) et de la transferrine (TfR).

Les prochaines étapes de développement de ces modèles consisteront sans aucun doute en l'amélioration des conditions de culture afin de mimer davantage encore les conditions physiologiques de la BHE *in vivo*, avec notamment des ajustements de la MEC et leur adaptation à des systèmes dits « fluidiques » qui miment la circulation sanguine cérébrale [47]. De telles études sont initiées, avec plus ou moins de succès, sur les différents modèles existants [24, 48]. ♦

SUMMARY

Modelling of the blood-brain barrier

The blood-brain barrier (BBB) is located at the brain microvessel level and isolates the brain from the whole body, thus restricting molecule and cell exchanges between cerebral and peripheral compartments. In order to better decipher and understand the BBB physiology and development, and to investigate transport mechanism and toxicity of neuropharmaceuticals, several *in vitro* BBB models have been developed using animal or human cells, primary or immortalized cells. The aim of this review is to explain to the reader the major criteria required for a pertinent *in vitro* BBB model and to briefly expose the different models currently available with their characteristics with a special focus on the static models. ♦

REMERCIEMENTS

L'auteur tient à s'excuser auprès des nombreux collègues dont les travaux ne peuvent figurer dans cette revue du fait de la restriction du nombre de citations et de caractères.

LIENS D'INTÉRÊT

L'auteur déclare n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

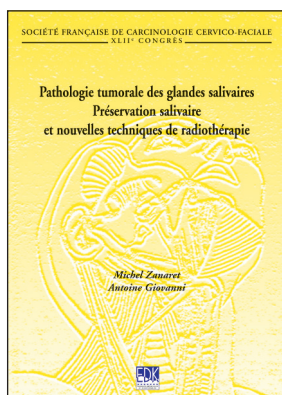
- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, et al. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010 ; 37 : 13-25.
- Neuwelt EA. Mechanisms of disease: the blood-brain barrier. *Neurosurgery* 2004 ; 54 : 131-40 ; discussion 41-2.
- Zlokovic BV. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* 2008 ; 57 : 178-201.
- Gosset F, Candela P, Cecchelli R, Fenart L. La barrière hémato-encéphalique. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 987-92.
- Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain ; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res* 2007 ; 24 : 1745-58.
- Johnsen KB, Maos T. Revisiting nanoparticle technology for blood-brain barrier transport: Unfolding at the endothelial gate improves the fate of transferrin receptor-targeted liposomes. *J Control Release* 2016 ; 222 : 32-46.
- DeBault LE, Kahn LE, Frommes SP, Cancilla PA. Cerebral microvessels and derived cells in tissue culture: isolation and preliminary characterization. *In vitro* 1979 ; 15 : 473-87.
- Bowman PD, Ennis SR, Rarey KE, et al. Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol* 1983 ; 14 : 396-402.
- Helms HC, Brodin B. Generation of primary cultures of bovine brain endothelial cells and setup of cocultures with rat astrocytes. *Methods Mol Biol* 2014 ; 1135 : 365-82.
- Dehouck B, Dehouck MP, Fruchart JC, Cecchelli R. Upregulation of the low density lipoprotein receptor at the blood-brain barrier: intercommunications between brain capillary endothelial cells and astrocytes. *J Cell Biol* 1994 ; 126 : 465-73.
- Bicker J, Alves G, Fortuna A, Falcao A. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. *Eur J Pharm Biopharm* 2014 ; 87 : 409-32.
- Cecchelli R, Aday S, Sevin E, et al. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One* 2014 ; 9 : e99733.
- Lippmann ES, Azarin SM, Kay JE, et al. Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2012 ; 30 : 783-91.
- Banerjee J, Shi Y, Azevedo HS. *In vitro* blood-brain barrier models for drug research: state-of-the-art and new perspectives on reconstituting these models on artificial basement membrane platforms. *Drug discovery Today* 2016 ; 21 : 1367-86.
- Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 2009 ; 31 : 497-511.
- Vandenhoute E, Drolez A, Sevin E, et al. Adapting coculture in vitro models of the blood-brain barrier for use in cancer research: maintaining an appropriate endothelial monolayer for the assessment of transendothelial migration. *Lab Invest* 2016 ; 96 : 588-98.
- Gosset F, Saint-Pol J, Candela P, Fenart L. Amyloid-beta peptides, Alzheimer's disease and the blood-brain barrier. *Curr Alzheimer Res* 2013 ; 10 : 1015-33.
- Attwell D, Mishra A, Hall CN, et al. What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab* 2016 ; 36 : 451-5.
- Shawahna R, Declèves X, Scherrmann JM. Hurdles with using *in vitro* models to predict human blood-brain barrier drug permeability: a special focus on transporters and metabolizing enzymes. *Curr Drug Metab* 2013 ; 14 : 120-36.
- Prat A, Biernacki K, Becher B, Antel JP. B7 expression and antigen presentation by human brain endothelial cells: requirement for proinflammatory cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000 ; 59 : 129-36.

RÉFÉRENCES

21. Larochelle C, Lecuyer MA, Alvarez JL, et al. Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation. *Ann Neurol* 2015 ; 78 : 39-53.
22. Hellinger E, Veszelka S, Toth AE, et al. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur J Pharm Biopharm* 2012 ; 82 : 340-51.
23. Prieto P, Blaauw BJ, de Boer AG, et al. Blood-brain barrier *in vitro* models and their application in toxicology. The report and recommendations of ECVAM Workshop 49. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 2004 ; 32 : 37-50.
24. Helms HC, Abbott NJ, Burek M, et al. *In vitro* models of the blood-brain barrier: an overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. *J Cereb Blood Flow Metab* 2016 ; 36 : 862-90.
25. Coisne C, Dehouck L, Faveeuw C, et al. Mouse syngenic *in vitro* blood-brain barrier model: a new tool to examine inflammatory events in cerebral endothelium. *Lab Invest* 2005 ; 85 : 734-46.
26. Omid Y, Campbell L, Barar J, et al. Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an *in vitro* blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res* 2003 ; 990 : 95-112.
27. Forster C, Silwedel C, Golenhofen N, et al. Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine *in vitro* system. *J Physiol* 2005 ; 565 : 475-86.
28. Perriere N, Yousif S, Cazaubon S, et al. A functional *in vitro* model of rat blood-brain barrier for molecular analysis of efflux transporters. *Brain Res* 2007 ; 1150 : 1-13.
29. Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, et al. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int* 2009 ; 54 : 253-63.
30. Patabendige A, Skinner RA, Morgan L, Joan Abbott N. A detailed method for preparation of a functional and flexible blood-brain barrier model using porcine brain endothelial cells. *Brain Res* 2013 ; 1521 : 16-30.
31. Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, et al. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier *in vitro*. *J Neurochem* 1990 ; 54 : 1798-801.
32. Fenart L, Buee-Scherrer V, Descamps L, et al. 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. *Pharm Res* 1998 ; 15 : 993-1000.
33. Culot M, Lundquist S, Vanuxeem D, et al. An *in vitro* blood-brain barrier model for high throughput (HTS) toxicological screening. *Toxicol In Vitro* 2008 ; 22 : 799-811.
34. Warren MS, Zerangue N, Woodford K, et al. Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. *Pharmacol Res* 2009 ; 59 : 404-13.
35. Weksler BB, Subileau EA, Perriere N, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *Faseb J* 2005 ; 19 : 1872-4.
36. Biemans EA, Jakel L, de Waal RM, et al. Limitations of the hCMEC/D3 cell line as a model for Abeta clearance by the human blood-brain barrier. *J Neurosci Res* 2016. doi:10.1002.
37. Ohtsuki S, Ikeda C, Uchida Y, et al. Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model. *Mol Pharm* 2013 ; 10 : 289-96.
38. Mkrtchyan H, Scheler S, Klein I, et al. Molecular cytogenetic characterization of the human cerebral microvessel endothelial cell line hCMEC/D3. *Cytogenet Genome Res* 2009 ; 126 : 313-7.
39. Boyer-Di Ponio J, El-Ayoubi F, Glacial F, et al. Instruction of circulating endothelial progenitors *in vitro* towards specialized blood-brain barrier and arterial phenotypes. *PLoS One* 2014 ; 9 : e84179.
40. Stebbins MJ, Wilson HK, Canfield SG, et al. Differentiation and characterization of human pluripotent stem cell-derived brain microvascular endothelial cells. *Methods (San Diego, Calif)* 2016 ; 101 : 93-102.
41. Eigenmann DE, Durig C, Jahne EA, et al. *In vitro* blood-brain barrier permeability predictions for GABAA receptor modulating piperine analogs. *Eur J Pharm Biopharm* 2016 ; 103 : 118-26.
42. Oller-Salvia B, Sanchez-Navarro M, Ciudad S, et al. MiniAp-4: A venom-inspired peptidomimetic for brain delivery. *Angewandte Chemie* 2016 ; 55 : 572-5.
43. Kuntz M, Candela P, Saint-Pol J, et al. Bexarotene promotes cholesterol efflux and restricts apical-to-basolateral transport of amyloid-beta peptides in an *in vitro* model of the human blood-brain barrier. *J Alzheimer Dis* 2015 ; 48 : 849-62.
44. Drolez A, Vandenhaute E, Julien S, et al. Selection of a relevant *in vitro* blood-brain barrier model to investigate pro-metastatic features of human breast cancer cell lines. *PLoS One* 2016 ; 11 : e0151155.
45. Drappatz J, Brenner A, Wong ET, et al. Phase I study of GRN1005 in recurrent malignant glioma. *Clin Cancer Res* 2013 ; 19 : 1567-76.
46. Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, et al. *In vitro* model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 1999 ; 36 : 165-78.
47. Palmiotti CA, Prasad S, Naik P, et al. *In vitro* cerebrovascular modeling in the 21st century: current and prospective technologies. *Pharm Res* 2014 ; 31 : 3229-50.
48. Booth R, Kim H. Characterization of a microfluidic *in vitro* model of the blood-brain barrier (muBBB). *Lab Chip* 2012 ; 12 : 1784-92.
49. Gosselet F. Apolipoprotéine E et intégrité de la barrière hémato-encéphalique. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 920-3.
50. Collin L. Ouvrir le cerveau à de nouvelles thérapies. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 486-8.
51. Pedrosa DC, Tellechea A, Moura L, et al. Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. *PLoS One* 2011 ; 6 : e16114.

TIRÉS À PART

F. Gosselet



Bon de commande à retourner à EDP Sciences, 109, avenue Aristide Briand - 92541 Montrouge Cedex
Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **Pathologie tumorale des glandes salivaires** : 35 € + 3 € de port = **38 € TTC**
 en exemplaire, soit un total de €

☐ Par chèque, à l'ordre de **EDP Sciences**

☐ Par carte bancaire : ☐ Visa ☐ Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | | |